ISSN 1818-8346

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Лечение лимфом центральной нервной системы

Система белка p53 и патогенез хронических лимфопролиферативных заболеваний

Кандидемия у детей с онкогематологическими заболеваниями

Характеристика перестроек 11q23 (MLL) у пациентов первого года жизни с ОЛЛ

3

2011

SANDOZ
Oncology Injectables

Алексан® (Цитарабин)
Доксорубицин-Эбеве
Кальциумфолинат-Эбеве
Карбоплатин-Эбеве
Метотрексат-Эбеве
Оксалиплатин-Эбеве
Паклитаксел-Эбеве
Тамоксифен-Эбеве
Цисплатин-Эбеве
Эпирубицин-Эбеве
Этопозид-Эбеве
5-Фторурацил-Эбеве
Трамадол

Европейское производство

Удобные и экономичные флаконы

Широкий ассортимент готовых к применению цитостатиков для химиотерапии

The comprehensive approach

Рег. номера: П N 015197/01, ЛСР-009900/08, П N 015975/01, П N 016185/01, П N 015232/01, П N 014892/01-2003, П N 014892/03-2003, П N 015198/01-2003, П N015106-01-2003, П N 015188/01-2003, П N 015975/01, П N 015174/01-2003, П N 015225/02, П N 015225/03, П N 015225/01, ЛСР-009900/08, П N 015197/01, П N 015178/01-2003, П N 015731/04

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

123317 Москва
Пресненская набережная,
д. 8, строение 1
комплекс «Город столиц»
8-9 этаж, ЗАО «Сандоз»
тел.: (495) 660-75-09

a Novartis company

Кансидас®

каспофунгин

Доказательство. Опыт. Уверенность.

Показания к применению

- Эмпирическая терапия у пациентов с фебрильной нейтропенией при подозрении на грибковую инфекцию
- Инвазивный кандидоз (в т.ч. кандидемия) у пациентов с нейтропенией и без неё
- Инвазивный аспергиллёз у пациентов, рефрактерных к другой терапии или не переносящих её
- Эзофагеальный кандидоз
- Орофарингеальный кандидоз

Стандарт эмпирической противогрибковой терапии[1-3]

Противопоказания
- Повышенная чувствительность к любому из компонентов препарата
- Детский возраст до 3 месяцев

Препарат содержит сахарозу, поэтому пациенты с редкими наследственными проблемами непереносимости фруктозы или сахарозо-изомальтазной недостаточностью не должны принимать данный препарат.

С осторожностью
- Одновременное применение с циклоспорином
- Пациенты с умеренной печёночной недостаточностью (от 7 до 9 баллов по шкале Чайлд-Пью)

Нет достаточных данных об использовании препарата КАНСИДАС® у детей и взрослых при эндокардите, остеомиелите и менингите, вызванных патогенными штаммами грибов рода *Candida*, а также у детей в качестве терапии первой линии при инвазивном аспергиллёзе.

Побочное действие

Выявленные побочные реакции, связанные с применением препарата, обычно имели лёгкое течение и редко требовали отмены препарата как у взрослых, так и у детей.

Распространённые побочные эффекты (ПЭ): очень часто (> 1/10), часто (> 1/100, но < 1/10) и нечасто (> 1/1000, но < 1/100):

У ВЗРОСЛЫХ:
- Системные ПЭ: часто – лихорадка, головная боль, ощущение озноба
- Со стороны желудочно-кишечного тракта: часто – тошнота, диарея, рвота, боль в животе
- Со стороны кроветворной и лимфатической системы: часто – анемия
- Со стороны сердечно-сосудистой системы: часто – тахикардия
- Со стороны периферических сосудов: часто – флебит/тромбофлебит, периферические отёки, венозные постинфузионные осложнения, «приливы»
- Со стороны опорно-двигательного аппарата: часто – артралгия
- Со стороны органов дыхания: часто – одышка
- Со стороны кожи и подкожно-жировой клетчатки: сыпь, зуд (в том числе в месте введения препарата), повышенная потливость
- Со стороны лабораторных показателей: часто – гипоальбуминемия, гипопротеинемия, гипокалиемия, гипонатриемия, гипомагниемия, гипокальциемия, лейкопения, нейтропения, тромбоцитопения, эозинофилия, снижение гемоглобина и гематокрита, увеличение частичного протромбинового времени, протеинурия, лейкоцитурия, микрогематурия, повышение в сыворотке крови активности АСТ, АЛТ, ЩФ, прямого и общего билирубина, концентрации креатинина.

У ДЕТЕЙ:
- Системные ПЭ: очень часто – лихорадка, часто – головная боль, ощущение озноба, гистаминопосредованные реакции (т.е. аллергические и анафилактические реакции)
- Со стороны сердечно-сосудистой системы: часто – тахикардия, снижение артериального давления, «приливы», периферические отёки
- Со стороны органов пищеварения: часто – нарушение функции печени
- Со стороны кожи и подкожно-жировой клетчатки: часто – сыпь, зуд (в том числе в месте введения препарата)
- Со стороны лабораторных показателей: часто – гипокалиемия, гипомагниемия, гиперкальциемия, эозинофилия, повышение в сыворотке крови активности аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), концентрации глюкозы и фосфора, снижение концентрации фосфора в сыворотке крови
- Местные реакции: часто – боль в месте введения катетера, гистаминопосредованные реакции в месте введения – припухлость.

[1] ECIL-3 (3rd European Conference on Infections in Leukemia) Guidelines, Empirical Antifungal Therapy, http://www.eortc.be/home/IDG/ECIL.html, http://www.ichs.org/ecilslides.htm, слайд 53

[2] Pappas PG, et al; for the Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis:2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(5):503-535

[3] Российские национальные рекомендации «Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии» / Ответственный редактор Климко Н.Н. – М.: Боргес, 2010

MSD

Адрес: ООО «МСД Фармасьютикалс»,
Россия, 119049, Москва, ул. Павловская, 7, БЦ «Павловский»
Тел.: +7 (495) 916 71 00; факс: +7 (495) 916 70 94;
www.merck.com

04-2013-CAN-04-2011-RUS-005-JA

Перед применением препарата, пожалуйста, ознакомьтесь с полной инструкцией по применению.

Компания MSD не рекомендует применять препараты компании способами, отличными от описанных в инструкции по применению.

Комплексное решение проблемы анемии!

МНН: **эпоэтин альфа** + МНН: **железа [III] гидроксид сахарозный комплекс**

Эральфон®
эпоэтин альфа
Эра новой жизни!

Ликферр100®
Настоящее железо!

Препарат рекомбинантного эритропоэтина человека

Средство для профилактики и лечения анемии:

- профилактика и лечение анемий у больных с солидными опухолями, анемия у которых стала следствием проведения противоопухолевой терапии

- профилактика и лечение анемий у больных с миеломной болезнью, неходжскинскими лимфомами низкой степени злокачественности, хроническим лимфолейкозом

Эффективное средство для лечения анемии:

- железодефицитные состояния (в т.ч. железодефицитная и острая постгеморрагическая анемия) у больных при необходимости быстрого восполнения железа
- у больных, которые не переносят пероральные препараты железа
- наличие заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), при которых пероральные препараты железа не могут использоваться

Регистрационное удостоверение: ЛСР 006663/08 от 15.08.08; ЛСР 000971/10 от 15.02.10; ЛСР 008793/10 от 26.08.2010

Регистрационное удостоверение: ЛСР-008006/10 от 12.08.2010

сотекс

ИД «АБВ-пресс» представляет

Сепсис в торакоабдоминальной онкохирургии

Формат книги: 170 x 220 мм.
Бумага: мелованная матовая.
Объем: 220 страниц.
Переплет: мягкий.

Автор: И.В. Нехаев

Монография посвящена проблеме сепсиса в торакоабдоминальной онкологии. В работе дано определение сепсиса, отражены его основные эпидемиологические показатели, разобраны этиологические причины и факторы риска развития сепсиса у оперированных больных с опухолями торакоабдоминальной зоны. В моног рафии представлена оригинальная концепция патогенеза сепсиса и выделены основные различия отдельных звеньев и последовательности цепи патологических событий, ведущих к развит ию тяжелого сепсиса и септического шока. Автором подробно описана к линическая картина, предложены диагностический алгоритм и принципы лечения сепсиса, а также отмечены основные причины смерти и факторы прогноза у больных сепсисом, развившимся после хирургического вмешательства.

Как приобрести книгу?

Для того, чтобы получить книгу, вам необходимо отправить заполненную анкету на ее дос тавку, а также квитанцию с отметкой банка об оплате по факсу +7 (499) 929-96-19 или по e-mail: book@abvpress.ru., либо отправить в редакцию по адресу: г. Москва, Каширское шоссе, дом 24, строение 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж, Издательский дом «АБВ-пресс».
Стоимость книги указана без учета доставки.
Анкету на доставку книги вы можете распечатать с сайта ИД «АБВ-пресс»: **www.abvpress.ru**

Извещение	Форма № ПД-4 ООО «Издательский Дом «АБВ-пресс»» (наименование получателя платежа и ИНН) ИНН/КПП 7724705329 / 772401001 Р/с 40702810400003653001 ООО КБ «НЭКЛИС-БАНК» Москва (номер счета получателя платежа) БИК 044583679 (наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810700000000679 Плательщик (ФИО) Адрес (с индексом) Книга И.В. Нехаева – «Сепсис в торакоабдоминальной онкохирургии» (наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа: 350 руб. 00 коп. Плательщик (подпись) _____
Кассир	
Квитанция	Форма № ПД-4 ООО «Издательский Дом «АБВ-пресс»» (наименование получателя платежа и ИНН) ИНН/КПП 7724705329 / 772401001 Р/с 40702810400003653001 ООО КБ «НЭКЛИС-БАНК» Москва (номер счета получателя платежа) БИК 044583679 (наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810700000000679 Плательщик (ФИО) Адрес (с индексом) Книга И.В. Нехаева – «Сепсис в торакоабдоминальной онкохирургии» (наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа: 350 руб. 00 коп. Плательщик (подпись) _____
Кассир	

Реклама.

ПЕРВАЯ И ПОСЛЕДУЮЩИЕ ЛИНИИ ТЕРАПИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

ДВИЖЕНИЕ В НОВОЕ ИЗМЕРЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Требуйте большего. В комбинации с препаратом ВЕЛКЕЙД® у 30% пациентов был зарегистрирован полный ответ на терапию по сравнению с 4% при применении схемы мелфалан-преднизон ($p<0,001$)[1,2], применение препарата ВЕЛКЕЙД® в комбинации с мелфаланом и преднизоном продемонстрировало значительно более высокую общую выживаемость – 68,5% через 3 года (по сравнению с 54% в группе МП)[3]

ВЕЛКЕЙД®
(бортезомиб)
ВПЕРЕД К ЖИЗНИ

ID: VEL/MMa/ADS/Jun2011/ Rus179
Полная информация о препарате содержится в инструкции по медицинскому применению РУ № ЛС-000654 от 06.08.2010
По всем вопросам, связанным с применением препарата, обращаться по адресу:
121614, г. Москва, ул. Крылатская, д.17, корп.2, тел. 8 (495) 755-83-57, факс 8 (495) 755-83-58;
Бесплатный номер для России 8-800-700-88-10 www.janssencilag.ru

janssen
PHARMACEUTICAL COMPANIES OF Johnson&Johnson

1. San Miguel et al. New Engl J Med 2008;359:906-917.
2. Velcade® Summary of Product Characteristics.
3. Mateos et al. J Clin Oncol. 2010 Apr 5. [Epub ahead of print].

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 **Е.В. Романова**
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. № 3. 1–96
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2011

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии
ООО «Графика»

Тираж 3000 экз.

3

2011

СОДЕРЖАНИЕ

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Э.Г. Бойченко, Э.М. Петрова, И.А. Гарбузова, Е.А. Никитина, Л.М. Щугарева, Т.Н. Кулакова, Т.А. Макарова, М.Б. Белогурова, Г.Г. Радулеску, Т.Д. Викторович, Э.Д. Чавпецова, Л.И. Шац, Г.И. Улейская, И.С. Мартынкевич, Е.Е. Зуева
Сравнительная эффективность терапиии острого лимфобластного лейкоза у детей в Санкт-Петербурге с использованием двух версий протокола COALL-92 8

Т.Д. Луцкая, А.К. Голенков, Т.А. Митина, И.В. Буравцова, Г.А. Дудина, Л.Л. Высоцкая, Е.В. Трифонова, Е.В. Катаева, О.В. Москалец, В.В. Яздовский
Эффективность ритуксимабсодержащей программы R-CHOP при лечении диффузной В-крупноклеточной лимфомы 18

И.И. Калинина, Д.Д. Байдильдина, Е.В. Сунцова, О.В. Горонкова, Л.А. Хачатрян, У.Н. Петрова, Г.Г. Солопова, В.В. Синицына, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова, Г.А. Клясова, А.А. Масчан
Результаты терапии кандидемии у детей с различными гематологическими и онкологическими заболеваниями в условиях одного центра 24

И.Н. Назарова, М.Н. Протасова, Н.А. Никишина
***Herpes zoster* у больных множественной миеломой на фоне лечения бортезомибом 35**

Н.А. Романенко, К.М. Абдулкадыров
Патогенетическая коррекция анемии эритропоэзстимулирующими препаратами у больных лимфопролиферативными заболеваниями (обзор литературы) 39

С.В. Миненко, Ю.В. Ларина, В.В. Птушкин, Н.К. Хуажева, В.В. Лунин, Т.Н. Пересторонина, Э.Р. Биячуев, А.В. Пшонкин, С.В. Семочкин, Ж.В. Шейх, В.Н. Яковлев, В.Г. Алексеев
Лечение лимфом центральной нервной системы — обзор литературы и собственные данные. 50

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Г.А. Цаур, А.М. Попов, О.В. Алейникова, Э.Г. Бойченко, Т.Ю. Вержбицкая, Е.В. Волочник, А.С. Иванова, О.В. Каленник, С.Ю. Ковалев, К.Л. Кондратчик, А.М. Кустанович, Е.С. Лапотентова, Д.В. Литвинов, И.С. Мартынкевич, Н.В. Мякова, Т.В. Наседкина, В.А. Овсепян, Ю.В. Ольшанская , О.М. Плеханова, А.В. Попа, Т.О. Ригер, Л.И. Савельев, О.В. Стренева, М.В. Стригалева, И.В. Шмунк, Е.В. Шориков, Л.Г. Фечина
Характеристика перестроек 11q23 *(MLL)* у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом 57

П.М. Кондратовский, А.И. Дубиков, А.Ю. Дорошевская
Нарушения в системе белка p53 и их влияние на патогенез хронических лимфопролиферативных заболеваний. 65

А.В. Шишкин, Н.Г. Овчинина, С.С. Бессмельцев
Оценка возможности использования центрифугирования для ускоренного проведения анализа с использованием иммунологических биочипов для исследования клеток крови 76

ЛЕКЦИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Д.А. Домнинский
Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Гемобластозы миелоидного происхождения (лекция № 3) 82

КОНФЕРЕНЦИИ, СИМПОЗИУМЫ, СОВЕЩАНИЯ

Д.Ю. Качанов
Информационное сообщение о проведении VII Российского симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» и II межрегионального совещания Национального общества детских гематологов и онкологов (НОДГО). 94

CONTENTS

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

E.G. Boychenko, E.M. Petrova, I.A.Garbuzova, E.A. Nikitina, L.M. Shchugareva, T.N. Kulakova, T.A. Makarova, M.B. Belogurova, G.G. Radulesku, T.D. Viktorovich, E.D. Chavpetsova, L.I. Shats, G.I. Uleyskaya, I.S. Martynkevich, E.E. Zueva
Comparative efficacy of acute lymphoblastic leukemia treatment of children in St.-Petersburg using two COALL-92 version 8

T.D. Lutskaya, A.K. Golenkov, T.A. Mitina, I.V. Buravtsova, G.A. Dudina, L.L. Visotskaya, E.V. Trifonova, E.V. Kataeva, O.V. Moskalets, V.V. Yazdovskiy
The efficacy of therapy with rituximab (R-CHOP) in patients with diffuse large cells lymphoma 18

I.I. Kalinina, D.D. Baydildina, E.V. Suntsova, O.V. Goronkova, L.A. Khachatryan, U.N. Petrova, G.G. Solopova, V.V. Sinitsina, G.A. Novichkova, M.A. Maschan, D.V. Litvinov, N.V. Myakova, G.A. Klyasova, A.A. Maschan
Results of candidemia treatment in children with hematologic malignancies: single center experience 24

I.N. Nazarova, M.N. Protasova, N.A. Nikishina
***Herpes zoster* in multiple myeloma patients during bortezomib treatment** 35

N.A. Romanenko, K.M. Abdulkadyrov
Patogenetic correction of anemia with erythropoiesis-stimulating agents in lymphoproliferative disorders (literature review) 39

S.V. Minenko, Yu.V. Larina, V.V. Ptushkin, N.K. Khuazheva, V.V. Lunin, T.N. Perestoronina, E.R. Biyachuev, A.V. Pshonkin, S.V. Semochkin, Zh.V. Sheikh, V.N. Yakovlev, V.G. Alekseev
Treatment of central nervous system lymphoma – literature review and own experiences 50

BASIC RESEARCH

G.A. Tsaur, A.M. Popov, O.V. Aleinikova, E.G. Boychenko, T. Yu. Verzbitskaya, E.V. Volochnik, A.S. Ivanova, O.V. Kalennik, S. Yu. Kovalev, K.L. Kondtratchik, A.M. Kustanovich, E.S. Lapotentova, D.V. Litvinov, I.S. Martynkevich, N.V. Myakova, T.V. Nasedkina, V.A. Ovsepyan, Yu.V. Olshanskaya, O.M. Plehanova, A.V. Popa, T.O. Riger, L.I. Savelyev, O.V. Streneva, M.V. Strigaleva, I.V. Shmunk, E.V. Shorikov, L.G. Fechina
Detection of 11q23 (MLL) rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia 57

P.M. Kondratovskiy, A.I. Dubikov, A.Yu. Doroshevskaya
P53 pathway changes and their influence on chronic lymphoproliferative diseases pathogenesis 65

A.V. Shishkin, N.G. Ovchinina, S.S. Bessmeltsev
Assessment of centrifugation using for accelerated immunological microarray analysis for blood cells investigation 76

LECTURES

D.A. Domninsky
Molecular mechanisms of leukaemogenesis. Myeloid hematological malignancies 82

CONFERENCES, SYMPOSIUMS, MEETINGS

D.Yu. Kachanov
VII Russian Symposium "Biological basis for the therapy of oncological and hematological diseases" and II Interregional Meeting of the National Society of Pediatric Hematology and Oncology 94

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ 3'2011

Сравнительная эффективность терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в Санкт-Петербурге с использованием двух версий протокола COALL-92

Э.Г. Бойченко[1], Э.М. Петрова[1], И.А. Гарбузова[1], Е.А. Никитина[1], Л.М. Щугарева[1], Т.Н. Кулакова[1], Т.А. Макарова[1], М.Б. Белогурова[2], Г.Г. Радулеску[2], Т.Д. Викторович[2], Э.Д. Чавпецова[2], Л.И. Шац[2], Г.И. Улейская[2], И.С. Мартынкевич[3], Е.Е. Зуева[4]

[1]Отделение химиотерапии лейкозов Детской городской больницы № 1, Санкт-Петербург;
[2]отделение детской онкологии и гематологии Городской больницы № 31, Санкт-Петербург;
[3]Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург;
[4]Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Контакты: *Эльмира Госмановна Бойченко boychenko-elmira@yandex.ru*

В статье представлены результаты лечения детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в специализированных стационарах Санкт-Петербурга по 2 модифицированным версиям немецкой программы CO ALL-92 за период с 01.01.1993 по 01.01.2007. В исследование было включено 438 первичных пациентов с ОЛЛ в возрасте от 4 мес до 17 лет 4 мес. Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании международных критериев. С учетом прогностических факторов пациенты распределялись на 2 группы риска, что определяло интенсивность проводимой химиотерапии. Общая продолжительность лечения в обеих группах риска составляла 2 года и предполагала проведение фазы интенсивной химиотерапии в течение 5,5–8 мес с последующим переводом на поддерживающую терапию. Проведен сравнительный анализ результатов лечения детей с ОЛЛ в соответствии с 2 версиями модифицированного немецкого протокола COALL-92.

Ключевые слова: *острый лимфобластный лейкоз, дети, интенсивная химиотерапия*

Comparative efficacy of acute lymphoblastic leukemia treatment of children in St.-Petersburg using two COALL-92 versions

E.G. Boychenko[1], E.M. Petrova[1], I.A. Garbuzova[1], E.A. Nikitina[1], L.M. Shchugareva[1], T.N. Kulakova[1], T.A. Makarova[1], M.B. Belogurova[2], G.G. Radulesku[2], T.D. Viktorovich[2], E.D. Chavpetsova[2], L.I. Shats[2], G.I. Uleyskaya[2], I.S. Martynkevich[3], E.E. Zueva[4]

[1]Municipal Children Hospital № 1, St.-Petersburg;
[2]Municipal Clinical Hospital № 31, St.-Petersburg;
[3]Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg;
[4]Saint-Petersburg Pavlov State Medical University

Treatment results in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treating in St.-Petersburg hospitals according to two modified version of German protocol COALL-92 from 01.01.1993 to 01.01.2007 are presented. 438 primary A LL patients aged from 4 months to 17 year s have been included in the study . ALL diagnosed according to international criteria. Based on prognostic factors patients were a llocated to one of two risk groups, which determined therapy intensity. The total treatment duration in both groups w as 2 years and consisted of 5.5–8 months intensive phase with subsequent maintenance therapy . A comparative treatment results analysis in children with A LL according to two modified versions of COALL-92 is presented.

Key words: *acute lymphoblastic leukemia, children, intensive chemotherapy*

Введение

В начале 90-х годов в России началось активное внедрение принятых на Западе методов терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). К этому времени в Санкт-Петербурге процент детей с 5-летней ремиссией ОЛЛ составлял от 3,8 до 19,6% в зависимости от характера проводимого лечения [1]. На развитие интенсивной химиотерапии (ХТ) в Санкт-Петербурге, благодаря сотрудничеству между Медицинскими университетами Гамбурга и Санкт-Петербурга, главное влияние оказала терапевтическая программа немецкой кооперативной исследовательской группы по лечению ОЛЛ у детей (CO ALL). Группа COALL была основана в 1980 г. и является частью немецкого Общества детской онкологии и гематологии. В ее состав входят 24 детские онкогематологические клиники на территории Германии. К началу 90-х годов группой COALL было завершено 3 клинических исследования (COALL-82, 85, 89) и начата работа над протоколом COALL-92.

На основании серии проведенных исследований, в которые был включен 1191 пациент в возрасте до 18 лет, были сделаны следующие принципиальные выводы [2–6]:

1. Индукционная терапия без L-аспарагиназы (L-asp) настолько же эффективна и при этом менее

опасна, чем 4-компонентные схемы терапии индукции.

2. Для большинства больных, за исключением пациентов с Т-клеточным иммунофенотипом и исходным уровнем лейкоцитов $\geq 50{,}0 \times 10^9$/л, лечение метотрексатом (МТХ) в промежуточной дозе и множественные интратекальные (и/т) введения МТХ являются настолько же эффективными в плане контроля над нейролейкемией, как и облучение центральной нервной системы (ЦНС).

3. Использование 6-тиогуанина (6-ТГ) для поддерживающей терапии ОЛЛ не имеет преимуществ по сравнению со стандартной терапией 6-меркаптопурином, поскольку 6-ТГ отличается высокой гематологической токсичностью.

4. Двадцатичетырехчасовая инфузия да унорубицина с целью снижения его кардиотоксичности оказывает такой же цитотоксический эффект на лейкемические клетки, как одночасовая, а ответ на даунорубицин, введенный в течение первой недели, имеет прогностическую значимость.

В 1992 г. в сотрудничестве с Университетской клиникой детской гематологии и онкологии Г амбурга и при непосредственном участии руководителя группы COALL Гритты Янка-Шауб с целью улучшения результатов лечения ОЛЛ у детей был разработан специальный протокол для Санкт-Петербурга, получивший название РЕСО-92 (Петербург-COALL-92). В оригинальный протокол COALL-92 были внесены модификации, адаптирующие эту лечебную программу для применения в условиях российских клиник, в частности, были уменьшены разовые дозы L-asp и цитозара.

Внедрение протокола РЕСО-92 (РЕ СО) началось в сентябре 1992 г. В последующем, по мере накопления клинического опыта проведения интенсивной ХТ и сопроводительного лечения, а также с учетом выводов, сделанных на основании комплексного анализа результатов терапии по протоколу РЕСО, в январе 1999 г. был осуществлен переход на протокол СО ALL-92-Санкт-Петербург (COALL), который явился 2-й версией немецкой лечебной программы COALL-92, созданной для Санкт-Петербурга, и был более приближен к оригинальному протоколу.

За 15 лет накоплен большой клинический опыт проведения специфической ХТ и сопроводительного лечения, анализ которого необходим для оптимизации терапии ОЛЛ у детей в России. В статье представлены результаты лечения ОЛЛ в соответствии с двумя модифицированными версиями немецкого протокола COALL-92 за период с 01.01.1993 по 01.01.2007.

Пациенты

Набор первичных пациентов. В настоящей работе проанализированы первичные больные ОЛЛ, поступавшие в Детскую городскую больницу № 1 Санкт-Петербурга (отделение ХТ лейкозов (зав. отделением Э.М. Петрова, Э.Г. Бойченко)) и Городскую больницу № 31 Санкт-Петербурга (отделение детской онкологии и гематологии (зав. отделением М.Б. Белогурова)), с 01.01.1993 по 01.01.2007. К категории первичных были отнесены пациенты, которые не получали ХТ до начала специфического лечения, либо получили лечение преднизолоном длительностью не более 7 дней, поскольку такая терапия могла быть приравнена к циторедуктивной предварительной фазе; диагноз ОЛЛ в этом случае был подтвержден данными цитохимии и иммунологии. Всего в вышеперечисленных клиниках в рамках данного исследования было зарегистрировано 474 первичных пациента с ОЛЛ в возрасте от 4 мес до 17 лет 4 мес.

Критерии включения. Пациенты включались в исследование, если они соответствовали следующим условиям:

- возраст на момент постановки диагноза — от 0 до 18 лет;
- начало индукционной терапии — внутри временного промежутка проведения исследования;
- диагноз ОЛЛ установлен на основании клинических данных, анализов периферической крови, результатов морфологического, цитохимического и иммунологического исследований клеток костного мозга;
- наличие информированного согласия родителей (опекунов) пациента на лечение.

Больные не включались в исследование, если был положительным хотя бы один из перечисленных ниже признаков:

- ОЛЛ — вторая злокачественная опухоль;
- В-ОЛЛ (пациенты с морфологическим вариантом FAB L3 и иммунофенотипом зрелых В-клеток);
- тяжелое сопутствующее заболевание, не позволяющее проводить ХТ по протоколу (болезнь Да уна, многочисленные пороки развития, порок сердца, болезни обмена веществ и др.);
- отклонения от протокола, не обусловленные побочными действиями лечения и/или осложнениями течения заболевания;
- смерть до начала терапии по протоколу;
- отказ родителей от терапии по протоколу;
- отсутствие ремиссии на 56-й день от начала терапии индукции (non-responder).

Тридцать шесть первичных пациентов не были включены в анализ, поскольку не соответствовали критериям включения. В табл. 1 представлены результаты анализа соответствия первичных пациентов вышеперечисленным требованиям. На основании проведенного анализа в исследование включено 438 первичных пациентов с ОЛЛ.

Клинические группы, проанализированные в данной работе:

1. Для анализа результатов лечения по протоколу РЕСО были взяты все первичные больные ($n = 214$), поступившие в вышеуказанные клиники в период с 01.01.1993 по 31.12.1998 и получавшие лечение в соответствии с данным протоколом.

Таблица 1. *Анализ соответствия первичных пациентов критериям включения*

	PECO	COALL
Общее число первичных пациентов с ОЛЛ	233	241
Исключены из анализа:		
Несоответствие критериям включения в исследование	–	2
Смерть до начала терапии по протоколу	–	1
Тяжелые сопутствующие заболевания	2	4
Отказ родителей от лечения	4	2
Изменения в терапии индукции	5	4
Неоправданный перевод в группу высокого риска	3	–
В-ОЛЛ	3	1
Серьезные отклонения от протокола	2	1
Перевод в другие клиники, не входящие в исследование	–	2
Общее число пациентов, включенных в исследование	**214**	**224**

2. Для анализа результатов лечения по протоколу COALL были взяты все первичные больные (n = 224), поступившие в вышеуказанные клиники в период с 01.01.1999 по 01.01.2007 и получавшие лечение в соответствии с данным протоколом.

Описание программы терапии острого лимфобластного лейкоза у детей PECO-92 (PECO)

Терапевтическая программа PECO была разработана в июне—августе 1992 г. на основе немецкого протокола COALL-92 под руководством профессора Университетской клиники Гамбурга Г. Янка-Шауб.

Важными отличиями от оригинального протокола COALL-92 были следующие:

- замена преднизолона на дексаметазон в фазе индукции ремиссии;
- уменьшение разовой дозы внутривенно вводимой L-asp с 45 000 до 25 000 ЕД/м^2;
- отмена приема 6-меркаптопурина (6-МП) на этапе консолидации у пациентов группы высокого риска (HR);
- отмена 4-го введения MTX в промежуточно-высокой дозе (ImHD MTX, 1 г/м^2) у больных группы HR на этапе консолидации;
- уменьшение дозы цитарабина на этапе консолидации с 3 до 2 г/м^2;
- укорочение реиндукции за счет исключения блоков терапии с использованием циклофосфана и цитарабина;
- исключение и/т введений MTX у больных группы низкого риска (LR) на этапе поддерживающей терапии.

С учетом прогностически значимых факторов риска пациенты были разделены на группы низкого (LR) и высокого риска (HR). К неблагоприятным факторам, каждый из которых имел самостоятельное прогностическое значение, относились следующие:

- исходный уровень лейкоцитов ≥ 25,0 × 10^9/л;
- первичное вовлечение средостения и/или ЦНС;
- Т-клеточный иммунологический вариант;
- наличие филадельфийской хромосомы;
- отсутствие костномозговой ремиссии на 28-й день от начала терапии индукции.

Общая продолжительность лечения в обеих группах составляла 2 года и предполагала проведение интенсивной фазы в течение 4,5–6 мес с последующим переводом на поддерживающую терапию. На 28-й день от начала терапии производилась контрольная пункция костного мозга.

Интенсивная фаза состояла из 4 этапов: индукция, консолидация, этап профилактики нейролейкемии

Таблица 2. *Критерии стратификации на группы риска в зависимости от протокола*

Факторы риска	Низкий риск		Высокий риск	
	PECO	COALL	PECO	COALL
Инициальный лейкоцитоз	< 25 000	< 25 000	≥ 25 000	≥ 25 000
Иммунофенотип	non-Т-ОЛЛ	non-Т-ОЛЛ	Т-ОЛЛ	Т-ОЛЛ и pre-pre-В-ОЛЛ
Возраст	Не учитывался	> 1 года , но < 10 лет	Не учитывался	≥ **10 лет**
Поражение ЦНС	Нет	Нет	Определяется	Определяется
Вовлечение средостения	Нет	Нет	Определяется	Определяется
t(4;11)	Не учитывалась	Нет	Не учитывалась	Определяется
t(9;22)	Нет	Нет	Определяется	Определяется
Ремиссия на 28-й день от начала индукции	Да	Да	Нет	Нет

Таблица 3. *Протоколы PECO и COALL: индукция и фаза интенсивной ХТ*

Протокол	PECO				COALL			
Группа риска	Низкий		Высокий		Низкий		Высокий	
Препарат	Доза/м²	Путь; неделя	Доза/м²	Путь; неделя	Доза/м²	Путь; неделя	Доза/м²	Путь; неделя
	Индукция				Индукция			
Преднизолон			60 мг	PO ежедневно; (-1)			60 мг	PO ежедневно; (-1)
Дексаметазон	6 мг	PO ежедневно; 1–4	6 мг	PO ежедневно; 1–4	6 мг	PO ежедневно; 1–4	6 мг	PO ежедневно; 1–4
Винкристин	1,5 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	1,5 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	1,5 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	1,5 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4
Даунорубицин	36 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	36 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	36 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4	36 мг	в/в еженедельно № 4; 1–4
Ранняя интенсификация	**Консолидация**				**Консолидация**			
Меркаптопурин	100 мг	PO ежедневно; 5, 7, 9		Не применялся	100 мг	PO ежедневно; 5, 7, 12	100 мг	PO ежедневно; 7, 9, 11
HDMTX	1000 мг	в/в за 24 ч № 3; 5, 7, 9	1000 мг²	в/в за 24 ч № 3; 5 7, 9	1000 мг	в/в за 24 ч № 3; 5, 7, 12	1000 мг	в/в за 24 ч № 4; 5, 7, 9, 11
L-asp	25 000 ЕД	в/в № 4; 5, 7, 9, 11	25 000 ЕД	в/в № 5; 5, 7, 9, 11, 14	25 000 ЕД	в/в № 3; 5, 9, 12	25 000 ЕД	в/в № 4; 5, 7, 13, 16
Цитарабин					300 мг	в/в № 1; 7	300 мг	в/в № 2; 9, 11
VM-26					165 мг	в/в № 1; 7	165 мг	в/в № 2; 9, 11
Циклофосфамид			1000 мг	в/в № 2; 5, 7			900 мг	в/в № 2; 5, 7
HDAra-C	8000 мг	в/в № 1; 11	8 000 мг	в/в № 2; 11, 14	8000 мг	в/в № 1; 9	8 000 мг	в/в № 2; 13, 16
	Пресимптоматическая терапия ЦНС				**Пресимптоматическая терапия ЦНС**			
Меркаптопурин	50 мг	PO ежедневно; 14–17	50 мг	PO ежедневно; 15–20	50 мг	PO ежедневно; 14–17	50 мг	PO ежедневно; 19–22
Метотрексат	Возр.	э/л еженедельно; № 4	Возр.	э/л еженедельно; № 4	Возр.	э/л еженедельно; № 4	Возр.	э/л еженедельно; № 4
Отсроченная интенсификация	**Реиндукция**				**Реиндукция**			
Меркаптопурин					100 мг	PO ежедневно; 20	100 мг	PO ежедневно; 28, 30
L-asp	25 000 ЕД	в/в № 1; 19	25 000 ЕД	в/в № 2; 22, 25	25 000 ЕД	в/в № 1; 19	25 000 ЕД	в/в № 2; 24, 27
Доксорубицин	30 мг	в/в № 2; 18, 19	30 мг	в/в № 4; 21, 22, 24, 25	30 мг	в/в № 2; 18, 19	30 мг	в/в № 4; 23, 24, 26, 27
Дексаметазон	6 мг	PO ежедневно; 18	10 мг	PO ежедневно; 21, 24	10 мг	PO ежедневно; 18	10 мг	PO ежедневно; 23, 26
Винкристин	1,5 мг	в/в № 2; 18, 19	1,5 мг	в/в № 4; 21, 22, 24, 25	1,5 мг	в/в № 2; 18, 19	1,5 мг	в/в № 4; 23, 24, 26, 27
Цитарабин					90 мг	в/в 1 блок по 4 дня; 20	90 мг	в/в 2 блока по 4 дня; 28, 30
Циклофосфамид					900 мг	в/в № 1; 20	900 мг	в/в № 2; 28, 30

Примечание (здесь и далее). *PO — прием препарата через рот (per os), в/в — внутривенное введение препарата.*

Таблица 4. *Протоколы PECO и COALL: профилактика нейролейкемии*

Протокол	PECO		COALL	
Интратекальная терапия				
Этап лечения	***N***	**Режим введения**	***N***	**Режим введения**
Индукция	1	День 1, MTX	1	День 1, MTX
Интенсивная фаза	9	MTX, недели Низкий риск: 5, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 20 Высокий риск: 5, 7, 9, 17, 18, 19, 20, 21, 24	11	MTX, недели Низкий риск: 5, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22 Высокий риск: 5, 7, 9, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 28
Поддерживающая терапия	0		6	По 2 MTX и/т через 3, 6, 9 мес от начала ПТ
Всего	10		18	
Краниальное облучение				
	18 Гр (41 % больных)		12 Гр (25 % больных)	

и реиндукция. На протяжении интенсивной фазы пациенты обеих групп риска получали по 10 и/т введений MTX. Этап профилактики нейролейкемии (отдельная фаза между консолидацией и реиндукцией, которая состояла только из 4 еженедельных Lp на фоне 6-МП) предусматривал проведение у всех пациентов группы высокого риска краниального облучения в суммарной очаговой дозе (СОД) 18 Гр.

Описание программы терапии острого лимфобластного лейкоза у детей COALL-92-Санкт-Петербург (COALL)

С 01.01.1999 началось использование следующей версии протокола COALL-92, которая получила название COALL-92-Санкт-Петербург. В ней, в отличие от оригинального протокола COALL-92, были сохранены некоторые элементы терапии, показавшие свою эффективность в ходе применения протокола PECO:

- замена преднизолона на дексаметазон в фазе индукции ремиссии;
- уменьшение дозы L-asp с 45 000 до 25 000 Ед/м^2;
- уменьшение разовой дозы цитарабина на этапе консолидации с 3 до 2 г/м^2.

Распределение больных на группы риска проводилось с учетом ранее принятых критериев, однако было введено 3 дополнительных критерия неблагоприятного прогноза:

- pre-pre-B-клеточный иммунологический вариант;
- возраст пациента ≥ 10 лет;
- выявление t(4;11) при цитогенетическом исследовании.

Критерии стратификации пациентов на группы риска представлены в табл. 2.

В дизайн протокола COALL, по сравнению с PECO, были добавлены следующие терапевтические элементы.

Для пациентов группы LR была усилена терапия реиндукции путем добавления циклофосфамида в дозе 900 мг/м^2 с четырьмя последующими введениями цитарабина в дозе 90 мг/м^2 и одновременным ежедневным приемом 6-МП (100 мг/м^2) в течение недели; кроме того, на этапе поддерживающей терапии была усилена профилактическая терапия ЦНС за счет дополнительных люмбальных пункций.

- Терапия детей группы HR на этапе консолидации была усилена дополнительным четвертым блоком с введением ImHD MTX (1 г/м^2), вумона (VM-26, 165 мг/м^2) и цитарабина (300 мг/м^2) одновременно с ежедневным приемом 6-МП в течение недели (100 мг/м^2); также ежедневным приемом 6-МП (100 мг/м^2) в течение недели были усилены 2-е и 3-е введения HD MTX. Этап реиндукции был удлинен за счет 2 добавочных введений винкристина и адриабластина с L-asp и дополнительного блока с циклофосфамидом и цитарабином.
- Были редуцированы показания к проведению профилактического краниального облучения, а также его доза: облучение черепа в СОД 12 Гр проводилось только детям с исходным гиперлейкоцитозом (≥ 100,0 × 10^9/л) и Т-клеточным иммунофенотипом (при любом исходном уровне лейкоцитов).
- Пациенты обеих групп риска, не подвергшиеся краниальному облучению, на этапе поддерживающей терапии получили по 6 люмбальных пункций (через 3, 6 и 9 мес от начала поддерживающей терапии, по 2 люмбальных пункции с промежутком 2 нед) с и/т введением MTX. Все дети на протяжении фазы интенсивной ХТ с целью профилактики нейролейкемии получили по 12 и/т введений MTX.

Поддерживающая терапия в обеих группах состояла из ежедневного приема 6-МП (50 мг/м^2, *per os*) и еженедельного приема MTX (20 мг/м^2, *per os*) с обязательной коррекцией дозы в зависимости от уровня лейкоцитов.

Терапевтические планы протоколов PECO и COALL с характеристикой этапов интенсивной и поддерживаю-

Таблица 5. *Протоколы PECO и COALL: поддерживающая терапия*

Препарат	PECO	COALL
	Доза/м² (путь введения, кратность)	
Меркаптопурин	60 мг (PO, ежедневно)	50 мг (PO, ежедневно)
МТХ	25 мг (PO, еженедельно)	20 мг (PO, еженедельно)

щей терапии, а также особенностей ЦНС-направленного лечения суммированы и представлены в табл. 3–5.

Диагностика и определение событий

Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании международных критериев с оценкой клинических данных, анализов периферической крови, результатов исследования костного мозга при наличии ≥25 % бластов, имеющих лимфоидную природу. Для верификации биологического варианта лейкемии использовали морфологическое, цитохимическое, иммунологическое, цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследования мононуклеаров костного мозга.

В ходе иммунофенотипирования устанавливалась линейная принадлежность лейкемических бластов. ОЛЛ из клеток-предшественников В-клеточного ряда был диагностирован, если >20 % бластных клеток были положительны по T dT, CD19 и HLA-DR (pro-B ОЛЛ) либо по TdT, CD10, CD19 и HLA-DR (common ОЛЛ), либо по TdT, CD10, CD19, HLA-DR и цитоплазматическому IgM (pre-B ОЛЛ). Т-клеточный ОЛЛ диагностировался, если в миелограмме было > 20 % бластных клеток, положительных по TdT, CD2, цитоплазматическому CD3 (CyCD3) и/или CD7. Острый недифференцированный лейкоз (AUL) диагностировали, когда все маркеры, характерные для pro-B, common, pre-B и Т-клеточных вариантов ОЛЛ, а также все миеломаркеры были отрицательными.

Поражение ЦНС диагностировали при наличии в спинномозговой жидкости >5 ядросодержащих клеток в 1 мкл и лейкемических бластных клеток, либо при выявлении очаговой неврологической симптоматики или лейкемической инфильтрации головного мозга с использованием магнитно-резонансной томографии с контрастированием.

Костномозговая ремиссия считалась достигнутой при наличии в костномозговом пунктате <5 % бластных клеток, при полиморфной цитологической картине костного мозга, нормальном анализе крови и отсутствии экстрамедуллярных проявлений лейкемии.

Ранняя смерть (early death) или смерть в индукции определялась как летальный исход в течение циторедуктивной профазы и этапа индукции, до начала консолидации.

Смертью во время ремиссии считали смерть, наступившую по разным причинам после достижения костномозговой ремиссии.

Рефрактерными к терапии (non-responders) считались пациенты, не достигшие ремиссии на день 56 (после 2 блоков интенсивной ХТ для больных высокого риска); пациенты, не достигшие ремиссии по окончании этапа индукции (день 28), относились к категории late-responders.

Изолированный костномозговой рецидив регистрировался в случае появления > 20 % бластов в костном мозге после ранее достигнутой ремиссии. В случаях с доказанной экстрамедуллярной лейкемической инфильтрацией ***комбинированный костномозговой рецидив*** диагностировался при наличии > 5 % лимфобластов в костном мозге.

Изолированный экстрамедуллярный рецидив диагностировался при наличии клинических экстрамедуллярных проявлений лейкемии и отсутствии лейкемической инфильтрации (<5 % лимфобластов) в костном мозге. Рецидив ЦНС был диагностирован в случае по крайней мере 5 лейкоцитов в 1 мкл ликвора и наличии лимфобластов. Тестикулярный рецидив устанавливался клинически, однако в случае одностороннего поражения проводилась биопсия контралатерального яичка.

Вторая опухоль — развитие 2-го онкологического заболевания после окончания или на фоне ХТ по поводу ОЛЛ.

Пациент считался ***выбывшим из-под наблюдения*** (Lost-to-follow-up — LFU) при отсутствии информации о нем более года.

Статистический анализ

Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический Log-rank критерий. При сравнении групп пациентов по категориальным признакам использовался критерий χ^2. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Access, Paradox, GraphPad Prism 3.0, Statistica 6.0. Оценивался уровень достоверности p, различия считали статистически значимыми при $p \le 0{,}05$.

Результаты

Характеристика пациентов. За период с 01.01.1993 по 01.01.2007 терапию ОЛЛ по описанным протоколам получили 438 пациентов в возрасте от 4 мес до 17 лет 4 мес.

Инициальные клинические характеристики пациентов детально представлены в табл. 6. Достоверных различий по возрасту, числу лейкоцитов в периферической крови, гепатомегалии и исходному вовлечению ЦНС на момент постановки диагноза между больными, получившими терапию по протоколам PE CO и COALL, обнаружено не было. Выявлены достоверные различия в отношении преобладания в группе PECO пациентов мужского пола ($p = 0{,}032$), с инициальным вовлечением средостения ($p = 0{,}005$) и спленомегалией >4 см ($p = 0{,}002$).

Таблица 6. *Инициальные клинико-лабораторные характеристики пациентов*

Критерий	PECO-92	COALL-92	*p*
	абс. (%)	абс. (%)	
Общее число пациентов	214 (100)	224 (100)	
Возраст:			
< 1 года	2 (0,9)	6 (2,7)	0,105
1–9 лет	167 (78,0)	160 (71,3)	0,102
≥ 10 лет	45 (21,1)	58 (26,0)	0,240
Мальчики	141 (66,0)	125 (56,0)	**0,032**
Лейкоциты, × 10^9/л:			
< 25,0	153 (71,5)	149 (66,5)	0,260
25,0—50,0	21 (9,8)	29 (13,0)	0,290
50,0–100,0	19 (8,9)	25 (11,1)	0,450
≥ 100,0	21 (9,8)	21 (9,4)	0,890
Вовлечение ЦНС:			
нет поражения	208 (97,1)	214 (95,5)	0,380
поражение ЦНС	6 (2,9)	10 (4,5)	0,380
Вовлечение средостения:			
нет поражения	175 (82,0)	204 (91,0)	**0,005**
поражение средостения	39 (18,0)	20 (9,0)	**0,005**
Размеры печени, см:			
0–1	24 (11,0)	63 (28,0)	**< 0,001**
1–2	49 (23,0)	47 (21,0)	1,000
2–3	48 (22,0)	36 (16,0)	0,990
≥ 4	93 (44,0)	78 (35,0)	0,054
Размеры селезенки, см:			
0–1	90 (42,0)	118 (53,0)	**0,021**
1–2	18 (8,0)	23 (10,0)	0,470
2–3	21 (10,0)	25 (11,0)	0,740
≥ 4	85 (40,0)	58 (26,0)	**0,002**
Иммунофенотип:			
нет данных	27 (13,0)	5 (2,1)	**< 0,001**
В-линейный ОЛЛ	144 (67,0)	188 (84,0)	**< 0,001**
Т-линейный ОЛЛ	43 (20,0)	31 (13,9)	0,089
Цитогенетика:			
нет данных	146 (68,0)	7 (3,0)	**< 0,001**
обследовано	68 (32,0)	217 (97,0)	**< 0,001**
t(9;22)	6 (8,8)	2 (0,9)	**< 0,001**
t(4;11)	2 (2,9)	4 (1,8)	0,180
t(12;21)	0	38 (17,5)	**< 0,001**
t(1;19)	1 (1,5)	3 (1,4)	0,930

Таблица 7. *Протоколы PECO и COALL: результаты лечения*

		PECO, *n* = 214	COALL, *n* = 224	*p*
		абс. (%)	абс. (%)	
Смерть в индукции		7 (3,3)	3 (1,3)	0,160
Поздний ответ		11 (5,1)	2 (0,9)	**0,005**
Костномозговая ремиссия		207 (96,7)	221 (98,7)	0,160
Смерть в ремиссии		9 (4,2)	13 (5,8)	0,450
Рецидивы	Всего	68 (31,8)	44 (19,6)	**0,003**
	Костный мозг	43 (20,1)	27 (12,1)	0,022
	ЦНС	6 (2,8)	3 (1,3)	0,270
	Яички	4 (1,9)	2 (0,9)	0,360
	Другие	2 (0,9)	1 (0,4)	0,520
	Костный мозг и ЦНС	2 (0,9)	6 (2,7)	0,150
	Костный мозг и яички	10 (4,7)	3 (1,3)	**0,030**
	Костный мозг и другое	1 (0,5)	2 (0,9)	0,620
Вторичная опухоль		0	1 (0,4)	0,190
Полная ремиссия		121 (56,5)	157 (70,1)	**0,004**
Потеряны из-под наблюдения		9 (4,2)	9 (4,0)	0,930
10-летняя pEFS		60 %	70 %	**0,029**
10-летняя pOS		70 %	78 %	0,056

Примечание. *pEFS — вероятность бессобытийной выживаемости, pOS — вероятность общей выживаемости.*

Иммунофенотипирование мононуклеаров костного мозга выполнено у 87% пациентов в группе PECO и 98% пациентов — в группе CO ALL. Анализ распределения больных по иммунологическому варианту бластной популяции показал, что 67 % детей в группе PECO и 84% в группе CO ALL имели В-линейный иммунофенотип ($p < 0,001$). Число пациентов с Т-клеточным иммунофенотипом в обеих группах достоверно не отличалось и составило 20 % и 13 % соответственно ($p = 0,089$).

Распределение больных по цитогенетическим признакам оценить корректно не представлялось возможным, поскольку на начальном этапе внедрения в клиническую практику программной терапии ОЛЛ отсутствовала возможность проведения полноценного цитогенетического анализа бластного клона. У 68 (146) % пациентов группы PECO цитогенетическое исследование не было проведено или оказалось неинформативным. При этом обращает внимание высокий процент пациентов с филадельфийской хромосомой: из 68 обследованных пациентов Ph-хромосома была выявлена у 6, что составило 8,8 %. На более позднем этапе цитогенетические и молекулярно-генетические методы стали частью рутинного обследования детей на момент установления диагноза. В группе CO ALL обследование выполнено у 97 (217) % пациентов.

Хромосомные аберрации, имеющие прогностическое значение, распределились в группе CO ALL следующим образом: t(9;22) была выявлена у 2 (0,9 %); t(4;11) — у 4 (1,8%); t(12;21) — у 38 (17,5%) пациентов.

На основании критериев стратификации 125 (58%) пациентов на протоколе PECO и 110 (49 %) на протоколе COALL были отнесены к группе LR ($p = 0,107$), а 89 (42%) пациентов на протоколе PECO и 114 (51%) пациентов на протоколе COALL — к группе HR ($p = 0,201$).

Результаты лечения больных ОЛЛ оценивали по показателям достижения полной ремиссии, количеству летальных исходов до и после достижения полной ремиссии, частоте рецидивов и числу детей, находящихся в полной продолжительной ремиссии, а также по кривым бессобытийной выживаемости (EFS), построенными по методу Каплана–Майера. Результаты лечения представлены в табл. 7.

Летальность на этапе индукционной терапии составила 3,3% на протоколе PECO и 1,3 % — на протоколе COALL ($p = 0,160$). Среди причин «ранней летальности» были геморрагические (1 больной на протоколе PECO и 2 — на протоколе CO ALL) и инфекционные осложнения (3 случая на протоколе PECO), энцефалопатия вследствие лейкостаза при гиперлейкоцитозе (1 случай на протоколе COALL), прогрессирование основного заболевания несмотря на проводимую ХТ (3 больных на протоколе PECO).

Первичная рефрактерность к проводимой ХТ в группе PECO составила 5,1%: отсутствие костномозговой ремиссии по завершении терапии индукции (поздний ответ) зарегистрировано у 11 пациентов. Несмотря на то, что в последующем, после проведения 2 блоков высокоинтенсивной ХТ у этих больных удалось достичь нормализации костномозгового кроветворения, на более поздних этапах у всех пациентов этой группы развились рецидивы заболевания. В группе COALL поздний ответ на инициальную терапию зарегистрирован только у 2 пациентов ($p = 0,005$).

Ремиссия после завершения этапа индукции достигнута у 96,7 % пациентов группы PECO и 98,7 % пациентов группы COALL ($p = 0,160$).

Летальность в ремиссии при лечении по протоколам PECO и COALL достоверно не различалась и составила 4,2% и 5,8 % соответственно ($p = 0,450$). Основной причиной смерти были тяжелые инфекционные осложнения (5/5 на протоколе PECO и 5/7 на протоколе COALL).

Частота развития рецидивов значимо разнилась на протоколах PECO и CO ALL (31,8% против 19,6 %; $p = 0,003$). Кумулятивный риск развития рецидива составил в группе PECO 32,6 %, в группе CO ALL — 21,9% ($p = 0,0271$) (рис. 1). Увеличение интенсивности протокола COALL на этапе консолидации — реиндукции привело к значимому снижению количества рецидивов в обеих группах риска: в группе низкого риска частота развития рецидивов сократилась с 27,2% на протоколе PECO до 13,6 % на протоколе COALL, $p = 0,008$; а в группе высокого риска — с 38,2% на протоколе PECO до 25,4 % на протоколе COALL, $p = 0,050$.

При анализе характеристики рецидивов в зависимости от локализации показано, что кумулятивный риск развития изолированного ЦНС-рецидива через 10 лет составил в группе PECO 2,87 %, в группе COALL — 1,35% ($p = 0,339$) (рис. 2). Несмотря на сокращение показаний к лучевой терапии на протоколе COALL и уменьшение числа детей, получивших краниальное облучение, усиление ЦНС-направленной терапии обеспечило надежную профилактику поражения ЦНС.

На момент проведения анализа вероятность бессобытийной выживаемости (pEFS) составила 60% на протоколе PECO и 70 % — на протоколе CO ALL ($p_{log\text{-}rank} = 0,0477$). Достоверно значимыми оказались различия между протоколами PECO и COALL в отношении безрецидивной выживаемости (pRFS 65% против 74%; $p_{log\text{-}rank} = 0,0019$). Показатель общей выжи-

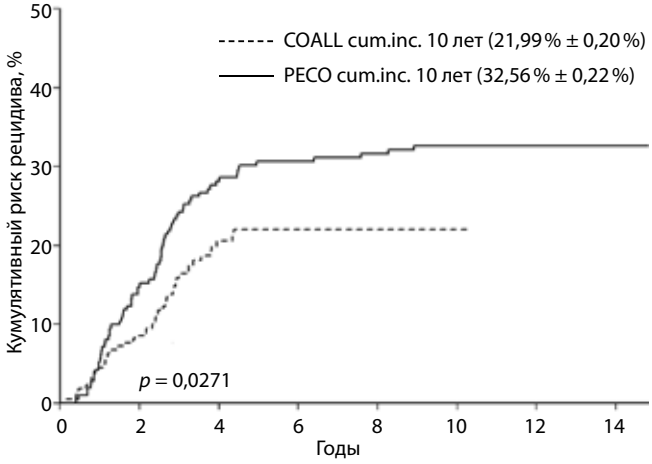


Рис. 1. *Кумулятивный риск развития рецидивов*

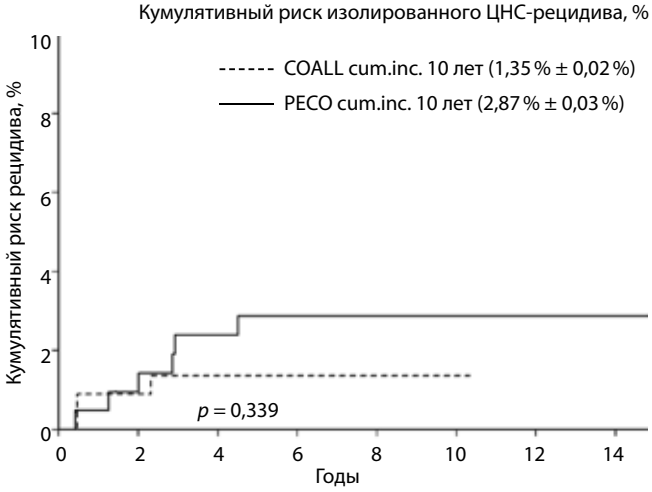


Рис. 2. *Кумулятивный риск развития изолированных нейрорецидивов*

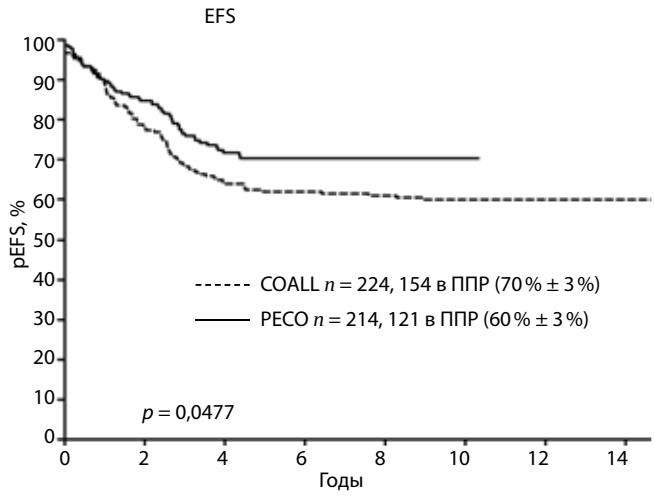


Рис. 3. *Протоколы P ECO и CO ALL: бессобытийная выживаемость в общей группе*

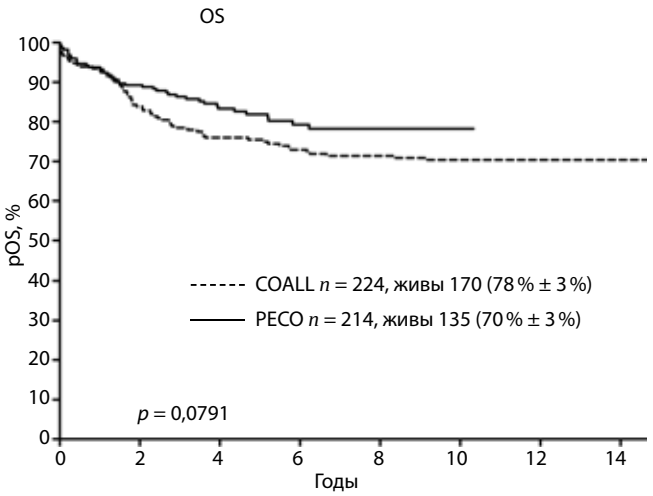


Рис. 4. *Протоколы PECO и COALL: общая выживаемость в общей группе*

ваемости также был выше в группе COALL (*p*OS 78 % против 70 %; $p_{\text{log-rank}} = 0{,}0791$) (рис. 3–4).

Обсуждение

На развитие интенсивной ХТ в Санкт-Петербурге главное влияние оказала терапевтическая программа немецкой исследовательской группы COALL. Главной целью исследований, проводимых этой группой, помимо улучшения долговременной выживаемости, было снижение токсичности ХТ: перенос введения L-asp с индукции на более поздние этапы лечения; введение L-asp в виде мощных одиночных доз, обеспечивающих полноценную деплецию аспарагина, вместо многократных малых доз; снижение кумулятивной дозы антрациклинов и поиск «щадящих» путей их введения с целью минимизации кардиотоксического эффекта, а также постепенное сокращение количества детей, получающих краниальное облучение [2–6].

Основная терапевтическая концепция протокола COALL предполагала проведение короткой, но жесткой фазы интенсивной ХТ в течение 5,5–8 мес с последующим переходом на поддерживающую терапию до 2 лет от начала лечения. На протяжении фазы интенсивной ХТ проводилась многократная ротация определенных комбинаций цитостатиков. С целью повышения системного антилейкемического эффекта, а также достижения ЦНС-направленного действия были использованы высокие (для цитарабина, 6-МП, L-asp) и промежуточно-высокие (для МТХ) дозы цитостатиков в виде коротких прерывистых курсов.

В 1992 г. с учетом результатов ранее проведенных группой COALL кооперативных исследований (COALL-82, COALL-85, COALL-89) был разработан специальный протокол для лечения ОЛЛ у детей в клиниках Санкт-Петербурга — PECO-92.

С целью уменьшения количества токсических осложнений в оригинальный протокол COALL-92 были внесены модификации, адаптирующие эту лечебную программу к условиям российских клиник. Эти модификации в первую очередь касались уменьшения разовых доз L-asp (с 45 000 до 25 000 ЕД/м^2) и цитарабина (с 3 до 2 г/м^2), поскольку более высокая эффективность этих элементов ХТ не была доказана в рандомизированных исследованиях.

Существовало несколько причин для внедрения модифицированной, а не оригинальной программы ХТ. Процесс проведения интенсивной ХТ сопровождался тяжелыми осложнениями в силу реализации специфической токсичности химиопрепаратов и индукции глубокой депрессии кроветворения. Успешное проведение ХТ требовало бесперебойного и полноценного обеспечения дорогостоящими препаратами для цитостатической и сопроводительной терапии, а также организации четкой инфраструктуры лечебно-диагностического процесса.

Анализ результатов лечения по протоколу PE CO продемонстрировал достоверное улучшение показателей выживаемости по сравнению с историческим контролем. При этом была зарегистрирована высокая по сравнению с публикуемыми данными (в том числе и с данными немецкой группы CO ALL) токсичность проводимой терапии [2, 7].

Второй проблемой, оказавшей существенное влияние на результаты лечения по протоколу PECO, явился чрезвычайно высокий уровень рецидивов в обеих группах риска (31,8 %).

Вероятными причинами, оказавшими негативное воздействие на результаты лечения, оказались модификации постиндукционной терапии в протоколе PECO по сравнению с оригинальным протоколом COALL-92, сделанные с целью уменьшения токсичности терапии: исключение 4-го введения ImHD MTX и приема 6-МП на этапе консолидации у пациентов группы HR, укорочение реиндукции в обеих группах риска и исключение и/т терапии на этапе поддерживающего лечения у необлученных больных. Возможно

влияние могло быть оказано длительными па узами между введениями L-asp и непродолжительной экспозицией 6-МП в постиндукционной терапии.

Результаты анализа протокола PECO были учтены при создании 2-й версии программы CO ALL-92 — протокола COALL-Санкт-Петербург-92 (COALL). Приобретение клинического опыта, улучшение качества ранней диагностики осложнений и совершенствование сопроводительной терапии позволило снизить частоту летальных исходов на индукционном этапе лечения по сравнению с протоколом PECO с 3,3 до 1,3% (показатель индукционной летальности, по данным группы COALL, составлял 0,8 % [2]). Благодаря внедрению протокола COALL удалось сократить уровень рецидивов в группе низкого риска в 2 раза, а в группе высокого риска — в 1,5 раза. Существенно снижен уровень рецидивов у мальчиков. При анализе структуры рецидивов отмечено уменьшение частоты развития рецидивов с изолированным вовлечением ЦНС, а также изолированных и комбинированных тестикулярных рецидивов. Частота рецидивов (19,6%) приблизилась к таковой на оригинальном протоколе (показатель рецидивов, по данным группы COALL [2], составлял 14%). Значимой проблемой протокола COALL, несмотря на совершенствование сопроводительного лечения, остался высокий уровень постремиссионной летальности (5,8 %), обусловленный высокой токсичностью этапа интенсивной ХТ . Этот показатель по-прежнему существенно отличался от такового у наших немецких коллег (по данным группы COALL, смерть в ремиссии имела место у 1,4% пациентов). Основные токсические осложнения были опосредованы специфическим воздействием на слизистые и миелодепрессивным эффектом высокодозного MTX, что приводило к нарушению целостности биологических барьеров и реализации системной инфекции на фоне агранулоцитоза.

При сопоставлении результатов терапии на протоколах PECO и COALL можно отметить следующие особенности.

1. Усиление реиндукции и ЦНС-направленной терапии на протоколе COALL в группе LR способствовало, с одной стороны, снижению количества рецидивов, однако, с другой стороны, не привело к достоверному улучшению результатов терапии ни в отношении общей OS, ни в отношении EFS.

2. В группе HR повышение интенсивности терапии консолидации — реиндукции достоверно улучшило показатели OS и EFS. Усиление постиндукционой терапии на протоколе COALL характеризовалось ранним началом применения 6-МП, одним дополнительным введением ImHD MTX плюс теми же элементами, что и в группе LR (усиление реиндукции и ЦНС-направленной терапии на этапе поддерживающего лечения).

Мы считаем, что одним из наиболее значимых факторов, способствовавших улучшению результатов лечения в группе HR по протоколу COALL, стало назначение 6-МП в раннем постиндукционном периоде. Подтверждением этого предположения может служить персональное сообщение профессора Гюнтера Хенце о влиянии раннего назначения 6-МП на отдаленные результаты лечения по протоколу ALL-BFM-83 и данные группы BFM [8].

С августа 2008 г. петербургские детские клиники гематологии/онкологии присоединились к Общероссийскому мультицентровому исследованию по лечению ОЛЛ у детей — Москва–Берлин-2008. Однако мы продолжим наблюдение за пациентами, получившими лечение по протоколам PECO и COALL, для того чтобы иметь возможность сравнить эффективность лечения для больных различных групп риска на разных протоколах, а также отслеживать отдаленные эффекты проведенной программной ХТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Н.А., Воронцов И.М. Лейкозы у детей. Л.: Медицина, 1988. 248 с.
2. Бойченко Э.Г. Программная полихимиотерапия острого лимфобластного лейкоза у детей (протокол PECO-92). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2003. 23 с.
3. Harms D.O., Janka-Schaub G.E. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. Leukemia 2000 Dec; 14(12):2234–9.
4. Janka-Shaub G.E., Stuhrk H., Kortum B. et al. Initial response to therapy as an important prognostic factor in acute lymphoblastic leukaemia in childhood Coall Study Group. Klin Padiatr 1991 Jul–Aug;203(4):231–5.
5. Janka G.E., Harms D., Escherich G. et al. Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance therapy of childhood ALL. Med Pediatr Oncol 1999;33:217.
6. Harms D., Schwamborn D., Janka G. et al. Daunorubicin-induced cell kill with 1-hour vs. 24-hour infusions: randomized comparison in newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 1994;23:197.
7. Janka-Schaub G.E., Harms D., Goebel U., Graubner U., Gutjahr P., Haas R.J., Juergens H., Spaar H.J., Winkler K. for the Coall Study Group. Randomized comparison of rational chemotherapy in high-risk acute lymphoblastic leukaemia of childhood — follow-up after 9 years. Eur J Pediatr 1996;155:640–8.
8. Schrappe M., Reiter A., Zimmermann M., Harbott J., Ludwig W-D., Henze G., Gadner H., Odenwald E. and Riehm H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Leukemia 2000;14:2205–22.

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ 3'2011

Эффективность ритуксимабсодержащей программы R-CHOP при лечении диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Т.Д. Луцкая, А.К. Голенков, Т.А. Митина, И.В. Буравцова, Г.А. Дудина, Л.Л. Высоцкая, Е.В. Трифонова, Е.В. Катаева, О.В. Москалец, В.В. Яздовский

Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Контакты: *Татьяна Дмитриевна Луцкая t.Luckaya@mail.ru*

Целью настоящего исследования было оценить результаты лечения больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) по программе R-CHOP (1-я и 2-я линии терапии), включая случаи с осложненным течением заболевания. Под нашим наблюдением находилось 77 больных с ДВККЛ, 50 первичных и 27 предлеченных другими программами химиотерапии в фазе рецидива, прогрессии или резистентности к лечению. Средний возраст составил 54,1 (21–79) года. Согласно IPI у 33 (43%) больных был высокий риск неблагоприятного течения заболевания. Осложненное течение, связанное с развитием тяжелых компрессионных синдромов, потребовавших соответствующего хирургического вмешательства, было диагностировано у 45 (58,4 %) больных. Из 50 больных с первично выявленным заболеванием, у которых программа R-C HOP была первой линией терапии, объективный ответ на лечение зафиксирован у 47 (94,0 %). Полный ответ установлен у 43 (86,0 %). Доля пациентов, у которых ответ сохранялся в течение 6 мес, составила 72,0% в группе с поддерживающим лечением и 28,0% — в группе без него. Эти результаты были достигнуты при плотности индукционного периода — 0,9, которая представляла собой отношение количества курсов лечения ко времени их проведения в месяцах. Плотность индукции стандартной программы R-CHOP-21 составляет 1,4. У 27 больных с рецидивом заболевания или рефрактерных к проводимому лечению, у которых R-C HOP был 2-й или более линией терапии, объективный ответ зафиксирован у 85,1%. Плотность индукционного лечения составила 1,03. Длительность объективного ответа в течение 6 мес была у 74 % больных. Анализ концентрации Ig сыворотки 3 классов, проведенный до и после завершения индукционного периода лечения у 16 больных, показал нормальные их значения. При медиане (Me) наблюдения за больными всей группы более 24 мес 3-летняя выживаемость составила 93 %, а Me не была достигнута. У первичных больных 3-летняя выживаемость составила 100%, а у предлеченных — 80%, причем Me также не достигнута.

Ключевые слова: *диффузная В-крупноклеточная лимфома, ритуксимаб*

The efficacy of therapy with rituximab (R-CHOP) in patients with diffuse large cells lymphoma

T.D. Lutskaya, A.K. Golenkov, T.A. Mitina, I.V. Buravtsova, G.A. Dudina, L.L. Vysotskaya, E.V. Trifonova, E.V. Kataeva, O.V. Moskalets, V.V. Yazdovskiy

M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute

This study aimed to evaluate treatment results in patients with diffuse large cell lymphoma (DBL CL) received R-CHOP program (as 1st and 2nd line therapy), including cases with complications. We observed 77 DBLCL patients (50 primary and 27 received other chemotherapy programs, in relapse, progression or treatment resistance phase). The median age is 54.1 years (21–79 years). 33 patients (43%) had a high risk for unfavorable disease course according to IPI. Complications associated with development of severe compression syndromes, which required the appropriate surgical intervention, was diagnosed in 45 (58.4 %) patients. From 50 primary patients received R-C HOP as the first line therapy objective treatment response was registered in 47 (94.0%). Complete response was registered in 43 (86.0%). The proportion of patients in whom response was maintained for 6 months was 72.0% in group with maintenance therapy and 28.0 % in group without it. These results were achieved when induction period density was 0.9. The last parameter is the ratio of the courses number to their time in months. The density of standard induction R-CHOP-21 is 1.4. From 27 relapse or refractory patients received R-C HOP as the second line therapy objective treatment response was registered in 85.1 % of patients. Induction period density was 1.03. The proportion of patients in whom response was maintained for 6 months was 74.0%. Three classes serum Ig concentrations analysis before and after induction period in 16 patients showed normal values. With the median (Me) follow-up time in all patients over 24 months 3-years survival was 93% and Me was not achieved. 3-years survival was 100% in primary patients and 80% in patients with previously treatment, and Me is also not achieved.

Key words: *diffuse B-large cells lymphoma, rituximab*

Программа R-CHOP (R — ритуксимаб, МабТера) широко применяется в гематологической практике и обладает высокой эффективностью при лечении больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). Анализ опубликованных результатов лечения большой группы больных, сформированной по неселективному принципу, показал, что объективный ответ был получен у 97 % пациентов. Сравнительный анализ общей выживаемости (ОВ) при ДВККЛ с использованием антрациклинсодержащих программ в сочетании с ритуксимабом и без него показал преимущество сочетанного лечения: 5-летняя ОВ была 72% и 59 % соответственно [1]. Важно подчеркнуть, что программы, содержащие ритуксимаб, были эффективны как у молодых, так и у пожилых пациентов [3, 4, 6].

Идея усиления эффективности терапевтических программ, содержащих ритуксимаб, при рецидивирующей и резистентной ДВККЛ находит свое отражение во многих опубликованных исследованиях [13].

Курсы RICE, включающие ритуксимаб, ифосфамид, карбоплатин и этопозид, использовали при рецидивах и рефрактерных случаях ДВККЛ [9, 11, 20]. Отмечена эффективность этой программы (RICE) у пожилых больных с агрессивной неходжкинской лимфомой. Программа R + DHAP (ритуксимаб, дексаметазон, антрациклин, цисплатин) по сравнению с DHAP была более эффективна у больных с рецидивирующей и рефрактерной ДВККЛ [13]. Повышение эффективности противоопухолевой химиотерапии (ХТ) при рецидивирующей и резистентной ДВККЛ может быть достигнуто за счет сочетания ритуксимаба и инотуцимаба озогамицина (анти-CD22), ритуксимаба, меченного I –131 [10] и монотерапии леналидомидом [5].

Поддерживающая терапия ритуксимабом значительно увеличивает время до прогрессии у больных с рецидивирующей фолликулярной лимфомой, однако при ДВККЛ результаты противоречивы [16].

Улучшение отдаленных результатов лечения отмечено у больных с ДВККЛ, где программы R-CH OP сочетались с лучевой терапией (ЛТ) на вовлеченные зоны: 2-летняя выживаемость составляла 87% при сочетании R-CHOP + ЛТ и 72 % — при R-CH OP без ЛТ [17[, 5-летняя ОВ была 77 % против 58 % [12], а 10-летняя ОВ в группе сочетанной терапии составила 59%. Показано, что применение R-CHOP + ЛТ при ДВККЛ улучшает ОВ только у пожилых больных [1].

Важным для эффективности ритуксимабсодержащих программ является их переносимость. При проведении такой терапии необходимо оценивать проявления иммуносупрессивного синдрома, который развивается в резуль тате действия ритуксимаба на $CD20^+$-антителопродуценты, а также выраженность цитотоксической нейтропении [18, 19]. Частота случаев фебрильной нейтропении у больных ДВККЛ, получающих R-CHOP-21, может быть уменьшена за счет применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) [8]. Снижение IgG сыворотки < 60% от нормы наблюдается при лечении лимфом ритуксимабом у 50% больных, получивших более 8 ритуксимабсодержащих циклов ПХТ. В группе больных, которым было проведено < 8 циклов лечения, снижение IgG выявлено в 11,8 % случаев. Наиболее выраженный иммунодефицит с развитием тяжелых инфекционных осложнений наблюдается при лечении по программам, включающим комбинацию флударабина и ритуксимаба [7].

Таким образом, показана клиническая важность использования R-CHOP в качестве основной программы лечения ДВККЛ. Однако, несмотря на большое число публикаций по этой проблеме, терапевтические возможности этой программы изучены далеко не полностью.

В связи с этим целью настоящего исследования было оценить непосредственные и отдаленные результаты лечения ДВККЛ по программе R-CHOP, включая 1-ю и 2-ю линии лечения в группах больных, сформированных по неселективному принципу, включая случаи с осложненным течением заболевания.

Пациенты и методы

Под нашим наблюдением находилось 77 больных с ДВККЛ, которые были включены в исследование в период 2005–2010 гг. Средний возраст составил 54,1 (21–79) года, мужчин было 37, женщин — 40. Критерием включения в исследование был диагноз ДВККЛ, установленный на основании гистологического и иммуногистохимического исследований материала биопсии опухоли, при которых выявлялась экспрессия антигена $CD20^+$ на клетках опухолевого инфильтрата.

Стадию болезни устанавливали согласно классификации Ann Arbor на основании данных компьютерной и магнитно-резонансной томографии (МРТ). Группу риска определяли по международному прогностическому индексу (IPI). Больным с первично установленным диагнозом ДВККЛ, а также рецидивировавшим или резистентным к предшествующей ХТ, не содержащей ритуксимаб, назначали лечение по программе R-CH OP. Для оценки непосредственных результатов терапии использовали критерии эффективности B. Cheson [2]. Отдаленные результаты определяли по длительности времени без прогрессии и выживаемости. Плотность индукционного периода лечения R-CHOP оценивали по отношению количества выполненных курсов к количеству месяцев, за которые они были проведены. Состояние гуморального иммунитета оценивали у 16 больных общей группы по показателям концентрации иммуноглобулинов (Ig) сыворотки 3 основных классов турбодиметрическим методом до и после завершения индукционного периода лечения. Период индукции в 1-й и во 2-й линиях лечения включал 8 циклов R-CHOP. Рецидив заболевания диагностировали при установлении признаков возобновления опухолевого роста после достигнутого на предшествующей ХТ полного ответа. Прогрессию определяли по тем же признакам после достигнутого частичного ответа, резистентность — при отсутствии полного или частичного ответа.

Больные с объективным ответом были разделены на 2 подгруппы в зависимости от применения поддерживающего лечения ритуксимабом. В качестве поддерживающего лечения больные получали ритуксимаб в той же дозе 1 раз в 2 мес в течение 2 лет.

Результаты

Среди 77 больных ДВККЛ, включенных в исследование, показала, что III и IV стадии болезни были диагностированы у 50 % пациентов. Согласно IPI

Таблица 1. *Случаи с осложненным течением ДВККЛ*

Общее число больных	Осложненное течение			
	Число больных	Синдром	Лечение синдрома	Число больных (%)
77	45 (58,4%)	Кишечная непроходимость	Гемиколонэктомия	6 (13,3%)
		Синдром сдавления верхней полой вены	Торакотомия	16 (35,5%)
		Поражение перикарда	Удаление перикарда	3 (6,6%)
		Сдавление трахеи	Трахеостомия	7 (15,5%)
		Поражение щитовидной железы	Экстирпация	5 (11,1%)
		Желудочное кровотечение	Резекция желудка	6 (13,3%)
		Нижняя параплегия с нарушением тазовых органов	Ляминэктомия с удалением экстрадуральной опухоли, интратекальное введение цитозара	2 (4,4%)

Таблица 2. *Показатели эффективности 1-й линии лечения больных ДВККЛ по программе R-CHOP*

Число больных	Возраст	Пол, М/Ж	Ответ по B. Cheson [2]					Длительность ответа (6 мес)		Плотность, количество курсов/мес
			ПО	НПО	ЧО	СБ	ПБ	ПТ	БПТ	
50	52,2 (21–79)	26/24	43 (86,0%)	2 (4%)	2 (4%)	1 (2%)	2 (4%)	36 больных (72,0%)	14 больных (28,0%)	8,0/8,7 0,9
			94,0% – ОО							

Примечание (здесь и далее): *ПО – полный ответ; НПО – неподтвержденный полный ответ; ЧО – частичный ответ; ПО + НПО + ЧО – объективный ответ (ОО); СБ – стабилизация болезни; ПБ – прогрессия болезни; ПТ – поддерживающая терапия; БПТ – без поддерживающей терапии.*

Таблица 3. *Показатели эффективности 2-й линии лечения больных ДВККЛ по программе R-CHOP*

Число больных	Возраст	Пол М/Ж	Характеристика предлеченности (количество курсов/мес)	Показатели ответа по B. Cheson [2]					Длительность ответа (6 мес)		Плотность, количество курсов/мес
				ПО	НПО	ЧО	СБ	ПБ	ПТ	БПТ	
27	56,1 (26–78)	11/16	5,9 (5–8)	14 (51,8%)	2 (7,4%)	7 (25,9%)	1 (11,1%)	3 (3,7%)	20 больных (74,0%)	7 больных (25,9%)	8,0/7,9 1,01
				85,1% – ОО							

в 43% случаях был высокий риск не благоприятного течения заболевания. Осложненное течение (табл. 1), связанное с развитием тяжелых компрессионных синдромов, потребовавших соответствующего хирургического вмешательства, было диагностировано у 45 (58,4%) больных.

У 50 больных с первично выявленным заболеванием, у которых программа R-CHOP была 1-й линией терапии, объективный ответ на лечение зафиксирован в 47 (94,0%), а полный ответ установлен в 43 (86,0%) случаях.

Длительность ответа в течение 6 мес составила 72,0% в группе с поддерживающим лечением и 28,0% — в группе без него. Эти результаты были достигнуты при плотности индукционного периода — 0,9 (табл. 2). В то же время рекомендованная плот-

Таблица 4. *Характеристика ответа на терапию по программе R-CHOP (1-я линия) у 50 первичных больных ДВККЛ в зависимости от плотности лечения в индукционном периоде*

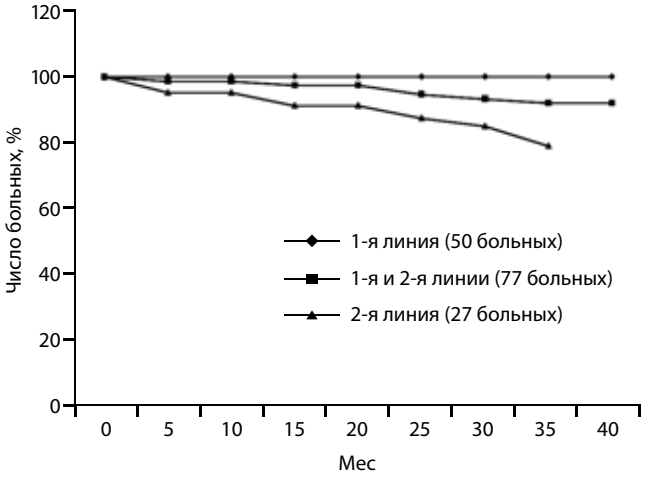
Число больных (подгруппы)	Плотность лечения относительно средней (0,9)	Показатели ответа по B. CHESON [2]				
		ПО	НПО	ЧО	СБ	ПБ
27 (1-я)	0,9 (0,9–1,14)	18 (66,7%)	2 (7,4%)	3 (11,1%)	2 (7,4%)	2 (7,4%)
		85,1% — ОО				
23 (2-я)	<0,9 (0,8–0,9)	14 (60,9%)	3 (13,0%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)	3 (13%)
		78,3% — ОО				

Таблица 5. *Характеристика ответа на терапию R-CHOP (2-я линия) у 27 больных ДВККЛ в зависимости от плотности лечения в индукционном периоде*

Число больных подгруппы	Плотность лечения относительно средней (0,9)	Показатели ответа по B. CHESON [2]				
		ПО	НПО	ЧО	СБ	ПБ
17 (1-я)	>0,9 (0,9 – 1,15)	8 (47,1%)	1 (5,9%)	4 (23,5%)	2 (11,8%)	2 (11,8%)
		76,5% — ОО				
10 (2-я)	<0,9 (0,6–0,9)	4 (40,0%)	1 (10,0%)	2 (20,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)
		70,0% — ОО				

ность индукции стандартной программы R-CHOP-21 равна 1,4.

Из 27 больных с рецидивом заболевания или рефрактерных к проводимому лечению, у которых R-CHOP применяли в качестве не 1-й линии терапии (табл. 3), объективный ответ зафиксирован у 23 (85,1 %).



Показатели выживаемости пациентов ДВККЛ, леченных по программе R-CHOP

Плотность индукционного лечения составила 1,03. Длительность объективного ответа в течение 6 мес была у 74% пациентов. В этой группе поддерживающее лечение проводили всем больным.

Для оценки непосредственных результатов лечения 50 больных, где R-CHOP применялся в качестве 1-й линии лечения, было выделено 2 подгруппы в зависимости от средней плотности лечения (табл. 4).

В 1-й подгруппе (27 больных), где плотность лечения была выше средней (0,9), число объективных ответов составляло 85,1%, что практически не отличалось от 2-й подгруппы из 23 больных (78,3%), где плотность лечения была ниже средней.

Такой же анализ был проведен в группе из 27 предлеченных больных, получавших R-CHOP в качестве 2-й линии лечения (табл. 5). В 1-й подгруппе (17 больных), где плотность лечения была выше средней (0,9), число объективных ответов составляло 76,5% (полных — 47,1%), что мало отличалось от 2-й подгруппы (10 больных) с меньшей плотностью лечения, где число объективных ответов составило 70,0% (полных — 40 %). При исследовании концентрации 3 классов Ig получены нормальные значения.

При анализе отдаленных результатов лечения общей группы (77 больных) (см. рис.) было установлено,

что 3-летняя выживаемость составляла 93%, включая время предлеченности другими противоопухолевыми программами больных, получивших R-CHOP в качестве 2-й линии лечения.

Трехлетняя выживаемость 50 первичных больных, где R-CHOP был применен в качестве 1-й линии терапии, составила 100%.

В группе больных, получивших R-CHOP как терапию 2-й линии, 3-летняя выживаемость составляла 80% (включая время предлеченности). Во всех группах больных Me не достигнута, а Me наблюдения составляла 24 мес.

Обсуждение

В результате формирования исследования больных с ДВККЛ по неселективному принципу возникли предпосылки, позволяющие получить дополнительную информацию об эффективности программы R-CHOP. Исследуемая группа характеризовалась тяжелым течением, которое подтверждали на основании стадирования с использованием рентгеновской компьютерной томографии и МРТ , показателя IPI, наличия компрессионных осложнений, потребовавших у 45 больных хирургического вмешательства. Анализ показал, что фактическая длительность индукционных циклов R-CHOP терапии была индивидуальной у каждого больного.

В качестве фактора, позволяющего провести оценку эффективности лечения, был использован показатель плотности индукции, представляющий собой отношение количества R-CH OP курсов к длительности индукционного периода, выраженного в месяцах. Индукционный период включал в себя проведение 8 курсов R-CHOP.

Анализ подгрупп больных, получавших 1-ю и 2-ю линии терапии R-CH OP, разделенных по средней плотности, показал, что не было различий в количестве полных и частичных ответов на лечение. Это означает, что колебания интенсивности плотности лечения в индукции в пределах 0,8–1,14 курс/мес для 1-й линии и 0,6–1,15 курс/мес — для 2-й линии R-CHOP не оказывали влияния на качество противоопухолевого ответа. Полученные резуль таты свидетельствуют о том, что колебания длительности цикла R-CHOP в указанных пределах показателей плотности лечения не влияли на противоопухолевую фармакодинамику программы.

Следует отметить, что эффективность R-CH OP терапии в 1-й линии с получением объективного ответа зафиксирована в 94% случаев, а во 2-й линии терапии этот показатель был равен 85,1 %. Результаты сопоставимы с данными литературы [18].

Поддерживающая терапия ритуксимабом у больных с объективным ответом, получавших 1-ю линию R-CHOP, увеличивала число больных в ремиссии продолжительностью 6 мес (72,0% против 28,0%).

При Me наблюдения за больными всей группы более 24 мес важно подчеркнуть, что 3-летняя выживаемость была 93%, а Me этого показателя не достигнута. У первичных больных 3-летняя выживаемость составила 100%, а у предлеченных — 80 %, причем Me также не достигнута.

Полученные результаты не дают оснований для констатации отчетливого иммуносупрессивного действия 8 курсов R-CH OP и поддерживающей терапии ритуксимабом. Об этом свидетельству ет отсутствие достоверных различий концентрации Ig в сыворотке, которые определяли до и после лечения.

Таким образом, проведенное исследование показало, что программа R-CHOP обладает хорошим противоопухолевым ресурсом даже у больных с осложненным течением, высокой эффективностью и хорошей переносимостью. Данная программа может быть применена в качестве основного лечения первичных больных ДВККЛ, а также в случаях развития рецидивов и при рефрактерном течении.

Литература

1. Chesquieres H., Ferlay C., Derbel O. et al. Improvement of outcome in diffuse large B-cell lymphoma after introduction of rituximab in combination with chemotherapy, evaluation in daily practice in a cohort of 410 patients treated at a single institution between 1996 and 2008. Haematologica 2010;95(s2):281.
2. Cheson B.D., Homing S.J., Coffer B. et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkins lymphoma. J Clin Oncol 1999;17:1244–53.
3. Chiappella A., Cabras M.G., Liberati A.M. et al. Long-term outcome of 309 young patients with untreated diffuse B-cell lymphoma at poor profnosis: a pooled analysis from Gimulell and intergruppo italiano linfomi. Haematologica 2010;95(s2):279.
4. Coiffier B., Lepage E., Briere J., Herbrecht R., Tilly H., Bouabdallah R. et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002;346:235–42.
5. Czuczman M., Vose J., Zinzani P.L. et al. Lenadomide monotherapy is clinical active patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. A pooled analysis of data from 2 phase studies(NHL-002/003). Haematologica 2010;95(s2):238.
6. Feugier P., van Hoor A., Sebban C., Solal-Celigny P., Bouabdallah R., Ferme C. et al. Long-term of the R-CHOP Study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J. Clin Oncol 2005; 23:4117–26.
7. Filanovsky K., Shvidel L., Shtalrid M., Duek A. et al. Hypogammaglobulinemia and non-neutropenic infection after chemotherapy combined with rituximab. Predictive factors and clinical significance. Haematologica 2008;93(s1):104.
8. Haioun C., Jaeger U., Lugtenburg P., Rossi F., Salar A. et al. Risk of febrile

neutropenia and use of G-CSF ptimary prophilaxis in non-Hodgkin's lymphoma patients receiving R-CHOP-21. Haematologica 2008;9351:105; abstr. 0258.
9. Herishanu Y., Terstman S., Perri C., Gipstein L., Ben-Tal O., Polliack A. et al. The combination of Rituximab, Etoposide, Ifosmide, and Carboplatin (RICE) is safe and effective salvage therapy for elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Haematologica 2005;90:999.
10. Kang H.J., Lim S.M., Choi C.W., Lee S.S., Na I.I., Ryoo B.Y. et al. Repeated radioimmunotherapy (RIT) with I-131 rituximab in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma; preliminary results. Haematologica 2008;93(s1):100.
11. Kewalramani T., Zelenetz A.D., Nimer S.D., Portlock C., Straus D., Noy A. et al. Rituxiamab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2004;103:3684–8.
12. Munoz N., Gonzalez-Bucrea E. et al. Primary nodal diffuse large B-cell lymphoma stage 1-II. Clinicobiological features and prognostic factors experience in a single institution. Haematologica 2010;95(s2):622.
13. Mey U.J., Olivieri A., Orlopp K.S., Rabe C., Strehl J.W., Gorschlueter M. et al. DHAP in combination with rituximab vs DHAP alone as salvage treatment for patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma; a matched-pair analysis. Leuk Lymphoma 2006; 47:2558–66.
14. Pregno P., Chiappella A., Bello M. et al. The outcome of diffuse large B-cell lymphomapatients treated with R-CHOP is not predict by interim evaluation of 18 FDG-position emission tomography or computed tomography (PET). Haematologica 2010;95(s2):285.
15. Prochazka V., Treny M., Pytlik R. et al. Clinical findings and treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: the analysis og the 1425 patients included in Czech lymphoma project. Haematologica 2010;95(s2):279.
16. Salar A., Saumell S., Pedro C., Alvarez-Larran A., Gimeno E., Abella E. et al. Rituximab maintenance significantly prolongs time to progression in patients with relapsed follicular lymphoma and also achieves a long term disease control in De Novo follicular lymphoma. Haematologica 2008;93(s1):110; abstr. 0271.
17. Sikder A., Dhakaj S., Kelly J. et al. Early stage diffuse large B-cell lymphoma in the R-CHOP. Era: Does involved field radiation therapy (IFRT) impact outcome? Blood 2007;110(s11):1006a.
18. Todd T., Karanth M., Jackson D. et al. Tolerance of R-CHOP-21 for diffuse large B-cell lymphoma in an unselected population and impact of dose reduction on outcome. Haematologica 2010;95(s2):282.
19. Verhoef G., Dang N., Smith M., Offer F. et al. Anti CD-22 immunoconjugate inotuzumab ozogamicin (CMC-544) plus rituximab: clinical activity in patients with relapsed or refractory follicular or aggressive lymphoma. Haematologica 2010; 95(s2):238.
20. Zelenetz A.D., Hamlin P., Kewalramani T., Yahalom J., Nimer S., Moskowitz C.H. Ifosfamide, carboplatin, etoposide (ICE) based second-line chemotherapy for the management of relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol 2003; 14 Suppl 1:i5–10.

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ 3'2011

Результаты терапии кандидемии у детей с различными гематологическими и онкологическими заболеваниями в условиях одного центра

И.И. Калинина[1], Д.Д. Байдильдина[1], Е.В. Сунцова[1], О.В. Горонкова[3], Л.А. Хачатрян[1], У.Н. Петрова[1], Г.Г. Солопова[1], В.В. Синицына[1], Г.А. Новичкова[1], М.А. Масчан[1], Д.В. Литвинов[1,3], Н.В. Мякова[1,3], Г.А. Клясова[2], А.А. Масчан[1]

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

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

Кандидемия является одним из самых тяжелых инфекционных осложнений у детей с гематологическими и онкологическими заболеваниями и характеризуется высокой летальностью. В статье проанализирован 7-летний опыт диагностики и терапии кандидемии у 37 детей, больных различными гематологическими и онкологическими заболеваниями: миелодиспластическим синдромом и острыми миело- и лимфолейкозами 24 случая, солидные опухоли — 5, гистиоцитарные синдромы — 4, апластическая анемия — 3, другие незлокачественные заболевания — 2. Возбудителями кандидемии у 32 больных были C. non-albicans (36 штаммов), у 5 — C. albicans (8 штаммов). Противогрибковую профилактику получал 31 пациент. На момент развития кандидемии нейтропения (< 0,5 × 10⁹/л) была у 22 пациентов. Основными клиническими проявлениями у всех больных была лихорадка, в 6 случаях — пневмония. Более редкими проявлениями были: полиорганная недостаточность — 8,1 %; септический шок и хронический диссеминированный кандидиаз — по 5,4%; менингит — 2,7%. Всем больным был установлен центральный венозный катетер (ЦВК). Все пациенты получали антимикотическую терапию (одним препаратом — 17 больных, комбинированную терапию — 20). ЦВК был удален у 21 пациента. Восстановление гемопоэза было у 14 пациентов, никто из них не умер от кандидемии. Из 8 больных без восстановления гемопоэза умерли 6. Повторные эпизоды кандидемии развились у 4 пациентов. Общая выживаемость составила 0,37 ± 0,09.

***Ключевые слова:** кандидемия, противогрибковая профилактика и терапия, дети, нейтропения*

Results of candidemia treatment in children with hematologic malignancies: single center experience

I.I. Kalinina[1], D.D. Baydildina[1], E.V. Suntsova[1], O.V. Goronkova[3], L.A. Khachatryan[1], U.N. Petrova[1], G.G. Solopova[1], V.V. Sinitsina[1], G.A. Novichkova[1], M.A. Maschan[1], D.V. Litvinov[1,3], N.V. Myakova[1,3], G.A. Klyasova[2], A.A. Maschan[1]

[1]Federal Research Center of Children Hematology, Oncology and Immunology, Moscow
[2]Russian Hematological Research Center, Moscow
[3]Russian Children Clinical Hospital, Moscow

Candidemia is one of the most serious infectious complications in children with hematological malignancies and has a high mortality rate. Seven-year experience of candidemia diagnosis and therapy in patients with various hematologic malignancies was analyzed. Candidemia registered in 37 patients (AML and MDS — 14, ALL — 10, solid tumors — 5, histocytic syndromes — 4, AA — 3, other non-malignancy diseases — 2). C. non-albicans (36 isolates from 32 patients) was common cause of, while C. albicans isolated in 5 patients (8 strains). Antifungal prophylactic therapy was applied to 31 patients. 22 patients at the time of candidemia have neutropenia (< 0.5 × 10⁹/l). Main clinical manifestations were febrile fever (100 % cases) and pneumonia (21.6 % cases). Less frequent multiorgan failure (8.1 %), septic shock (5.4%), chronic disseminated candidiasis (5.4%) and meningitis (2.7%) were registered. All patients received antifungal therapy (monotherapy — 17, combination therapy — 20). Central venous catheter removed in 21 patients. In 14 patients hematopoietic recovery was registered, none of these patients died, while from group of patients without hematopoietic recovery 6 patients died (p = 0.0001). Recurrent candidemia episodes were seen in 4 patients. Overall survival was 0.37 ± 0.09.

***Key words:** candidemia, antifungal prophylaxis and therapy, children, neutropenia*

Введение

Успехи в лечении детей с различными онкогематологическими заболеваниями достигнуты в основном за счет применения интенсивной полихимиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Такая терапия включает иммуносупрессивную терапию, которая закономерно сопровождается развитием длительной глубокой нейтропении, являющихся факторами риска развития серьезных инфекционных осложнений, которые существенно ухудшают прогноз основного заболевания. Наиболее тяжелыми являются грибковые инфекции, самые частые возбудители которых у детей — грибы рода *Candida* [1–5]. В структуре инвазивных микозов (ИМ) доля кандидозов составляет 20–40 %, атрибутивная летальность, связанная с развитием данного осложнения, достигает

30–50 % [5–7]. Самой частой клинической формой инвазивных кандидозов (ИК) у онкогематологических больных является кандидемия.

Вероятность развития и микробиологический спектр ИМ варьируют в зависимости от множества факторов, главные из которых — основное заболевание и его лечение, проведение противогрибковой профилактики, наличие и длительность стояния центрального венозного катетера (ЦВК). В России достоверные данные о заболеваемости кандидемией, клинических особенностях, эффективности профилактики и терапии кандидемии у детей с онкогематологическими заболеваниями отсутствуют, что и послужило поводом проведения данного исследования.

Материалы и методы исследования

Пациенты. В исследование было включено 37 пациентов (25 мальчиков и 12 девочек), медиана возраста 6 лет (4,5 мес — 17,5 года), получавших терапию в онкогематологических отделениях РДКБ в период с 2002 по декабрь 2009 г.

Критерием включения было наличие кандидемии — однократное обнаружение грибов рода *Candida* в крови при повышении аксиальной температуры тела выше 38 °С у больного с признаками системной воспалительной реакции [8]. Медиана длительности катамнестического наблюдения за пациентами составила 31,7 (6,5–92,7) мес. Статистическую обработку осуществляли по данным на 27.06.2010.

За период исследования были зарегистрированы 2 эпидемические вспышки кандидемий: в 2007 г. у 4 пациентов из 1 отделения получен рост *C. guilliermondii* в течение 1 нед, однако источник контаминации выявить не удалось; в 2008 г. при развитии 10 эпизодов кандидемии (ЭК), вызванных *C.* non-*albicans*, источником стал контаминированный раствор 4 % хлорида калия, использовавшегося для внутривенного введения.

Всем больным был установлен ЦВК.

Диагностические исследования. У всех больных гипертермия 38,0 °С и выше была показанием к исследованию гемокультуры. Кровь (6–8 мл) забирали из ЦВК во флаконы, предназначенные для культивирования аэробных бактерий (BACTEC Plus Aerobic/F и BACTEC Peds Plus/F) и/или грибов (BACTEC Mycosis IC/F). Инкубирование флаконов проводили в автоматическом анализаторе для гемокультур (BACTEC 9050 фирмы Becton-Dickinson, США). При положительных результатах проводили микроскопию и культуральное исследование содержимого флакона, для идентификации дрожжевых грибов использовали коммерческие тест-системы (API 20 C AUX, bioMerieux, Франция). Определение чувствительности грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам определяли при помощи набора Fungitest компании Bio-Rad, Е-теста (для каспофунгина), диско-диффузионного метода (для флуконазола, вориконазола). Микробиологическое исследование всех субстратов (кровь, ликвор, раневое отделяемое, дистальный конец удаленного ЦВК), определение вида возбудителя и чувствительности к антимикотическим препаратам проводили в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ГНЦ РАМН (руководитель лаборатории — д.м.н. Г.А. Клясова). Уровень антигена грибов рода *Candida* (маннан) определяли в 7 случаях.

В случае роста гемокультуры с целью выявления очагов диссеминации больным проводили ультразвуковое исследование брюшной полости (печени и селезенки), компьютерную томографию (КТ) легких, офтальмоскопию при наличии показаний также эхокардиографическое исследование сердца, КТ или магнитно-резонансную томографию печени и селезенки, головного мозга.

Определение понятий

Нейтропения. Абсолютное содержание нейтрофилов (сумма палочко- и сегментоядерных) в гемограмме $< 0{,}5 \times 10^9$/л, а также $< 1{,}0 \times 10^9$/л, если ожидается неизбежное снижение до количества ниже $0{,}5 \times 10^9$/л в течение 2 последующих дней.

Восстановление гранулоцитопоэза. Достижение количества гранулоцитов $> 1 \times 10^9$/л после эпизода агранулоцитоза.

Эпизод кандидемии. Период времени, в течение которого у больного наблюдался инфекционный процесс, вызванный грибами рода *Candida*, до «стерилизации» крови.

Первый эпизод кандидемии — впервые выявленная доказанная кандидемия.

Повторный эпизод кандидемии — развитие кандидемии у больных, у которых был купирован первый эпизод с микробиологическим подтверждением «санации» крови.

Первичная противогрибковая профилактика (первичная ПП) — применение противогрибковых препаратов с целью предотвращения развития инвазивной грибковой инфекции (ИГИ) у онкогематологических больных, не имевших эпизодов ИГИ.

Вторичная противогрибковая профилактика (вторичная ПП) — применение противогрибковых препаратов у больных, в анамнезе которых был зарегистрирован эпизод ИГИ, с целью предотвращения развития повторных эпизодов.

Антимикотическая терапия. При доказанной или вероятной ИГИ больные получали в зависимости от доступности противогрибковых препаратов амфотерицин В (амфо-В) 0,8–1,2 мг/кг/сут либо его липидные формы 3–5 мг/кг/сут; каспофунгин 70 мг/м^2/сут в первый день, затем 50 мг/м^2/сут; вориконазол 12–14 мг/кг/сут или флуконазол 5–10 мг/кг/сут.

Лабораторный мониторинг. Забор крови на культуральное исследование проводили 1 раз в 3 дня до получения дважды негативного результата; общий анализ крови через день до восстановления гемопоэза.

Критерии оценки эффективности терапии. В качестве основного критерия было выбрано достижение афебрилитета, дополнительным служило отсутствие повторных позитивных результатов гемокультур. В том случае, когда в условиях нейтропении у больного сохранялась фебрильная лихорадка, обусловленная каким-либо иным инфекционным процессом или самим онкогематологическим заболеванием, критерием окончания ЭК и эффективности его терапии была «санация» крови, подтвержденная повторным исследованием гемокультуры.

Статистическая обработка. Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Statistica 6.0, BioStat 2009 и электронной таблицы Excel. Вероятность общей выживаемости (ОВ) рассчитана по методу Каплана–Майера. Для непараметрических количественных данных определяли медиану, а также максимум и минимум вариационного ряда. Достоверность различий между исследуемыми группами исчисляли по методу Манна–Уитни и при помощи теста χ-квадрат, точного теста Фишера. Оценивали доверительную вероятность p, различия считали достоверными при $p \le 0{,}05$.

Результаты исследования

Анализ исходных характеристик в исследуемой группе пациентов. В исследование включено 37 пациентов, с регистрацией 44 ЭК. В исследуемой группе преобладали больные с острым лейкозом — 21 пациент, с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) — 10; с острым миелоидным лейкозом (О МЛ) — 11 пациентов. Остальные эпизоды были зарегистрированы у пациентов с приобретенной сверхтяжелой апластической анемией (СТАА) — 3; с миелодиспластическим синдромом и ювенильным миеломоноцитарным лейкозом — 3; с гистиоцитозом из клеток Лангерганса и вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом — по 2 пациента; с нейробластомой — 3 пациента и у пациентов с синдромом Пирсона (митохондриальная болезнь и врожденная апластическая анемия), медуллобластомой и альвеолярной рабдомиосаркомой — по одному.

Статус основного заболевания. На момент определения позитивной гемокультуры период развернутых клинических проявлений был у 13 пациентов; прогрессия — у 10; ремиссия — у 14. Двум пациентам перед ЭК проведена спленэктомия — 1 больному за 2 мес, 2-му — за 10 дней до регистрации ЭК. Семь пациентов на момент диагностики кандидемии находились в отделении реанимации и интенсивной терапии, 6 из них проводилась искусственная вентиляция легких.

Нейтропения. Из 37 пациентов 22 (59,5%) находились в состоянии нейтропении, медиана продолжительности которой до момента выявления положительной гемокультуры составила 20,5 (2–439) дня. Медиана количества лейкоцитов составила $0{,}95 \times 10^9$/л (0,1 – 180), мода гранулоцитов — 0 $\times 10^9$/л (0–0,8). Из 24 пациентов с ЭК, не связанными с эпидемическими вспышками, у 17 (71%) была нейтропения, медиана длительности которой до развития ЭК составила 36 (5–439) дней.

Противогрибковая профилактика. У 31 из 37 (83,8%) пациентов использовалась профилактическая противогрибковая терапия; у 28 (90 %) пациентов препаратами азолов (флуконазол, итраконазол или вориконазол).

Медиана ***длительности нахождения больного в стационаре*** до развития ЭК составила 2,3 (0–24,6) мес. У 4 детей при исследовании крови из ЦВК, установленном в другом лечебном учреждении (день 0), в гемокультуре получен рост грибов рода *Candida*. Большинство пациентов ($n = 16$) развили ЭК на сроке нахождения в стационаре до 6 мес.

Парентеральное питание получали 19 (51,4%) пациентов на момент определения положительной гемокультуры, чаще всего использовали препарат комбинированного состава Оликлиномель (Бакстер, Бельгия).

Глюкокортикоиды (ГКС) получали 15 пациентов (метилпреднизолон — 9 пациентов, медиана дозы 5 (0,3–20) мг/кг/с; дексаметазон — 6 пациентов, в дозах 10–20 мг/м^2/с). Медиана продолжительности терапии ГКС составила 10 (5–171) дней, только 3 пациента получали ГКС более 21 дня.

Клиническая картина: лихорадка была в 100 % случаев кандидемии. Кроме лихорадки клиническими проявлениями кандидемии были: пневмония — 21,6%; полиорганная недостаточность (ПОН) — 8,1%; септический шок (СШ) — 5,4 %; хронический диссеминированный кандидиаз (ХДК) — 5,4%; менингит — 2,7%. Согласно клиническим проявлениям пациенты были разделены на 3 группы: 1-я группа — пациенты, у которых лихорадка была единственным симптомом ($n = 23$), 2-я — больные с лихорадкой и пневмонией ($n = 6$) и 3-я группа — пациенты с лихорадкой и множественными органными поражениями (кожа, легкие, селезенка, печень, менингит, СШ, ПОН) в различных комбинациях ($n = 8$).

У 2 больных с клиническими признаками СШ получен рост *C. albicans* из крови. Из 32 больных с ростом из крови *C.* non-*albicans* ни у одного не было нестабильности гемодинамики и развития шока, $p = 0{,}028$.

Анализ этиологической структуры кандидемий и чувствительности грибов рода Candida к противогрибковым препаратам. За исследуемый период у 37 пациентов

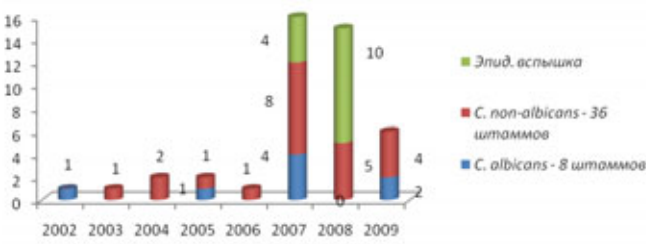


Рис. 1. *Изменение спектра кандидемии в течение исследовательского периода*

Таблица 1. *Чувствительность грибов рода Candida к антимикотикам*

C. albicans

Год	№ штамма	Чувствительность	Устойчивость
2002	1	Амфо-В, итра, 5-FC, кето	Флук
2005	2	Амфо-В, 5-FC, итра, флук, мико, кето, каспо, вор	Нет
2007	3	Амфо-В, 5-FC, итра, флук, миконазол, кето	Нет
2007	4, 5, 6	Амфо-В, 5-FC, итра, миконазол, кето	Флук*
2009	7	5-FC, флук, итра, кето, мико, амфо-В, вор, каспо	Нет
2009	8	Флук, вор, каспо	Нет

C. non-albicans

Год	Штамм	Чувствительность	Устойчивость
2003	*C. kefur*	Нет данных	Нет данных
2004	*C. krusei*	Амфо-В	Флук, итра, 5-FC, кето
2007	*C. krusei*	Вор, каспо, амфо-В, итра	Флук, мико, 5-FC, кето
2007	*C. lusitaniae*	5-FC, амфо-В	Мико, итра, флуко, кето, каспо, вор
2008	*C. colliculosa*	5-FC, амфо-В, мико, итра, флук	Кето
2008	*C. tropicalis*	5-FC, амфо-В, кето, флук, вор, каспо	Мико, итра

C. parapsilosis

Год	Число штаммов	Чувствительность	Устойчивость
2004	1	5-FC, амфо-В, кето, мико, флук, итра	Нет
2005	1	Итра, кето	Амфо-В, 5-FC, мико, флук
2007 2008	1 4	5-FC, амфо-В, кето, итра, флук, вор, каспо	Мико
2008	1	5-FC, флук, итра, кето, мико, амфо-В, вор, каспо	Нет
2009	1	5-FC, флук, амфо-В вор, каспо	Мико, итра, флук, кето
2009	1	5-FC, амфо-В, кето, флук, итра, вор, каспо	Мико

C. pelliculosa

Год	Число штаммов	Чувствительность	Устойчивость
2007	3	5-FC, амфо-В, мико, кето, итра, флук, вор, каспо	Нет
2008	3	Амфо-В, флук, вор, каспо	5-FC, итра, мико, кето

C. guilliermondii

Год	Число штаммов	Чувствительность	Устойчивость
2006	1	Амфо-В	5-FC, итра, флук, мико, кето
2007	1	5-FC, амфо-В, кето, флук, вор	Мико, итра, каспо
2007	1	5-FC, амфо-В, флук, итра	Мико, кето, каспо
2007 2008 2009	3 4 1	5-FC, амфо-В, кето, вор	Мико, итра, флук, каспо

5-FC – 5-флюороцитозин, флук – флуконазол, итра – итраконазол, кето – кетоконазол, мико – миконазол, амфо-В – амфотерицин В, вор – вориконазол, каспо – каспофунгин.
** Три повторных эпизода у 1 больного.*

получено 44 штамма грибов рода *Candida* (*C. albicans* — 8 штаммов у 5 пациентов и *C.* non-*albicans* — 36 штаммов у 32 больных). Изменение спектра кандидемии в течение периода исследования представлено на рис. 1. Наглядно виден рост кандидемии, вызванной грибами рода *C.* non-*albicans*, что связано с эпидемическими вспышками 2007 и 2008 гг. Четыре ЭК *C. albicans* зарегистрированы у 1 больного, с 3 повторными ЭК в 2007 г. Этиологический спектр грибов вида *C.* non-*albicans* представлен на рис. 2. Преобладание кандидемии, вызванной *C. guilliermondii*, мы объясняем эпидемическими вспышками. На рис. 3 представлен этиологический спектр грибов рода *Candida* у пациентов без учета эпидемических вспышек. Таким образом, во «внеэпидемический период» *C. albicans* продолжает играть значимую роль в этиологии кандидемий.

Чувствительность *in vitro* грибов рода *Candida* к антимикотикам представлена в табл. 1. Из 44 штаммов 19 (43,2 %) были устойчивы к флуконазолу, 19 (43,2 %) к итраконазолу, а 14 (31,8 %) штаммов были устойчивы к обоим препаратам. Только 1 штамм *(C. lusitaniae)* был устойчив к вориконазолу и 1 штамм *(C. parapsilosis)* к амфо-В. Из 8 штаммов *C. albicans*, полученных за весь период исследования, 4 (50%) штамма были устойчивы к флуконазолу, из них 3 штамма получены у 1 больного, получавшего длительно флуконазол в качестве вторичной профилактики, при развитии многократных повторных эпизодов. Чувствительными *in vitro* ко всем исследуемым препаратам

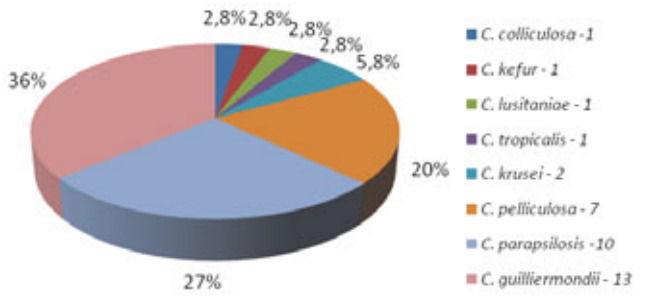


Рис. 2. *Этиологический спектр грибов вида C. non-albicans (32 пациента, 36 штаммов)*

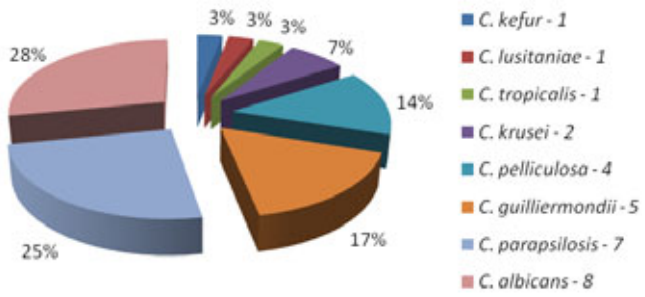


Рис. 3. *Этиологический спектр грибов рода Candida у пациентов без учета эпидемических вспышек (24 пациента, 29 штаммов)*

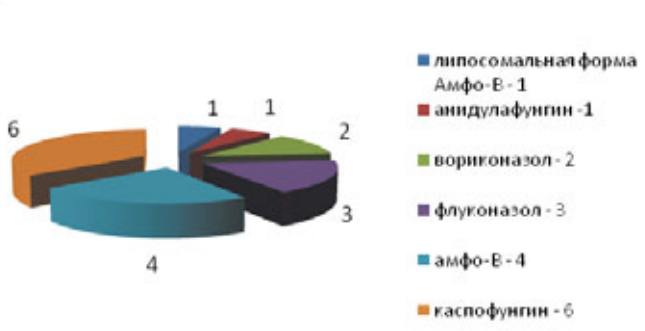


Рис. 4. *Спектр противогрибковых препаратов, используемых для монотерапии (n = 17)*

были: 2 из 10 штаммов *C. parapsilosis*, 3 из 6 штаммов *C. pelliculosa*, 4 из 8 штаммов *C. albicans*. Наиболее резистентным *in vitro* был штамм *C. guilliermondii:* из 13 штаммов 10 устойчивы к каспофунгину, из них 8 устойчивы к 3 препаратам: каспофунгину , итраконазолу и флуконазолу.

Таким образом, у 8 (25,8%) пациентов из 31, которые получали первичную ПП, получен рост грибов рода *Candida*, *in vitro* устойчивой к применяемым для профилактики у этих больных противогрибковым препаратам: у 4 пациентов к флуконазолу *(C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. krusei, C. guilliermondii)*; у 3 к итраконазолу *(C. krusei* — 1, *C. guilliermondii* — 2 пациента); у 1 пациента к амфо-В *(C. parapsilosis)*.

Терапия. По поводу кандидемии все больные получали комплексную терапию, т . е. терапию, включающую не только противогрибковые препараты, но и стимуляцию гранулоцитопоэза (15 пациентов), удаление ЦВК (21 пациент), другую сопроводительную терапию, направленную на восстановление функциональных систем организма ребенка, с целью дальнейшего продолжения химиотерапии (ХТ).

Противогрибковая терапия. Терапию одним противогрибковым препаратом получили 17 пациентов (рис. 4), комбинированную — 20. Медиана продолжительности монотерапии составила 12 (1–96) дней. Два препарата получили 11 пациентов: 2 больных с *C. albicans*, 9 — с *C.* non-*albicans*. Использовалось 6 различных комбинаций, наиболее часто сочетание каспофунгина и вориконазола (табл. 2). Три препарата использовались в 6 разных схемах терапии у 8 пациентов с *C.* non-*albicans*. Только в 1 случае 3 препарата назначались последовательно, когда после отмены одного назначали другой. Каспофунгин использовали во всех 8 случаях, вориконазол — в 6, флуконазол — в 4 (табл. 3).

Больная с ОМЛ (М3 вариант) за время течения ЭК (*C. albicans*) получала 5 противогрибковых препаратов, из клинических признаков кандидемии у нее были: СШ; менингит с определением в ликворе *C. albicans*; поражение кожи, легких, печени.

Медиана длительности комбинированной терапии составила 26,5 (6–142) дня (2 препаратами — 17 дней, 3 — 47 дней).

В состав терапии ЭК у 6 пациентов входили препараты, к которым полученные в гемокультуре грибы рода *Candida* были устойчивы *in vitro* (см. табл. 4).

Терапия, направленная на восстановление числа гранулоцитов. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) получали 19 (51,4 %) из 37 больных, из них 6 детей к моменту получения позитивной гемокультуры уже получали G-CSF, медиана предшествующей терапии составила 9,5 (2–182) дня. Медиана применения G-CSF (от момента роста гемокуль туры до окончания ЭК) составила 12 (1–67) дней. Одна больная со СТАА кроме G-CSF получила 30 трансфузий донорских гранулоцитов. Восстановление количества нейтрофилов ($> 1 \times 10^9$/л) наблюдалось у 14 из 22 находившихся в нейтропении пациентов: у 4 пациентов гемопоэз восстановился без стимуляции, у 10 — под воздействием терапии G-CSF; медиана длительности нейтропении от момента возникновения ЭК до восстановления гемопоэза составила 10 (3–33) дней.

Удаление ЦВК. ЦВК был удален у 21 (56,8%) больного из всей группы включенных в анализ пациентов. Медиана от момента получения роста гемокуль туры до удаления ЦВК составила 3 (1–24) дня; медиана длительности от удаления ЦВК до купирования ЭК — 6 (1–48) дней. В 5 случаях ЦВК был удален уже после купирования ЭК (достижение афебрилитета, отсутствие позитивной гемокультуры), через 1–8 дней по решению лечащих врачей.

Вторичная противогрибковая профилактика после купирования первого ЭК проводилась 27 пациентам.

Таблица 2. *Схемы комбинированной противогрибковой терапии 2 препаратами*

Препараты	Число пациентов (*N* = 11)	Вид *Candida*	Продолжительность терапии в днях	
			1-й препарат	2-й препарат
Вориконазол; липидный амфо-В	1	*C. non-albicans*	25	28
Вориконазол; амфо-В	2	*C. non-albicans*	6/11	6/2
Каспофунгин; липидный амфо-В	1	*C. non-albicans*	17	8
Каспофунгин, вориконазол	4	*C.* non-*albicans 3* *C. albicans 1*	14/14/13 15	4/18/4 2
Каспофунгин, амфо-В	2	*C. non-albicans*	3/7	25/7
Флуконазол, амфо-В	1	*C. albicans*	70	24

Таблица 3. *Схемы комбинированной противогрибковой терапии 3 препаратами*

Препараты	Число пациентов (*N* = 8)	Штамм	Продолжительность терапии в днях		
			1-й препарат	2-й препарат	3-й препарат
Каспофунгин; вориконазол; флуконазол	1 1	*C. parapsilosis* *C. tropicalis*	21 9	23 44	25 40
Каспофунгин; липосомальная и липидная форма амфо-В	1	*C. krusei*	23	18	37
Каспофунгин; вориконазол; липосомальная форма амфо-В	1	*C. parapsilosis*	67	63	24
Каспофунгин; амфо-В; флуконазол	1	*C. parapsilosis*	13	59	31
Каспофунгин; вориконазол; амфо-В	1 1	*C. guilliermondii*	3 7	13 50	9 47
Каспофунгин; флуконазол; вориконазол	1	*C. guilliermondii*	2	10	6

Таблица 4. *Устойчивость грибов рода Candida к применяемым в терапии препаратам*

Штамм	Число пациентов (*N* = 6)	Устойчив *(in vitro)*	Терапия
C. lusitaniae	1	Каспофунгин	Каспофунгин (эпизод купирован)
C. guilliermondii	1	Флуконазол	Флуконазол (эпизод купирован)
C. guilliermondii	4	Каспофунгин	Каспофунгин (эпизод купирован)

В качестве вторичной профилактики чаще использовали вориконазол — у 12 больных; флуконазол получали 9; итраконазол, каспофунгин — по 2 пациента, позаконазол — 1; и 1 пациент после купирования первого эпизода продолжил получать амфо-В и вориконазол.

Повторные эпизоды кандидемии с определением в гемокультуре того же штамма *Candida*, что и при первом эпизоде, зарегистрированы у 4 (13%) больных из 31: у 3 больных при выявлении *C.* non-*albicans* (*C. pelliculosa* у 1 и *C. guilliermondii* у 2) и у 1 — *C. albicans*.

Исходы кандидемии. ЭК были купированы у 31 (84%) пациента из 37, летальный исход до купирования ЭК зарегистрирован в 6 (16 %) случаях. Медиана от момента регистрации кандидемии до смерти составила 19,5 (8–67) дня.

Не выявлено влияния возраста ($p = 0,5$), длительности нахождения больного в стационаре ($p = 0,65$) и различий в клинической картине (только лихорадка, сочетание лихорадки с пневмонией, сочетание лихорадки со множественными органными поражениями) ($p = 0,2$) на исход кандидемии.

При сравнении группы пациентов с количеством гранулоцитов $> 1 \times 10^9$/л против группы больных с нейтропенией получены достоверные различия ($p = 0,0001$) влияния восстановления гемопоэза на купирование ЭК. ЭК был купирован у всех 14 пациентов, у которых удалось добиться восстановления гранулоцитопоэза. Также кандидемия была купирована у всех 15 пациен-

Таблица 5. *Сравнение клинического течения и исхода кандидемий*

	Эпидемия	Неэпидемические случаи
Всего пациентов*	14	24
Наиболее частый штамм	*C. guilliermondii*	*C. albicans*
Профилактика	11	20
Нейтропения	5 (медиана 20 дней)	17 (медиана 36 дней)
G-CSF	6	14
Клиническое течение		
Лихорадка	12/14 (86 %)	12/24 (50 %) (p = 0,03)
Пневмония	2	4 (p = 0,6)
Множественные очаги	0	8 (p = 0,015)
ЦВК		
Удален / умерли	7 / 0	15 / 1
Не удален / умерли	7 / 0	9 / 5 (p = 0,01)
Гранулоцитопоэз		
Восстановлен / умерли	14 / 0	16 / 0
Не восстановлен / умерли	0	8 / 6 (p = 0,0002)
Исход		
Смерть	0	6 (p = 0,05)

** У одного из пациентов отмечалось развитие 1 ЭК вне эпидемии и 1 ЭК, связанного с эпидемической вспышкой.*

тов, у которых она развилась на фоне отсутствия снижения числа гранулоцитов. Из 8 детей, у которых восстановления гемопоэза не было (4 из них получали G-CSF), — у 2 больных ЭК был купирован, 6 пациентов умерло.

Из 8 пациентов с нейтропенией, которые по тем или иным причинам не получали стимуляцию гранулоцитопоэза G-CSF, умерли 4 (50 %) в сравнении с 10 пациентами с сохранным гранулоцитопоэзом, которые не получали G-CSF с профилактической целью, где ни один ребенок не умер, p = 0,02.

Среди больных, у которых ЦВК был удален (21 ребенок), ЭК был купирован у 20 пациентов; 1 больная, у которой ЦВК был удален только через 24 дня после роста гемокультуры, умерла. Из 16 больных, чей ЦВК был сохранен несмотря на кандидемию и фебрилитет, кандидемия купирована у 11 больных, 5 пациентов погибли (p = 0,07).

Все 8 эпизодов, вызванных *C. albicans*, — как первичные, так и повторные, были купированы. Из 36 эпизодов, вызванных *C.* non-*albicans* (первичных и повторных), купировано 30. Из 5 ЭК, при которых в качестве монотерапии применялся каспофунгин, устойчивый *in vitro* к полученному в гемокультуре штамму, все 5 ЭК были купированы (см. табл. 4).

Шесть пациентов умерли до купирования ЭК — ни у одного из них не было восстановления гемопоэза. ЦВК был удален только в 1 случае. Необходимо отметить, что на момент позитивной гемокуль туры у 5 умерших пациентов отмечалась прогрессия основного заболевания: у 2 был рефрактерный ОМЛ, у 2 — прогрессия вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза, у 1 больной — СТАА, 1 рефрактерное течение Т-ОЛЛ. Все больные находились в длительной и глубокой аплазии кроветворения, медиана длительности которой составила 87 (6–439) дней. Все умершие больные получали противогрибковую профилактику.

При сравнении кандидемий, возникших в результате эпидемических вспышек и вне таковых (см. табл. 5), очевидно, что наиболее тяжелое течение кандидемии (с органной диссеминацией) и худший прогноз были у больных со спорадическими ЭК.

Результаты проведенного исследования суммированы в табл. 6.

Таким образом, достоверные различия в исходе ЭК касались 2 параметров: статуса основного заболевания на момент развития ЭК (наличие либо отсутствие ремиссии) и восстановления гемопоэза. Возраст, количество дней пребывания в стационаре, предшествующая терапия ГКС, удаление ЦВК, количество гранулоцитов на момент развития кандидемии не оказали статистически достоверного влияния на резуль таты терапии. Однако следует отметить, что в случае спорадических ЭК удаление ЦВК имело положительное воздействие на вероятность купирования ЭК, в то время как у пациентов, подвергшихся прямому введению в кровь контаминированных инфузионных сред во время эпидемической вспышки, удаление ЦВК никак не отразилось на клиническом течении и исходе ЭК.

Рис. 5. *Пятилетняя ОВ для пациентов с кандидемией*

Таблица 6. *Сводная терапия по результатам исследования*

Характеристики	*N*	ЭК купирован	Смерть до купирования ЭК	*p*
Вся группа	37	31	6	
Нейтропения	22	16	6	0,063
Без нейтропении	15	15	0	
Профилактика проводилась	31	25	6	0,56
Профилактика не проводилась	6	6	0	
Получали ГКС	15	11	4	0,2
Не получали ГКС	22	20	2	
C. albicans	5	5	0	0,57
C. non-*albicans*	32	26	6	
Парентеральное питание	19	17	2	0,35
Без парентерального питания	18	14	4	
Реанимационное отделение	7	4	3	0,068
Гематологическое отделение	30	27	3	
Период развернутых клинических проявлений	13	12	1	0,003
Ремиссия	14	14	0	
Прогрессия	10	5	5	
Монолихорадка	23	21	2	0,16
Лихорадка + пневмония	6	5	1	
Лихорадка + множественные органные поражения	8	5	3	
ЦВК удален	21	20	1	0,07
ЦВК не удален	16	11	5	
Гемопоэз восстановился	29	29	0	0,0001
Гемопоэз не восстановился	8	2	6	
Терапия 1 препаратом	17	16	1	0,32
Терапия 2 препаратами	11	9	2	
Терапия 3 препаратами	8	5	3	
Терапия 5 препаратами	1	1	0	

**n – число пациентов*

На момент обработки данных (27.06.2010) из 37 пациентов живы 16 (43 %) (рис. 5). Из 5 пациентов, у которых по причине развития кандидемии специфическая терапия проводилась не в полном объеме (снижение доз химиопрепаратов — у 3 больных, значительное удлинение временных интервалов между курсами ХТ — у 2), 4 умерли на разных сроках после купирования ЭК от рецидива основного заболевания.

Обсуждение

Кандидемия является наиболее распространенным вариантом ИК [9–11] и находится на 4-м месте в структуре септицемий в США и многих европейских странах [12–17]. Это, вероятнее всего, связано с увеличением числа иммунокомпрометированных больных и увеличением различных инвазивных медицинских вмешательств [18]. Общая частота кандидемий в педиатрической популяции составляет 40 случаев на

100 тыс. населения в год [19]. К сожалению, в нашей стране оценить эпидемиологическую обстановку в отношении кандидемии трудно в связи с отсутствием как единого регистра онкогематологических заболеваний у детей, так и регистра инфекционных осложнений в данной группе пациентов.

В нашем исследовании, проведенном в течение последних 7 лет, кандидемия была зафиксирована у 37 пациентов онкогематологического профиля, что составило 1 случай на 120 госпитализированных пациентов в год. Основными возбудителями кандидемии являлись *C. guilliermondii* (25%), *C. parapsilosis* (22,7%), *C. albicans* (18,2%). Мы также отметили увеличение доли грибов рода *C.* non-*albicans* в последние несколько лет, что совпадает с данными мировой литературы [3, 20]. Поверхностным объяснением таких эпидемиологических изменений является широкое применение азолов для профилактики и эмпирической терапии кандидозов, особенно флуконазола, высоко активного в отношении *C. albicans* и *C. tropicalis* [9, 21]. Однако следует подчеркнуть, что из 37 пациентов, составивших исследуемую группу, у 10 развитие кандидемии было вызвано использованием внутривенного контаминированного раствора хлорида калия, а еще у 4 весьма вероятно наличие единого внешнего источника. Таким образом, если оценивать лишь частоту спорадических кандидемий, спектр возбудителей был представлен следующим образом: *C. albicans* — 28%, *C. parapsilosis* — 25%, *C. guilliermondii* — 17%, *C. pelliculosa* — 14%, *C. krusei* — 7%, *C. tropicalis, C. lusitaniae, C. kefyr* — по 3%.

Развитие истинной эпидемии кандидемии позволяет говорить о том, что системная антимикотическая профилактика не защищает пациента от развития кандидемии, если причиной последней является инокуляция микромицета в кровоток.

Мы не исследовали очаги колонизации грибами рода *Candida* у пациентов ни до, ни после развития кандидемии, исходя из того факта, что убедительных и статистически значимых доказательств влияния колонизации на риск развития или исход кандидемии при проведении единственного многоцентрового рандомизированного проспективного исследования NEMIS получено не было [22].

Клиническая картина грибковой инфекции в исследуемой группе больных не отличалась от представленной в литературе: изолированная лихорадка и умеренные признаки системного воспалительного синдрома были у всех больных, клиническая картина тяжелого сепсиса примерно у 10% пациентов [9]. Развитие СШ в нашей группе пациентов было в 2 (5,4%) случаях, развитие ХДК — также у 2 пациентов. Чаще всего развивалась пневмония, случаев артрита и эндофтальмита не было.

При анализе чувствительности *C. albicans* отмечено, что 50% штаммов были устойчивы к флуконазолу. У 1 пациента было 4 ЭК. Штамм *C. albicans* в первом эпизоде был чувствителен к флуконазолу, и больной длительное время получал его в качестве вторичной профилактики. Три штамма, полученные у этого пациента при развитии следующих 3 ЭК, были устойчивы к флуконазолу. При анализе чувствительности грибов рода *C.* non-*albicans* к антимикотическим препаратам наиболее интересным представляется спектр чувствительности *C. guilliermondii*, 10 из 13 штаммов которой были устойчивы *in vitro* к каспофунгину, 10 — к итраконазолу, 9 — к флуконазолу, и 8 штаммов — ко всем 3 препаратам. Несмотря на такую чувствительность 7 пациентов из 10 получали каспофунгин (5 — в качестве монотерапии, 2 — в составе комбинированной терапии), летальный исход зарегистрирован только в 1 случае (у пациента с прогрессией ОМЛ, который в связи с ЭК получал комбинированную терапию, включающую каспофунгин и вориконазол), остальные 6 эпизодов были купированы (см. табл. 4). У 3 штаммов *C. pelliculosa* с течением времени было отмечено появление устойчивости к 4 препаратам, к которым ранее полученные штаммы были чувствительны.

Современные методы диагностики кандидемии довольно разнообразны: наряду с традиционно используемыми микроскопией, культуральным и гистологическим исследованием в настоящее время распространенными становятся серологические (определение маннана, антиманнановых антител, D-ара бинитола, 1,3-β-d-глюкана) и молекулярные (определение ДНК *Candida* с помощью полимеразной цепной реакции) методы определения и идентификации грибов рода *Candida*. Однако новые методы не входят в стандартные диагностические критерии [23–25].

Для выявления кандидемии, идентификации и определения спектра чувствительности к антимикотикам мы использовали классические микробиологические методы, при использовании которых кандидемия выявляется только у половины больных. Тем самым отсутствие выделения *Candida* из крови не исключает развития диссеминированного кандидоза; таких пациентов мы не включили в данное исследование.

На наш взгляд, актуален вопрос — откуда должен быть произведен забор крови для последующего микробиологического исследования. Учитывая контингент больных (дети с фебрильной нейтропенией, тромбоцитопенией), мы производили забор крови только из ЦВК, что более гуманно по сравнению с рекомендациями некоторых авторов о проведении многократных повторных посевов с интервалом в 1 час из периферической вены [26]. Так, Lecciones et al. показали, что из 155 пациентов с кандидемией у 58% больных *Candida* из крови была выявлена только однократно, вне зависимости от места забора крови — ЦВК и/или периферическая кровь — показатели летальности были схожими [27]. Основой современного подхода к профилактике ИК является использование азолов (флуконазол и итраконазол), большинство ис-

следований по профилактике азолами показали снижение частоты кандидозной инфекции и связанной с ней летальности [28, 29]. Однако широкое применение азолов для профилактики ИК привело к изменению эпидемиологической картины кандидемиии и росту резистентности грибов рода *Candida* к флуконазолу. Несмотря на проведение ПП у 31 (83,8 %) пациента из них азолы получали 28 (90%) пациентов. В нашем центре зарегистрировано 37 эпизодов доказанной кандидемии. Только у 2 пациентов получен рост *C. krusei* при применении азолов для профилактики. Больные с ОЛЛ не получали профилактику итраконазолом на фоне терапии винкристином в связи с риском опасных для жизни осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта [30]. Если принимается решение о проведении профилактики ИМ у пациентов из группы высокого риска, то лучше использовать препараты, обладающие широким спектром действия и позволяющие защитить и от аспергиллеза, например позаконазол, уровень доказательности A I.

Терапия кандидемии у больных с гематологическими и онкологическими заболеваниями, особенно у больных, находящихся в аплазии кроветворения, представляет очень сложную задачу. Необходимо добиться не только купирования всех признаков смертельно опасного осложнения, но и продолжать проведение специфической противоопухолевой терапии, которая, как известно, может вновь осложниться рядом тяжелых осложнений. Терапия кандидемии должна быть длительной не только для того, чтобы у странить сам факт кандидемии, но и чтобы санировать тканевые очаги. Согласно современным рекомендациям, терапия кандидемии должна проводиться в течение еще 2 нед с момента последнего положительного роста гемокультуры при условии полного разрешения всех клинически выявленных очагов и купирования всех симптомов, в частности лихорадки [31]. Не было проведено ни одного рандомизированного исследования с целью определения оптимальной терапии кандидемии у больных с нейтропенией.

Эмпирический подход к терапии ИМ является наиболее распространенным. Согласно современным рекомендациям (уровень доказательности A I), в качестве эмпирической противогрибковой терапии показано применение каспофунгина либо липосомального амфо-В, последний не зарегистрирован в России [32]. В рекомендациях по терапии ИК у пациентов с нейтропенией препаратами выбора также представлены эхинокандины или липидный комплекс амфо-В (уровень доказательности A II). Важно также руководствоваться чувствительностью различных видов *Candida*. Необходимо помнить о природной резистентности некоторых видов *Candida* к современным противогрибковым препаратам.

До сих пор нет обоснованных рекомендаций по комбинированной противогрибковой терапии, которая широко применяется, особенно у больных в нейтропении.

Удаление ЦВК при кандидемии согласно международным рекомендациям является общепринятым для пациентов с различными неонкогематологическими заболеваниями, у гематологических больных доказательств положительного влияния удаления ЦВК на исход кандидемии меньше. Удаление ЦВК всегда рекомендовано при выделении *C. parapsilosis* [32]. Важным терапевтическим действием при лечении кандидемии у данной категории больных служат усилия по восстановлению гранулоцитопоэза с помощью применения донорских гранулоцитов и/или стимуляции гемопоэза G-CSF [33].

В нашем исследовании показана исключительно важная роль восстановления гранулоцитопоэза — практически единственного независимого фактора успешной терапии ЭК, так как ни количество применяемых противогрибковых препаратов, ни удаление ЦВК (для всей группы) не показали статистически значимого влияния на исход этого осложнения.

В литературе описаны случаи повторных ЭК, вызванных тем же штаммом, что и при первом эпизоде, с частотой встречаемости до 15% [34]. В нашем исследовании все повторные ЭК, вызванные тем же штаммом, что и первый ЭК, были купированы.

Таким образом, атрибутивная летальность в анализируемой нами группе пациентов составила 16 %, что соответствует данным литературы [9, 19, 35]. Медиана от момента регистрации кандидемии до смерти составила 19,5 (8–67) дня.

У 5 больных из-за ЭК последующая специфическая терапия основного заболевания была вынужденно модифицирована: в 3 случаях были уменьшены дозы химиопрепаратов, в 2 — значительно удлинен интервал между курсами ХТ. Четверо из этих больных в последующем умерли от рецидива основного заболевания, что еще раз говорит о важной роли первичной противогрибковой профилактики и своевременной и адекватной терапии, которая должна проводиться согласно международным рекомендациям с использованием современных противогрибковых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pagano L., Girmenia C., Mele L., Ricci P., Tosti M.E., Nosari A. et al. Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. GIMEMA Infection Program; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto. Haematologica 2001;86:862–70.

2. Nucci M., Spector N., Bueno A.P., Solza C. et al. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer. Clin Infect Dis 1997;24:575–9.

3. Marr K.A., Seidel K., White T.C., Bowden R.A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. J Infect Dis 2000;181:309–16.
4. Marr K.A., Carter R.A., Crippa F., Wald A., Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2002; 34:909–17.
5. Groll A.H., Walsh T.J. Fungal infections in the pediatric patient. In: Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A., eds. Clinical mycology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone 2003; pp. 417–42.
6. Pagano L. et al. Chronic disseminated candidiasis in patients with hematologic malignancies. Clinical features and outcome of 29 episodes. Haematologica 2002;87:535–41.
7. Bodey G., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D. et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11:99–109.
8. Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002;34:7–14.
9. Viscoli C., Girmenia C., Marinus A., Collette L. et al. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Clin Infect Dis 1999;28:1071–9.
10. 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;63:77–85.
11. Marodi L., Johnston R.B. Jr. Invasive Candida species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management and innate host defense mechanisms. Curr Opin Pediatr 2007;19:693–7.
12. Kao A.S., Brandt M.E., Pruitt W.R. et al. The Epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. Clin Infec Dis 1999;29:1164–70.
13. Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V. et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35:19–25.
14. Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V. et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and South America for the SENTRY program. J Clin Microbiol 1998;36:1886–9.
15. Pfaller M.A., Jones R.N., Messer S.A. et al. SCOPE Participant Group: national surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans:* frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. Diagn Microbiol Inf Dis 1998;30:121–9.
16. Pfaller M.A., Messer S.A., Houston A. et al. National epidemiology of mycoses survey: multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. Diagn Microbiol Inf Dis 1998;31:289–96.
17. Rennert G., Rennert H.S., Pitlik S. et al. Epidemiology of candidemia: a nationwide survey in Israel. Infection 2000;28:26–9.
18. Wenzel R.P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. Clin Infect Dis 1995;20:1531–4.
19. Zaoutis T.E., Argon J., Chu J., Berlin J.A., Walsh T.J., Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. Clin Infect Dis 2005;41:1232–9.
20. Van Burik J.A., Ratanatharathorn V., Stepan D.E. et al. Micafungin versus fluconazole for prophylaxis against invasive fungal infections during neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 2004;39:1407–16.
21. Trick W.E., Fridkin S.K., Edwards J.R. et al. Secular trend of hospital acquired candidemia among intensive care unit patients in the USA during 1989–1999. Clin Infect Dis 2002;35:627–30.
22. Blumberg H. et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. Clin Infect Dis 2001;33:177–86.
23. Ellepola A.N.B., C.J. Morrison. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005;43:65–84.
24. Fasahat F.A., Mustafa A.S., Khan Z.U. Comparative evaluation of (1, 3)-β-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC Infectious Diseases 2007:7:103–11.
25. Morace G., Pagano L. et al. PCR-Restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. J Clin Microbiol 1999;37:1871–5.
26. Horstkotte D. et al. Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary; the task force on infective endocarditis of the European society of cardiology Eur Heart J 2004;25:267–76.
27. Lecciones J.A., Lee J.A., Navarro E.E. et al. Vascular catheter-associated fungemia in patients with cancer: analysis of 155 episodes. Clin Infect Dis 1992; 14:875–83.
28. Bow E.J., Laverdiere M. et al. Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta-analysis of randomized-controlled clinical trials. Cancer 2002;94:3230–46.
29. Marr K., Seidel K., Slavin M.A. et al. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long term follow-up of a randomized placebo-controlled trial. Blood 2000;96:2055–61.
30. Kamaluddin M., McNally P., Breathach F. et al. Potentiation of vincristine toxicity by itraconazole in children with lymphoid malignancies. Acta Paediatr 2001 Oct; 90(10):1204–7.
31. Raad J., Tarrand J., Hanna H. et al. Epidemiology, molecular mycology and environmental sources of Fusarium infection in patients with cancer. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23:532–7.
32. ECIL-2, 2007, antifungal therapy guidelines. http://www.eortc.be/services/unit/idg/documents/06.Antifungaltherapy.pdf.
33. Price T., Bowden R., Boeckh M. et al. Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2000;95:3302–9.
34. Sychev D., Maya I., Allon M. Clinical outcomes of dialysis catheter – related candidemia in hemodialysis patients. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:1102–5.
35. Morgan J., Meltzer M.I., Plikaytis B.D. et al. Excess mortality, hospital stay and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:540–7.

Herpes zoster у больных множественной миеломой на фоне лечения бортезомибом

И.Н. Назарова[1], М.Н. Протасова[2], Н.А. Никишина[2]
[1]МЛПУ Красногорская больница № 1;
[2]онкологическое диспансерное отделение МЛПУ Красногорская больница № 3

Контакты: *Ирина Николаевна Назарова irinanaz@mail.ru*

Успехи в лечении множественной миеломы (ММ) в последние годы связаны с применением новых препаратов, в том числе бортезомиба. Опыт широкого использования препарата в амбулаторной практике подтверждает успех терапии этого тяжелого заболевания, но вместе с тем выявляет наиболее часто встречающиеся осложнения на фоне лечения. Одним из наиболее значимых является реактивация Herpes zoster, которая приводит к ухудшению результатов лечения миеломы в связи с невозможностью выполнения стандартов терапии у данной категории пациентов. В статье приводятся литературные данные и собственные наблюдения частоты осложнений Herpes zoster на фоне терапии бортезомибом в различных комбинациях и моносхеме, которая варьирует от 7 до 34%, по данным разных авторов, и составляет 25% по собственным наблюдениям. Приведены схемы лечения и профилактики этого осложнения.

Ключевые слова: *множественная миелома, бортезомиб, Herpes zoster, противовирусная терапия, ацикловир*

Herpes zoster in multiple myeloma patients during bortezomib treatment

I.N. Nazarova[1], M.N. Protasova[2], N.A. Nikishina[2]
[1]Krasnogorsk Hospital № 1; [2]Krasnogorsk Hospital №3

Recent advances in multiple myeloma (MM) treatment associated with new drug use including bortezomib. Experiences in wide ambulatory drug use confirm therapy success for this serious disease, but at the same time reveals the most common side effects. One of the most significant is the reactivation of Herpes zoster, which leads to decrease MM therapy results because of inability to perform standard therapy in these patients. Literature data and own experiences about reactivation of Herpes zoster during bortezomib therapy as monotherapy and in combination, which varies from 7 to 34% according to different authors and 25% of own experiences, is presented. Treatment and preventive schedule of this complication are shown.

Key words: *multiple myeloma, bortezomib, Herpes zoster, antiviral therapy, aciclovir*

Множественная миелома (ММ) — парапротеинемический гемобластоз, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки и их лимфоидные предшественники.

В последнее 10-летие в лечении этого заболевания используется бортезомиб — первый препарат из группы ингибиторов протеасом.

В амбулаторной практике с успехом применяется программа VMP, в которую включен велкейд в сочетании с алкераном и преднизолоном, не только как 1-я линия терапии, но и в случаях рефрактерности к предшествующему лечению без использования велкейда.

В целом препарат хорошо переносится и удобен для использования в амбулаторной практике. Тем не менее он не лишен нежелательных явлений, наиболее значимыми из которых являются полинейропатия и тромбоцитопения. Также довольно часто встречается активация герпетической (*Herpes zoster*, опоясывающий лишай) инфекции в процессе лечения пациентов с ММ программами химиотерапии (ХТ), содержащими велкейд.

Известно, что *Herpes zoster* (HZ, VZV-инфекция) может осложнять течение лимфопролиферативных заболеваний. Это вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, симптомами интоксикации, поражением межпозвоночных ганглиев и появлением везикулярной экзантемы по ходу вовлеченных в процесс чувствительных нервов. HZ и ветряная оспа вызываются одним и тем же вирусом из семейства герпесвирусов (Herpesviridae). Источником инфекции является человек, больной ветряной оспой или опоясывающим лишаем, заболевание передается воздушно-капельным или контактным путем. В результате первичного заражения развивается ветряная оспа, а HZ возникает в результате реактивации возбудителя. Предполагают, что при ветряной оспе вирус накапливается в задних корешках спинного мозга и спинномозговых ганглиях, где и находится в латентном состоянии до момента реактивации. Опоясывающий герпес характеризуется односторонними везикулярными высыпаниями в пределах одного дерматома, часто сопровождающимися сильными болями. Обычно в процесс вовлекаются дерматомы от третьего грудного до третьего поясничного. Заболевание начинается с появления боли в пределах пораженного дерматома, за которой через 48–72 часа следуют кожные проявления, макулопапулезная сыпь, быстро прогрессирующая до везикул. Как правило, эти элементы остаются немногочисленными и продолжают

формироваться в течение 3–5 дней. Общая продолжительность заболевания 7–10 дней, однако полное восстановление нормального состояния кожи наступает через 2–4 нед. Наиболее изнуряющее пациента осложнение HZ — это боль, сочетающаяся с острым невритом и постгерпетической невралгией. У лиц с ослабленным иммунитетом заболевание протекает тяжелее, длительность его увеличивается не менее чем вдвое, чаще отмечаются осложнения в виде менингоэнцефалита, пневмонита, гепатита. Однако летальные исходы редки даже у лиц с иммунодефицитом [1]. По мере все более широкого применения велкейда в лечении ММ стали накапливаться данные об увеличении частоты виру сных инфекций и в частности опоясывающего герпеса у данной категории больных. В настоящее время опубликован ряд статей, посвященных данной проблеме, однако результаты исследований и статистические данные в них подчас противоречивы [4, 8, 9, 11].

Хотя еще в 1974 г. W.L. Morison, а в настоящее время A. Chanan-Khan et al., доказывали, что сама ММ не является фактором риска развития герпетической инфекции, так как дефицит гуморального иммунитета, характерный для этого заболевания, не так отчетливо связан с реактивацией виру са, как изменения клеточного звена иммунной системы, в литературе приводятся и другие данные [5, 10]. В публикации P. Schutt et al. имеются сведения о том, что наряду с гуморальным иммунодефицитом при ММ присутствуют значительные изменения клеточного иммунитета [13]. Авторы отмечают редукцию $CD4^+/45RO^+$; $CD19^+$, $CD3^+/HLA\text{-}DR^+$-лимфоцитов, NK-клеток так же, как и уровня нормальных иммуноглобулинов у пациентов уже в дебюте заболевания. Предшествующая ХТ у пациентов в рецидиве болезни ведет к дальнейшему снижению $CD4^+$, $CD4^+/45RO^+$-лимфоцитов. Известно, что такие оппортунистические инфекции, как цитомегаловирусная, пневмоцистная, HZ, ассоциируются с уменьшением $CD4^+$, $CD4^+/45RO^+$ и $CD19^+$-лимфоцитов. Таким образом, нельзя полностью отрицать тот факт, что сама ММ является фактором, предрасполагающим к развитию указанных заболеваний.

Бортезомиб, ингибируя NF-kB, вызывает у силение апоптоза миеломных клеток, снижает экспрессию цитокинов ангионеогенеза, а также стромальную адгезию опухолевых клеток, однако его воздействие на Т-клеточный иммунитет слабо выражено согласно исследованиям B. Blanco и D. Maseda et al. [4, 8]. Эти данные ставят под сомнение выраженное повреждающее действие велкейда на $CD4^+$, $CD8^+$, $CD56^+$ популяции клеток. Супрессивный эффект бортезомиба заключается, в основном, в воздействии на незрелые дендритные клетки, в то время как зрелые моноциты сохраняют свой фенотип и способность к аллостимуляции. В то же время в работе M. Basler et al. отмечается, что лечение бортезомибом приводит к уменьшению количества $CD8^+$-Т-лимфоцитов, что увеличивает чувствительность организма к вирусным инфекциям [3].

Также существует ряд противоречий в данных о развитии VZV-инфекции на фоне применения велкейда у пациентов с ММ.

В работе C.A. Dasanu и D.T. Alexandrescu приводятся собственные данные о частоте возникновения опоясывающего герпеса у 7 % из 40 пациентов с ММ во время лечения велкейдом [6]. У пациентов, получающих системные стероиды, частота возникновения HZ составляла 12 % и более, в связи с чем авторы высказывают сомнения в достоверности влияния бортезомиба на развитие герпетической инфекции и считают нецелесообразным применение противовирусных препаратов с профилактической целью, учитывая нефротоксичность ацикловира. A. Palumbo et al. при оценке результатов лечения 30 пациентов по программе VMPT сообщил о реактивации опоясывающего герпеса у 7 % из них [11]. После применения профилактического лечения ацикловиром случаев герпетической инфекции не было зарегистрировано. В работе M.V. Mateos et al., изучавших результаты применения программы VMP у пациентов старше 65 лет, в ходе исследования у 13 % из первых 38 пациентов, включенных в протокол, зарегистрирована реактивация HZ. В дальнейшем в протокол исследования введена профилактическая противовирусная терапия ацикловиром, после чего только у 2 из 30 пациентов развился опоясывающий герпес [9].

Большое исследование по изучению влияния бортезомиба на развитие HZ выполнено корейской группой ученых, занимающихся изучением ММ [7]. Ими проведен ретроспективный анализ эпизодов опоясывающего герпеса среди 282 больных ММ, получающих бортезомибсодержащие режимы лечения. До лечения бортезомибом частота возникновения HZ составила 11 %, а в течение первых 3 циклов терапии с применением велкейда она составила 22,3 %. Причем не было установлено связи с длительностью, стадией заболевания, предшествующей герпетической инфекцией, интенсивностью предварительной терапии. В отечественной литературе имеются сообщения о высокой частоте герпетической инфекции в процессе монотерапии бортезомибом и в сочетании с дексаметазоном. Так, в работе Т.И. Поспеловой и соавт. герпетическая инфекция отмечена у 34 % из 25 пациентов с ММ, получавших указанную терапию [2].

Таким образом, частота возникновения осложнений, связанных с реактивацией HZ, на фоне применения велкейда в различных комбинациях и в монорежиме, по данным разных авторов, варьирует от 7 до 34 %.

Методы профилактики этого осложнения у данной категории пациентов также активно изучаются. В работе L. Pour et al. из 98 пациентов с рецидивом ММ, принимающих велкейд, 11 — не получали профилактического противовирусного лечения, 32 пациента принимали ацикловир в дозе 400 мг 3 раза в день,

Таблица 1. *Клиническая характеристика больных ММ*

Число больных	Средний возраст (лет)	Стадия заболевания	Тип PIg	Схемы лечения	Количество случаев HZ
24 (100 %)	68 (55–85)	II — 2 IIIA — 14 IIIБ — 8	G(k) — 12 G(л) — 5 A(k) — 1 A(л) — 2 Bj(k) — 1 Bj(л) — 2 Несекретирующая — 1	VMP — 18 MP — 2 VMCP — 2 Монотерапия велкейдом — 2	6 (25 %)

V – велкейд; M – мелфалан (алкеран); P – преднизолон; C –циклофосфан.
VMP (с 1-го по 4-й цикл): V – 1,3 мг/м² в/в в 1, 4, 8, 11, 22, 25, 29, 32-й дни (цикл 32 дня, перерыв 10 дней); M – 9 мг/м² с 1-го по 4-й дни; P – 60 мг/м² внутрь с 1-го по 4-й дни. С 5-го по 9-й цикл: V – 1,3 мг/м² в/в в 1, 8, 22, 29-й дни (цикл 32 дня, перерыв 10 дней); M – 9 мг/м² с 1-го по 4-й дни; P – 60 мг/м² внутрь с 1-го по 4-й дни.
MP: M – 9 мг/м² с 1-го по 7-й дни; P – 60 мг внутрь с 1-го по 7-й дни с отменой с 8-го по 20-й дни.
VMCP: V – 1,3 мг/м² в/в в 1, 4, 8, 11-й дни (цикл 28 дней); M – 9 мг/м² с 1-го по 4-й дни; P – 60 мг внутрь с 1-го по 4-й дни; C – 400 мг в/в с 1-го по 4-й дни цикла.
Монотерапия велкейдом: V – 1,3 мг/м² в/в в 1, 4, 8, 11-й дни, перерыв 2 нед.

а 55 пациентов — в дозе 400 мг 1 раз в день в течение всего периода лечения [12]. В 1-й группе частота развития HZ составила 36 %, а у получавших ацикловир пациентов этого осложнения не было независимо от дозы ацикловира. Авторы предлагают применять ацикловир в дозе 400 мг в сутки в течение всего периода лечения велкейдом.

Такого же мнения придерживаются E. Vickrey et al., которые предлагают проводить долговременную противовирусную профилактику пациентам, получающим велкейд в монорежиме или в сочетании с кортикостероидами [14]. В своем исследовании они применяли ацикловир в дозе 400 мг в день, а в случае нарушения функции почек (при уровне креатинина >2 мг/дл) — в дозе 200 мг в день. Для этих же целей использовали валацикловир в дозе 250–500 мг в день и фамцикловир в дозе 500 мг в день. Ни у одного из 125 пациентов, включенных в исследование, не было зафиксировано случаев реактивации HZ. При этом следует отметить, что у большинства пациентов (n = 104) имелся рецидив заболевания или рефрактерность к предшествующей терапии.

Под нашим наблюдением с 2007 по 2009 г. находились 24 пациента с диагнозом ММ, в лечении которых использовался велкейд как в моноварианте, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами: алкераном, преднизолоном, циклофосфаном в качестве 1-й линии терапии (табл. 1). Разнообразие схем терапии объясняется тем, что в амбулаторной практике лечение проводится всем пациентам без исключения с учетом полиморбидности, социальных и организационных особенностей в отличие от клинических исследований. Средний возраст больных составил 68 лет. На фоне лечения у 6 из них отмечено развитие HZ в процессе лечения с типичными клиническими симптомами, что составило 25 % (табл. 2). У всех этих пациентов была III стадия заболевания. Среди больных, получавших терапию по программе VMP, реактивация инфекции выявлена в 2 случаях

Таблица 2. *Частота развития HZ в зависимости от схем лечения*

Программа химиотерапии	Количество случаев HZ
VMP 3 курса	2
VMP 1 курс	1
VMCP 4 курса	1
Монотерапия велкейдом 3 курса + VMP 1 курс	1
Монотерапия велкейдом	1

после 3 курсов и в 1 случае после первого курса ХТ. Также развитие HZ зафиксировано у 1 пациента после первого курса монотерапии велкейдом, у 1 — после 3 курсов монотерапии велкейдом и 1 курса VMP и у 1 — после 4 курсов VMCP.

Течение инфекции было различным: в 2 случаях заболевание протекало легко, болевой синдром был умеренным, кожные высыпания регрессировали в течение нескольких дней и не рецидивировали в дальнейшем. У 1 пациента имело место рецидивирующее течение инфекции, но с умеренным болевым синдромом. Обострение герпеса возникало после каждого курса VMP и требовало активной противовирусной терапии. В 2 случаях отмечалось тяжелое течение HZ, характеризующееся выраженным болевым синдромом, необходимостью постоянного приема анальгетиков, рецидивирующим течением, несмотря на временное прекращение ХТ и активное лечение ацикловиром, валтрексом. В одном из них лечение ММ не возобновлялось в течение года из-за рецидивирующего течения HZ. Летальных исходов не было. Не выявлено связи между развитием герпетической инфекции и статусом пациента по ECOG ВОЗ, а также режимом ХТ. Наиболее тяжелое течение наблюдалось у пациентов, получавших исходно монотерапию велкейдом.

Всем больным продолжено лечение по проводимым ранее программам ХТ, но у 2 пациентов с наиболее тяжелым и длительным течением HZ снижена доза велкейда до 1 мг/м^2, кратность введения уменьшена до 1 раза в нед. Обязательно проводилась профилактика рецидивов HZ. Так как в настоящее время не существует единой схемы профилактического лечения, ацикловир применялся индивидуально с учетом тяжести течения инфекции, переносимости препарата, состояния функции почек. В 3 случаях пациентам с нарушением клиренса креатинина ацикловир назначался по 200 мг в сутки на все время введения велкейда (с 1-го по 11-й дни). Подобные рекомендации наиболее часто встречались в литературе [12].

У 1 пациента с сохранной функцией почек и рецидивирующим течением HZ доза ацикловира составляла 400 мг в сутки на период лечения велкейдом (с 1-го по 11-й дни курса).

При наиболее тяжелом течении инфекции у 2 пациентов ацикловир назначался в дозе 800 мг в сутки в дни введения велкейда и последующие 1–2 дня и в дозе 200 мг в остальные дни курса.

При использовании таких схем лечения рецидивов HZ при продолжении лечения велкейдом не отмечено в течение года наблюдения.

Выводы

Таким образом, многие исследователи в настоящее время признают, что реактивация вируса HZ становится значимой клинической проблемой в процессе лечения ММ бортезомибом. Частота этого осложнения колеблется от 7 до 34 %, по данным литературы. В нашей работе этот показатель составляет 25 %, что требу ет включения противовирусных препаратов в борте зомибсодержащие программы лечения ММ в профилактических целях. Показана эффективность применения ацикловира как хорошо переносимого и доступного препарата, снижающего риск развития опоясывающего герпеса и позволяющего не прекращать программное лечение велкейдом у этих больных. Оптимальной, на наш взгляд, и наиболее часто рекоменду емой является следующая схема профилактики — назначение ацикловира в дозе 200–400 мг в сутки на все время введения велкейда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Внутренние болезни. Под ред. Т.Р. Харрисона, т. 4. М.: «Медицина», 1994.
2. Поспелова Т.И., Скворцова Н.В., Ковынев И.Б. и др. Эффективность бортезомиба в терапии рецидивов и рефрактерных форм множественной миеломы. Гематол и трансфузиол 2009;54(1):43.
3. Basler M., Lauer C., Beck U. et al. The proteasome ingibitor bortezomib enhances the susceptibility to viral infection. J Immunol 2009;183:6145–50.
4. Blanco B., Perez-Simon J.A., Sanchez-Abarca L.I. et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. Blood 2006;107:3575–83.
5. Chanan-Khan A., Sonneveld P., Schuster M.W. et al. Analysis of *Herpes Zoster* events among bortezomib-treated patients in phase III APEX study. J Clin Oncol 2008;26:4784–90.
6. Dasanu C.A., Alexandrescu D.T. Does bortezomib induce de facto varicella zoster virus reactivation in patients with multiple myeloma? J Clin Oncol 2009;27(13):2293–4.
7. Kim S.J., Kim K., Kim B.S. et al. Bortezomib and the increased incidence of herpes zoster in patients with multiple myeloma. Clin Lymph Myel 2008;8(4):237–40.
8. Maseda D., Meister S., Neubert K. et al. Proteasome ingibition drastically but reversibly impairs murine lymphocyte development. Cell Death Differ 2008;15:600–12.
9. Mateos M.V., Hernandes J.M., Hernandes M.T. et al. Bortesomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase ½ study. Blood 2006;108:2165–72.
10. Morison W.L. Letter: *Herpes simplex* and *herpes zoster* in neoplasia. Lancet 1974;1:1293.
11. Palumbo A., Ambrosini M.T., Benevolo G. et al. Bortezomib, melphalan, prednisone and thalidomide for relapsed multiple myeloma. Blood 2007;109(7):2767–72.
12. Pour L., Adam Z., Buresova L. et al. *Varicella-zoster* virus prophylaxis with low-dose acyclovir in patients with multiple myeloma treated with bortezomib. Clin Lymph Myel 2009;9(2):151–3.
13. Schutt P., Brandhorst D., Stellberg W. et al. Immune parameters in multiple myeloma patients: Influence of treatment and correlation with opportunistic infections. Leuk Lympoma 2006;47:1570–82.
14. Vickrey E., Allen S., Mehta J. et al. Acyclovir to prevent reactivation of *varicella zoster* virus *(herpes zoster)* in multiple myeloma patients receiving bortezomib therapy. Cancer 2009; 115:229–32.

Патогенетическая коррекция анемии эритропоэзстимулирующими препаратами у больных лимфопролиферативными заболеваниями (обзор литературы)

Н.А. Романенко, К.М. Абдулкадыров

ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: *Николай Александрович Романенко rom-nik@yandex.ru*

В статье представлен обзор литературы по патогенезу анемического синдрома (АС) у больных с опухолевыми заболеваниями лимфатической системы. Показаны преимущества и недостатки эритропоэзстимулирующих препаратов (Э ПСП), используемых для коррекции АС. Проведен анализ результативности лечения анемического синдрома с помощью Э ПСП при различных видах лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ). Выделены прогностические факторы, позволяющие предсказать положительный ответ ЭПСП у больных ЛПЗ и снижающие стоимость лечения больных.

Ключевые слова: *анемический синдром, неходжкинские лимфомы, лимфопролиферативные заболевания, множественная миелома, лечение анемии, эритропоэтин, эритропоэзстимулирующие препараты, цитокины, химиотерапия, трансфузии эритроцитов*

Patogenetic correction of anemia with erythropoiesis-stimulating agents in lymphoproliferative disorders (literature review)

N.A. Romanenko, K.M. Abdulkadyrov

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russian Federal Medico-biological Agency, St.-Petersburg

Literature review of anemia pathogenesis in patients with lymphatic system malignancies is presented. Advantages and disadvanta ges of eritropoiesis-stimulating preparations (ESP) used for anemia correction are shown. Efficacy of anemia treatment with ESP in various types of lymphoproliferative disorders (LPD) is presented. Prognostic factors that predict positive response on ESP in LPD pati ents and reduce treatment cost are identified.

Key words: *anemic syndrome, non Hodgkin's lymphomas, lymphoproliferative disorders, multiple myeloma, anemia treatment, erythropoietin, erythropoiesis-stimulating agents, cytokine, chemotherapy, red blood cell transfusion*

Введение

Лимфопролиферативные заболевания (ЛПЗ) — это гетерогенная группа опухолевых заболеваний, характеризующихся поражением лимфатической ткани. Она включает в себя острый лимфобластный лейкоз/лимфобластную лимфому; болезнь Ходжкина, или лимфогранулематоз (ЛГМ); агрессивные и индолентные неходжкинские лимфомы (НХЛ); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); множественную миелому (ММ). Среди многочисленной клинической симптоматики ЛПЗ одним из частых проявлений является анемический синдром (А С), который отягощает физическое состояние пациентов, осложняет течение, ухудшает прогноз основного заболевания и сокращает продолжительность жизни [1–3]. Анемия у больных ЛПЗ, особенно с индолентными формами, выступает «индикатором», указывающим на необходимость проведения химиотерапии (ХТ) или смену линии ХТ [4]. А С проявляется у 30–70 % пациентов различными вариантами лимфоидных неоплазий и зависит от вида, стадии заболевания и проводимого противоопухолевого лечения [5–10]. Т ак, M. Steurer et al. показали, что частота анемии у пациентов с ЛПЗ возрастала в 2 раза после проведения ХТ и наблюдалась у 77,4 % больных ММ, у 73,7 % с НХЛ и у 54,5 % пациентов с ЛГМ [11]. L. Dawn et al., проведя ретроспективный анализ более 41 100 историй больных злокачественными опухолевыми заболеваниями, включая ЛПЗ, отметили, что анемия наблюдалась у 62% пациентов, которым проводилось химиотерапевтическое лечение. При этом 22 % пациентов получили хотя бы 1 трансфузию эритроцитов [12].

АС проявляется общей слабостью, быстрой утомляемостью, головной болью, снижением умственной и физической активности, подавленностью, одышкой, бледностью кожных покровов, тахикардией. В некоторых случаях при А С выявляется снижение артериального давления. Пожилые пациенты нередко указывают на появление или учащение приступов стенокардии [13]. Многообразная симптоматика анемии в конечном счете в значительной мере ухудшает качество жизни больных, приводя к депрессии, потере трудоспособности и дезадаптации в семейной и общественной жизни [14, 15]. Кроме того, анемия ухудшает прогноз течения солидных опухолей, ММ, лимфом и лейкозов [1, 3, 9]. Так, L. Moullet et al. [7], изучив продолжительность жизни

1077 больных с НХЛ, показали, что медиана общей выживаемости (ОВ) у пациентов с анемией была существенно ниже и составляла 47 мес, в то время как у больных без анемии — 146 мес. Следует также подчеркнуть, что у пациентов с анемией в период проведения ХТ или комбинированного лечения снижаются и противоопухолевый эффект терапии, и ОВ [1, 3].

Патогенез анемии при лимфопролиферативных заболеваниях

В патогенезе анемии у больных ЛПЗ участвуют многие механизмы. К ним относятся: 1) вытеснение кроветворных клеток костного мозга (КМ), в частности эритроидных элементов, и замещение их опухолевыми клетками; 2) гемолиз эритроцитов со значительным уменьшением продолжительности их жизни [16, 17]; 3) нарушение выработки эндогенного эритропоэтина (ЭЭ) [18, 19]; 4) угнетение эритроидного ростка провоспалительными цитокинами (интерлейкин-1β, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли- α, интерфе рон-γ) [20–24]; 5) повышение продукции гормона гепсидина, блокирующего выработку ферропортина, с последующим функциональным дефицитом железа [25–28]; 6) нарушение питания (дефицит белков, витаминов); 7) усиленное депонирование и секвестрация клеток крови в селезенке (при гиперспленизме); 8) избыточный фиброз костной ткани; 9) усиление свободно-радикального окисления липидов (в процессе противоопухолевого лечения увеличивается продукция свободных радикалов и снижается антиоксидантная защита организма) [29, 30]; 10) геморрагический синдром [29]. Вместе с тем ведущими механизмами анемии у больных ЛПЗ являются опухолевая инфильтрация КМ и подавление эритропоэза провоспалительными цитокинами, приводящие к низкой продукции ЭЭ, снижению чувствительности клеток эритрона к стимулирующему действию эритропоэтина.

Известно, что ХЛЛ и некоторые формы НХЛ в активной фазе часто характеризуются практически тотальной опухолевой инфильтрацией КМ [31]. У таких пациентов нормальный гемопоэз значительно подавлен и при стандартном морфологическом исследовании трепанобиоптата и пунктата КМ часто представлен единичными клеточными элементами. Эритроидный росток может даже не выявляться при микроскопии (красноклеточная аплазия) [17]. Все это приводит к развитию выраженной или тяжелой анемии. У этой категории больных главным методом патогенетического лечения анемии является противоопухолевое лечение, позволяющее редуцировать объем опухолевых клеток и тем самым добиться постепенного восстановления нормального гемопоэза и клеток эритрона. Эффективным же средством коррекции анемии будут лишь многократные переливания эритроцитсодержащих сред (ЭСС), имеющие, к сожалению, недлительный эффект.

В регуляции эритропоэза ключевую роль играет эритропоэтин, продуцируемый перитубулярными клетками (фибробластоподобные клетки), которые локализуются в интерстициальных пространствах между извитыми канальцами коркового вещества почек, и в небольшом количестве — клетками печени [32]. Сывороточная концентрация ЭЭ в организме здорового человека составляет 5–30 мМЕ/мл [33] или 2,6–34,0 нмоль/л [34]. Синтез и поступление этого гормона в кровоток регулируется изменениями парциального давления кислорода в тканях и в венозной крови. Следовательно, сывороточная концентрация эритропоэтина линейно зависит от степени тяжести анемии и обратно — от уровня гематокрита и гемоглобина. Так, например, уровень ЭЭ при анемии, сердечной, легочной недостаточности, отравлении окисью углерода или кобальтом, повышении сродства кислорода к гемоглобину (например, фетальный гемоглобин — HbF), пребывании в условиях высокогорья у здорового человека всегда компенсаторно повышается. Увеличение уровня эритропоэтина в сыворотке крови приводит к симптоматическим эритроцитозам, если кроветворный росток сохранен [32]. Таким образом, анемия, являясь также фактором гипоксии, приводит к увеличению продукции эритропоэтина, и, как следствие, к повышению производства эритроцитов с подъемом уровня гематокрита и гемоглобина крови (табл. 1) [33].

Таблица 1. *Зависимость концентрации сывороточного эритропоэтина от уровня гематокрита и гемоглобина*

Уровень гематокрита (%) /Уровень гемоглобина (г/л)/	Концентрация сывороточного эритропоэтина (мМЕ/мл)
Норма > 36–45 /120–140/	= 5–30
30–33 /100–110/	< 50
27–30 /90–100/	< 100
24–27 /80–90/	< 180
21–24 /65–80/	< 300
18–21 /50–65/	< 450

При заболеваниях почек, сопровождающихся хронической почечной недостаточностью, наблюдают иную картину. У таких пациентов часто выявляется стойкая анемия, которая связана с крайне низким или практически полным отсутствием синтеза ЭЭ. Коррекция такой анемии с помощью трансфузий ЭСС приносит лишь кратковременный эффект, а избыток железа, образующийся в ходе естественной деградации гемоглобина, постепенно приводит к гемосидерозу внутренних органов. Поэтому стандартом для этой категории больных уже на протяжении более 2 десятков лет является назначение эритропоэзстимулирующих препаратов (ЭПСП). При ЛПЗ, а особенно при ММ, также может наблюдаться поражение почек (миеломная почка), что часто приводит к снижению синтеза

ЭЭ и развитию АС [14]. Некоторые исследователи отмечают, что продукция ЭЭ может обратно пропорционально зависеть от степени вязкости плазмы крови больных ММ, лимфоплазмоцитарной НХЛ и макроглобулинемией Вальденстрема [35, 36]. Влияние ХТ, особенно высокодозной, также может приводить к недостаточной продукции ЭЭ и развитию анемии, часто наблюдаемой после аллогенных трансплантаций [18].

Однако далеко не всегда при ЛПЗ наблюдаются выраженные нарушения функции почек и низкая продукция ЭЭ. Нередко отмечается и противоположная картина: в сыворотке крови больного выявляется нормальный или повышенный уровень эритропоэтина, и при этом имеет место клиника анемии. Так, B. Han et al. [37] сравнили уровень ЭЭ в сыворотке крови у больных НХЛ, ММ и ХЛЛ с анемией и установили, что он был достоверно выше, чем у здоровых доноров с нормальным уровнем гемоглобина (97,8 ± 183,9 МЕ/л против 27,8 ± 85,4 МЕ/л соответственно; $p < 0,01$). Однако авторами не обнаружено достоверной корреляции между уровнем гемоглобина (тяжестью анемии) и сывороточного эритропоэтина ($r = –0,14$). Это косвенно указывает на то, что при ЛПЗ в патогенезе анемии может принимать участие как недостаточная продукция эритропоэтина клетками почек, так и низкая к нему чувствительность клеток эритрона. Данная гипотеза была подтверждена также и O.A. Tsopra et al., которые часто не выявляли дефицит ЭЭ у больных ХЛЛ, а наблюдали нормальный или повышенный уровень сывороточного эритропоэтина и низкую чувствительность клеток эритрона к ЭЭ [31]. Для достижения положительного эффекта от действия эритропоэтина на эритрон требуется более высокая концентрация ЭЭ. A. Osterburg et al. [38] сравнили эффективность различных доз рекомбинантного эритропоэтина и плацебо для коррекции анемии у больных ЛПЗ и установили, что низкие дозы препарата (2000 МЕ) неэффективны (14%) и сопоставимы с плацебо (24%). Повышение же дозы до 5000 МЕ увеличивало результативность до 42%, а доза 10000 МЕ — до 60%. Таким образом, порог низкой чувствительности клеток эритрона к рекомбинантному эритропоэтину может быть преодолен за счет значительного увеличения дозы препарата.

Какие же механизмы могут снижать чувствительность предшественников эритропоэза к эритропоэтину? Известно, что в результате взаимодействия иммунной системы с опухолью клетками иммунной системы продуцируются провоспалительные цитокины (интерлейкин-1, интерлейкин-6, факторы некроза опухоли-α и β (ФНО), интерферон-γ и др.). Они играют важную роль в иммунном ответе организма на опухоль и воспалительных реакциях. Эти цитокины также играют ключевую роль в развитии АС. Повышение уровня цитокинов в крови больных ЛПЗ приводит не только к противоопухолевому эффекту, но и к супрессорному воздействию на ранние предшественники эритропоэза (бурстобразующие и колониеобразующие единицы) за счет усиления апоптоза в КМ и угнетения клеток эритрона. Так, например, при анемии у пациентов ЛПЗ уровень интерлейкина-1β увеличивается в 3,4 раза по сравнению с таковым у больных без анемии, ФНО-α — в 2,8 раза, интерферона-γ — в 14,4 раза [39]. Более того, у пациентов с индолентными формами лимфом выявлена еще бóльшая разница в уровне провоспалительных цитокинов, что обусловлено, по-видимому, большим объемом опухолевой массы, меньшей агрессивностью опухолевого субстрата по сравнению с пациентами с агрессивными вариантами лимфом. Кроме того, провоспалительные цитокины снижают экспрессию гена эритропоэтина в почечной ткани, что ведет к подавлению выработки ЭЭ [14, 33, 40]. Интерлейкин-1β и ФНО-α опосредованно, за счет увеличения продукции интерферона-γ, угнетают выработку интерлейкина-6, который является синергистом эритропоэтина и, следовательно, при его снижении развивается анемия [39]. Помимо вышеописанных механизмов супрессивного эффекта, цитокины способствуют снижению освобождения железа из макрофагов с последующим нарушением ассимиляции его в эритроциты. Кроме того, цитокины способствуют повышению уровня ферритина и уменьшению содержания активного сывороточного железа, усугубляя тем самым анемию [27]. Таким образом, провоспалительные цитокины вызывают снижение содержания сывороточного железа путем усиления синтеза ферритина и депонирования железа в макрофагах и гепатоцитах, приводя к так называемому функциональному дефициту железа [20, 26, 28]. Функциональный дефицит железа также может усугубляться за счет увеличения выработки гормона гепсидина, который приводит к снижению уровня ферропортина и, как следствие, к уменьшению активного железа в сыворотке крови.

Таким образом, с учетом вышеупомянутых механизмов развития АС у больных ЛПЗ ЭПСП могут быть использованы для коррекции анемии. Однако доза препарата должна значительно превышать ту, которую используют для лечения анемии у пациентов с хронической почечной недостаточностью, основным механизмом развития которой является дефицит ЭЭ.

Способы коррекции хронической анемии

Экспертами ВОЗ предложена классификация хронических анемий по степени тяжести в зависимости от уровня гемоглобина в крови (табл. 2). Особенность классификации заключается в том, что, основываясь на количественном лабораторном показателе (уровень Hb), врачу удобно выбирать тактику коррекции АС пациента в зависимости от степени тяжести анемии.

Так, показанием для трансфузий эритроцитов (ТЭ) служит выраженная и тяжелая (угрожающая жизни) анемия. Однако в пожилом возрасте, при наличии признаков сердечной недостаточности, особенно на

фоне ХТ, показания для ТЭ расширяются и переливания эритроцитов необходимо проводить даже при умеренной анемии с уровнем гемоглобина < 100 г/л [34, 41]. У этой категории больных расширяют показания для ТЭ, чтобы избежать опасных для жизни осложнений. ТЭ позволяют в короткие сроки купировать важнейшие симптомы, обусловленные анемией [34, 42]. В то же время при умеренной анемии, как правило, ТЭ не проводят (за исключением острой кровопотери, гемолиза), если у пациентов нет признаков сердечной недостаточности. Умеренная анемия, как правило, не опасна для жизни пациентов в связи с тем, что она развивается постепенно в течение нескольких недель или месяцев и за этот период у больных срабатывают компенсаторные механизмы. К ним относятся увеличение сердечного выброса, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо с увеличением отдачи кислорода в тканях. Компенсаторные механизмы позволяют обеспечить достаточное кровоснабжение органов и тканей [42].

Таблица 2. *Классификация хронической анемии по степени тяжести (ВОЗ)*

Степень тяжести	Уровень Hb (г/л)
I — легкая	95–110
II — умеренная	80–94
III — выраженная	65–79
IV — тяжелая (угрожающая жизни)	<65

Однако большинство больных с умеренной и даже легкой степенью тяжести анемии могут субъективно испытывать признаки АС в виде снижения работоспособности, семейной и социальной дезадаптации, что снижает качество жизни. Тем не менее показанием для ТЭ является не снижение качества жизни, а угроза развития опасных для жизни пациентов осложнений, связанных с анемией. Строгие ограничения к переливаниям эритроцитов в последние годы вызваны существующим риском развития таких опасных для жизни осложнений, как гемолитические и негемолитические посттрансфузионные осложнения, передача трансмиссивных инфекций (вирусные гепатиты В и С, ВИЧ), а при многократных трансфузиях (более 40–50 доз) возможен и гемосидероз внутренних органов [43–46]. Более того, как показали многочисленные исследования, существует риск переливания контаминированных бактериями эритроцитов и других компонентов крови с летальными исходами до 30–50 % [47–50]. Поэтому для категории пациентов с легкой и умеренной анемией, с уровнем гемоглобина 80–110 г/л, для улучшения качества жизни, повышения работоспособности может быть использован альтернативный корректор анемии — ЭПСП.

Эритропоэзстимулирующие препараты — за и против

Одной из целей назначения ЭПСП является сокращение числа ТЭ и улучшение качества жизни больных. Однако некоторые исследователи склоняются к мнению о том, что у пациентов с хронической анемией, развившейся на фоне злокачественного опухолевого заболевания, применение ЭПСП может усилить риск развития тромбозов (тромбофлебит периферических вен, тромбоэмболия легочной артерии) [51]. Так, M. Henke et al., сравнивая эффективность ЭПСП и плацебо у больных с опухолями головы и шеи, имевших анемию и получавших в качестве основного лечения лучевую терапию, выявили снижение ОВ в группе пациентов, которым назначались стимуляторы эритропоэза [52]. Т акже меньшую ОВ показали J.R. Wright et al. у пациентов с раком легкого, получивших по 12 инъекций рекомбинантного эритропоэтина альфа (1 инъекция в нед), по сравнению с контрольной группой, где назначали плацебо [53]. Основной причиной уменьшения продолжительности жизни пациентов, получавших ЭПСП, было существенное увеличение частоты венозных тромбозов. Однако следует отметить, что во многих исследованиях целевой уровень гемоглобина часто превышал 130 г/л, в то время как, согласно современным рекомендациям, он не должен превышать 120 г/л [54]. При этом большинство из возникших тромбоэмболических осложнений связано не с действием препарата, а с быстрым приростом гемоглобина и его высоким целевым уровнем. Риск тромбоэмболий выше при уровне гемоглобина >120–130 г/л. Так, другими авторами, сделавшими метаанализ рандомизированных исследований, было показано, что в группе пациентов, которым назначали ЭПСП, действительно наблюдалось увеличение частоты тромбозов приблизительно на 50–60 % по сравнению с плацебо, но достоверного уменьшения продолжительности жизни выявлено не было [55, 56]. Более того, не доказано, что риск гибели пациентов, получавших ХТ параллельно с назначением ЭПСП, достоверно увеличивался [57]. D.L. Hershman et al. провели ретроспективный анализ 14 318 историй болезней пациентов с различными злокачественными новообразованиями (включая и ЛПЗ), получавших с 1992 по 2002 г. ЭПСП, и выявили, что у 14,3 % больных наблюдались венозные тромбозы. В то же время среди пациентов, которым не назначали ЭПСП, тромбоэмболии вен констатировали в 9,8 % случаев. Однако ОВ у пациентов, получавших и не получавших препараты рекомбинантного эритропоэтина, достоверно не отличалась [51]. Кроме того, следуя рекомендациям NCCN, ASH, ASCO, терапию ЭПСП следует прекращать при уровне гемоглобина 120 г/л, что также позволит снизить риск тромбозов [54].

В литературе также имеются публикации о таком грозном осложнении, как красноклеточная аплазия, вызванная аутоантителами класса IgG1 к эритропоэ-

тину альфа с молекулярной массой 166000 Да [58]. Эти антитела могут вырабатываться не только к эпоэтину альфа, но и к эпоэтину бета и даже к дарбэпоэтину альфа. Однако такие осложнения встречаются крайне редко [14, 59, 60].

В настоящее время дискутируется другая проблема использования у онкологических больных препаратов, стимулирующих эритропоэз. Указанные средства потенциально могут стимулировать рост опухоли. Данная точка зрения основана на том, что на поверхности многих клеток организма, включая и раковые клетки, экспрессируются рецепторы к эритропоэтину. Следовательно, экзогенно вводимый эритропоэтин может стимулировать и рост опухоли. В этой связи необходимо остановиться на некоторых физиологических особенностях эритропоэтина. Известно, что при снижении парциального давления кислорода в тканях эритропоэтин, как и многие другие цитокины, продуцируется в повышенном количестве и выполняет цитопротективную функцию, обеспечивая тем самым клеткам б ó льшую выживаемость от повреждающего действия гипоксии [61–63]. В моделях на животных показано, что эритропоэтин, активизируя собственные рецепторы на многих клетках организма, усиливает их защиту от апоптоза, например при гипоксии [64, 65]. Эритропоэтин стимулирует пролиферацию эритроидных элементов, способствует мобилизации эндотелиальных предшественников в КМ, а также росту сосудов [66]. Однако следует отметить, что рецепторы к эритропоэтину содержатся и на эпителии сосудов, и на злокачественных опухолевых клетках, поэтому с ростом сосудов существует риск и роста опухоли [67]. Иммуногистохимическим методом исследования установлено, что при меланоме на опухолевых клетках экспрессируется значительно бóльшее число рецепторов к эритропоэтину. Установлено, что его аутокринная и паракринная продукция выше по сравнению со «здоровыми» меланоцитами [68]. Аналогичные данные представлены и о больных раком шейки матки [69]. Повышенный синтез эритропоэтина и увеличенная экспрессия его рецепторов позволяют опухолевым клеткам не только выживать в условиях гипоксии, но и быть устойчивыми к действию химиопрепаратов. Кроме того, предполагается, что аутокринная и парокринная продукция эритропоэтина на здоровых клетках может играть роль при трансформации в опухолевые клетки [68, 69]. Следовательно, при назначении высоких доз препаратов рекомбинантного эритропоэтина не исключается риск стимуляции и самой опухоли.

Тем не менее высокая экспрессия рецепторов эритропоэтина на поверхности клеток не только не снижает, а наоборот, увеличивает ОВ, например у больных нейробластомой [67]. Следует также подчеркнуть, что на поверхности раковых клеток экспрессия рецепторов к эритропоэтину хоть и имеет место, но она не велика и приблизительно в 100–150 раз меньше по сравнению с клетками эритрона. Поэтому они менее чувствительны к стимулирующему действию эритропоэтина. Для нивелирования стимуляции злокачественных клеток в настоящее время назначение ЭПСП рекомендуется после 2–3 курсов противоопухолевого лечения параллельно с ХТ [54, 70]. Такая тактика существенно снижает риск стимулирования патологического клона клеток, а лучшая оксигенация опухоли при повышении уровня гемоглобина и гематокрита способствует усилению эффективности химиопрепаратов и лучевой терапии [57].

О большом практическом интересе врачей к использованию в клинической практике ЭПСП свидетельствует и значительное увеличение продажи различных ЭПСП. Так, если в 2002 г. в США было продано ЭПСП на сумму 6,4 млрд долларов США, то в 2006 г. — уже на 10 млрд долларов [71]. Однако данный факт можно объяснить не только эффективностью препаратов рекомбинантного эритропоэтина в лечении анемии, но и фокусированием внимания врачей на качестве жизни онкологических пациентов, получающих ХТ, так как ЭПСП позволяют существенно уменьшить слабость, повысить работоспособность, улучшить адаптацию пациента в семье и социуме [12].

Эффективность эритропоэзстимулирующих препаратов у больных с лимфопролиферативными заболеваниями

Легкая и средней тяжести анемия, как правило, не требует экстренной коррекции с помощью трансфузий ЭСС, но влечет за собой снижение качества жизни больных и уменьшение эффективности противоопухолевой терапии [14]. Такую анемию, как уже было отмечено, можно лечить с помощью ЭПСП [14]. Однако результативность терапии ЭПСП может варьировать в зависимости от нозологической формы, стадии заболевания и ряда прогностических факторов. Положительной стороной ЭПСП следует считать возможность их применения у больных ЛПЗ с различной степенью тяжести анемии в отличие от трансфузий ЭСС, для которых показаниями служат выраженная и тяжелая степень анемии. ЭПСП могут назначаться как самостоятельно — при легкой и умеренной степени анемии, так и параллельно с переливаниями эритроцитов. Они позволяют не только сократить число трансфузий, но и добиться полной их отмены благодаря более стойкой стабилизации уровня гемоглобина [34, 72].

Наиболее распространенными считаются препараты эпоэтина альфа (Эральфон, производитель ООО Сотекс, Россия; Эпокрин, производитель ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России; Эпрекс, производитель Янссен-Силаг, Швейцария), эпоэтина бета (Рекормон, производитель Хоффман-ля-Рош, Швейцария), а также пролонгированной формы эпоэтина альфа — дарбэпоэтина альфа (Аранесп, производитель Амджен, Нидерланды). Эффективной дозой ЭПСП для коррекции анемии при онкологических заболеваниях, как

было установлено A. Osterborg et al. еще в 1996 г. [38], является 10 000 МЕ или 150 МЕ на 1 кг массы тела 3 раза в нед. Однако бóльший интерес представляет назначение ЭПСП в пролонгированном режиме 1 раз в нед: эпоэтин альфа — в дозе 40 000 МЕ или эпоэтин бета — 30 000 МЕ [73]. Кроме того, в последние годы стали использовать особую форму пролонгированного эпоэтина альфа — дарб эпоэтин альфа. Этот препарат отличается наличием большего числа сиаловых кислот в молекуле эритропоэтина, благодаря чему повысилось сродство препарата к рецепторам эритропоэтина, что привело к увеличению периода полувыведения в 3 раза. Дарбэпоэтин альфа может назначаться как 1 раз в нед по 2,25–4,50 мкг на 1 кг массы тела (150–300 мкг на введение), так и 1 раз в 3 нед по 6,75 мкг/кг (по 500 мкг на введение). Имеются также данные, что и эпоэтин альфа может назначаться 1 раз в 2 или 3 нед в дозе 80 000 МЕ, являясь тем самым альтернативой дарбэпоэтину альфа [54].

Что касается эффективности коррекции АС у больных ЛПЗ с назначением различных режимов введения ЭПСП, то в 1990 г. H. Ludwig et al. в одном из первых пилотных исследований по применению эпоэтина альфа у больных ММ ($n = 13$) показали, что анемия корригируется у 85 % пациентов [74]. Немного позже, в 1997 г., P. Musto et al. представили менее обнадеживающие результаты использования ЭПСП. Авторы показали, что эффективность эпоэтина альфа у больных ММ, получавших ТЭ, составляла лишь 35 % [75]. Вместе с тем F. Dammacco et al., используя ЭПСП, получили положительный ответ у 75 % пациентов с ММ против 21 % больных, получавших плацебо. При этом в группе пациентов, получавших ЭПСП, уровень гемоглобина увеличивался в среднем на 21 г/л, а в контрольной группе не только не увеличился, но и понизился на 2 г/л [76]. Позже этими же авторами установлено, что назначение эпоэтина альфа у больных ММ ($n = 145$) позволяет не только повысить уровень гемоглобина в крови, но и существенно снизить частоту ТЭ по сравнению с плацебо-контролем (на 28 % и 47 % соответственно; $p = 0,017$) [77].

В 2003 г. M. Mittelman et al. на основании метаанализа нескольких исследований, насчитывавших более 1000 больных ММ, установили, что ЭПСП эффективны, но терапевтический ответ резко отличался у одних авторов от других и варьировал от 25 до 85 % [14]. Такой разброс результатов авторы объяснили неоднородностью групп пациентов. В одних случаях в исследование включались химиорезистентные пациенты с тяжелой анемией, зависимые от ТЭ, — у них результаты терапии ЭПСП были хуже. В других случаях у пациентов с легкой или умеренной степенью тяжести анемии, эффективно реагировавших на противоопухолевое лечение, часто наблюдался положительный ответ на эритропоэзстимулирующую терапию. В целом же эффективность коррекции анемии у больных ММ с помощью ЭПСП составляет порядка 65 % [78].

В гематологической клинике Российского НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России нами проведено изучение эффективности применения отечественного препарата эпоэтина альфа (Эральфон) для коррекции анемии в стандартной дозе 150 МЕ/кг массы тела у пациентов ($n = 21$) со злокачественными заболеваниями лимфатической ткани: ХЛЛ ($n = 5$), НХЛ ($n = 7$) и ММ ($n = 9$). В целом по группе положительный ответ, оцениваемый как повышение уровня гемоглобина >20 г/л, был констатирован у 13 (62 %) больных, что сопоставимо с данными зарубежных авторов [70, 76, 78].

Аналогичные результаты лечения АС были получены при использовании эпоэтина бета в группе больных с различными формами лимфом. J.P. Glossmann et al. показали, что эпоэтин бета у пациентов с рецидивами лимфом (болезнь Ходжкина — 39 человек, НХЛ — 21), получавших высокодозную ХТ, позволил уменьшить потребность в трансфузиях ЭСС в 2 раза по сравнению с больными, получавшими только Т Э (число ТЭ составило в среднем 4,5 против 8,3 соответственно) [79]. M.P. Siakantaris et al. в группе больных ЛПЗ ($n = 33$) добились полного ответа, оценивавшегося по увеличению уровня гематокрита >38 %, у 54 % пациентов с индолентными формами НХЛ ($n = 11$) и у 50 % больных ХЛЛ в III и IV стадиях по Rai ($n = 22$). При этом общий положительный ответ на стимуляторы эритропоэза, определяемый как повышение уровня гематокрита более чем на 6 %, наблюдался у 81 % и 77 % больных соответственно. Однако авторами не выявлено корреляции между эффективностью ЭПСП и исходным уровнем сывороточного эритропоэтина, наличием В-симптомов, большими размерами селезенки, особенностями сопутствующей терапии, интенсивностью опухолевой инфильтрации КМ. Эти данные, по-видимому, показывают отсутствие связи эффективности назначения эпоэтина бета и тяжести и продвинутости заболевания [80]. A. Osterborg et al. в 2002 г. сравнили эффективность эпоэтина бета и плацебо у пациентов с НХЛ низкой степени злокачественности ($n = 106$), ХЛЛ ($n = 126$) и ММ ($n = 117$). В многоцентровое исследование включались пациенты с выраженной и тяжелой анемией, зависимой от ТЭ. В группе пациентов, получавших ЭПСП, отмечалось увеличение уровня гемоглобина более чем на 20 г/л и полное прекращение Т Э у 67 % больных, в то время как в контрольной группе с плацебо положительный ответ регистрировался лишь у 27 % [81]. Близкие результаты получены и S. Yang et al. в группе больных ($n = 82$) с индолентными формами лимфом с достижением положительного ответа на лечение эпоэтином бета у 64,5 % пациентов [82].

В последние годы особый интерес представляют пролонгированные режимы назначения препаратов рекомбинантного эритропоэтина: эпоэтина альфа по 40 000 МЕ или эпоэтина бета по 30 000 МЕ 1 раз в нед, а также дарбэпоэтина альфа — по 500 мкг 1 раз

в 3 нед. D.J. Straus et al. в рандомизированном исследовании, включавшем 269 пациентов с ЛПЗ с легкой анемией, продемонстрировали существенное улучшение качества жизни больных, получавших эпоэтин альфа в дозе 40 000 МЕ 1 раз в нед [83]. M. Cazzola et al. сравнили результативность эпоэтина бета в дозе 30 000 МЕ 1 раз в нед (n = 119) и 10 000 МЕ 3 раза в нед (n = 122) в группе пациентов с ММ, индолентными НХЛ и ХЛЛ и установили, что оба режима назначения препарата практически идентичны по эффективности и позволяют добиться положительного ответа у 72 % и 75 % больных соответственно [84]. A. Osterborg et al. оценили эффективность различных доз дарбэпоэтина альфа в группе пациентов с агрессивными НХЛ (n = 92), включавшей и больных, длительно предлеченных ХТ. Авторы показали, что при подкожном назначении препарата 1 раз в 3 нед в дозе 2,1 мкг/кг массы тела положительный ответ наблюдался у 45 % больных, в дозе 4,2 мкг/кг — у 57 % и в дозе 6,3 мкг/кг — у 65 %. Аналогично уровень гемоглобина повышался в группе пациентов, получавших бóльшую дозу: 2,1 мкг/кг — на 2 г/л, 4,2 мкг/кг — на 24 г/л и 6,3 мкг/кг — на 57 г/л [85].

Таким образом, приведенные данные показывают, что с помощью ЭПСП можно достаточно успешно корригировать анемию у больных с ЛПЗ. При этом важно отметить, что принципиальным является не режим введения, и даже не тип препарата (эпоэтин альфа или бета, дарбэпоэтин), а адекватные дозы, существенно превышающие те, которые используют при анемии у больных с хронической почечной недостаточностью.

Коррекция и профилактика анемии с помощью препаратов рекомбинантного эритропоэтина у больных после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Известно, что у больных с ЛПЗ после высокодозной ХТ с последующей аутологичной трансплантацией периферических стволовых клеток (аутоТПСК) в течение длительного периода выявляется анемия различной степени тяжести. Такая анемия ухудшает качество жизни у данной категории больных. Для профилактики и лечения анемии после аутоТПСК на протяжении всего периода постцитостатической цитопении, наряду с факторами роста, хорошо себя зарекомендовали ЭПСП [86].

Известно, что у многих пациентов с НХЛ и ММ после аутоТПСК на протяжении полугода выявляется анемия. При этом нормальные показатели красной крови (уровень Hb 130 г/л) определяются лишь у 14% пациентов [87]. Назначение же ЭПСП пациентам с анемией позволило на 12-й неделе после аутоТПСК достичь нормального уровня гемоглобина у 87% больных. При этом авторами отмечено, что анемия с уровнем Hb < 90 г/л в группе пациентов, получавших ЭПСП более 3 мес, наблюдалась лишь в 4,7 % случаев, в то время как у больных без стимулирующих препаратов — в 26,7 % случаев [87]. Снижение потребности в ТЭ констатировано M. Martino et al. у больных ММ с анемией после аутоТПСК, которым перед трансплантацией назначались препараты рекомбинантного эритропоэтина (n = 22). Медиана уровня гемоглобина у этих пациентов составляла 100 г/л, а потребность в переливаниях ЭСС — менее 20%. В то же время в контрольной группе пациентов (n = 40), не получавших ЭПСП, медиана уровня гемоглобина составляла 76 г/л, а в ТЭ нуждалось более половины пациентов [88]. M. Hunault-Berger et al. сравнили 2 группы пациентов после аутоТПСК: в 1-ю группу вошло 15 больных, получавших ЭПСП после трансплантации, во 2-ю, контрольную, — 22 пациента, не получавших стимуляторы эритропоэза. Авторами констатировано, что в 1-й группе трансфузии ЭСС проводили 4 больным (26,7%), в то время как в контрольной группе эритроциты переливали 21 пациенту (95,5%) [89]. Кроме того, подсчитав стоимость, затрачиваемую на аутоТПСК у больных с ЛПЗ, A. Oliviery et al. пришли к выводу, что при назначении ростовых факторов в сочетании с ЭПСП уменьшается стоимость трансплантации с 23 988 до 18 394 евро за счет снижения длительности лихорадки, объема трансфузионной и антибактериальной терапии, длительности нахождения в стационаре [90].

При заготовке гемопоэтических стволовых клеток для аутоТПСК в процессе кондиционирования для лучшей мобилизации клеток с иммунофенотипом $CD34^+$ пациентам после ХТ обычно вводят гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Однако сочетанное назначение Г-КСФ с ЭПСП позволяет значительно улучшить мобилизацию периферических стволовых клеток, что было продемонстрировано в работе C. Hart et al. Авторами установлено, что одновременное назначение пациенту Г-КСФ и ЭПСП во время мобилизации гемопоэтических клеток для заготовки полноценного трансплантата требовало в среднем проведения 1,3 лейкафереза. В то же время при использовании 1 препарата (только Г-КСФ) проводилось в среднем 1,8 лейкаферезов. При этом количество клеток с иммунофенотипом $CD34^+$ для каждого пациента (из расчета на 1 кг массы тела) заготавливалось даже больше при назначении Г-КСФ с ЭПСП ($15{,}4 \times 10^6$/кг против $12{,}6 \times 10^6$/кг массы тела). Кроме того, авторами показано, что у пациентов, получавших Г-КСФ в комплексе с препаратами эритропоэтина, достоверно снижались длительность лихорадочного периода (с 6,1 до 2,3 дня; $p < 0{,}05$), объем антибактериальной терапии, время пребывания в стационаре, а также стоимость каждой трансплантации [91].

A. Gaya et al. выявили, что у большинства пациентов (76 %) после аллогенных трансплантаций в период между 30–244 днями обычно регистрировалась персистирующая анемия. Исследовав уровень эритропоэтина в сыворотке крови этих пациентов, авторы у ста-

новили, что у большинства из них ЭЭ был снижен несмотря на анемию и составлял 2,5–134 мМЕ/мл. Это позволило предположить, что у пациентов после аллогенных трансплантаций в генезе анемии в основном играет роль неадекватная продукция эритропоэтина. После назначения ЭПСП авторы констатировали положительный ответ у 29 из 30 больных (97%) [18].

Прогнозирование ответа на терапию эритропоэзстимулирующими препаратами

Препараты рекомбинантного эритропоэтина эффективны в лечении анемии и позволяют увеличить уровень гемоглобина у 60–75% пациентов с различными формами ЛПЗ. Результативность терапии стимуляторами эритропоэза может зависеть от нозологии, проводимого химиотерапевтического лечения, фазы заболевания, тяжести анемии, чувствительности клеток эритрона к ЭПСП, исходного уровня сывороточного эритропоэтина, явного или скрытого дефицита железа. Выявление дефицита железа и своевременное его устранение, особенно с использованием парентеральной формы препаратов железа, может увеличить частоту положительного ответа на терапию ЭПСП в 1,5 раза до 85–90% пациентов [92–94]. С учетом вышеизложенного определены факторы, позволяющие прогнозировать положительный ответ на терапию ЭПСП и сократить затраты на лечение. К таким факторам относятся:

1. Низкий уровень эритропоэтина сыворотки крови, не соответствующий тяжести анемии больного.

2. Меньшее соотношение фактического (имеющегося) к предполагаемому уровню ЭЭ. При уровне <0,9 ожидается положительный ответ.

3. Ранняя (через 2–4 нед) регистрация первых признаков терапевтического ответа.

4. Быстрое повышение числа ретикулоцитов на ≥40 000/мл через 2–4 нед с момента назначения ЭПСП.

5. Сочетание повышенного уровня растворимого трансферрина и исходно низкого уровня ЭЭ в сыворотке крови.

6. Повышенный уровень ферритина (400 нг/мл) в сочетании с исходно низким или нормальным уровнем ЭЭ (≤100 мМЕ/мл) и повышением гемоглобина на 5 г/л в начале лечения ЭПСП.

7. Низкое содержание гипохромных эритроцитов (<5%), количество ретикулоцитов > 50 000/мл, нормальный уровень ферритина в сыворотке (≥100 нг/мл) и не менее 20% насыщения трансферрина (растворимые рецепторы к трансферрину).

8. Низкий уровень ФНО-α (<15 пг/л) перед началом терапии ЭПСП [14, 48, 70, 75, 78, 92, 95–99].

Таким образом, основными факторами прогноза положительного ответа на терапию ЭПСП можно считать раннее повышение уровня гемоглобина и числа ретикулоцитов, нормальное содержание активного железа в крови, сниженный или нормальный уровень сывороточного эритропоэтина и ФНО-α (<15 пг/л). Адекватная оценка этих факторов у больных с ЛПЗ в практической деятельности позволяет сократить необоснованную трату средств на лечение анемии. В то же время своевременное назначение ЭПСП не только улучшит качество жизни пациентов, но и сократит число ТЭ, что предотвратит многие посттрансфузионные осложнения, включая гемосидероз внутренних органов, трансмиссивные инфекции, и повысит эффективность противоопухолевой ХТ.

Заключение

ЭПСП обладают высокой активностью в отношении эритропоэза у больных со злокачественными новообразованиями лимфоидной ткани с анемией и могут быть использованы для более быстрого восстановления уровня гемоглобина и гематокрита. Препараты эритропоэтина альфа и бета независимо от производителя обладают достаточной эффективностью и могут быть рекомендованы для коррекции анемии любой степени тяжести, в том числе и в сочетании с ТЭ. В то же время, в связи с их высокой биологической активностью, для категории больных с опухолевыми заболеваниями данные препараты рекомендуется назначать на фоне противоопухолевой терапии. С учетом большого риска возникновения тромбозов у больных, получающих эритропоэтины, целевой уровень гемоглобина должен быть не более 120 г/л. При повышении гемоглобина более чем на 20 г/л в мес исходную дозу препарата целесообразно редуцировать на 25–50%. Одним из условий проведения терапии препаратами рекомбинантного эритропоэтина в целях профилактики тромбоэмболических осложнений должен быть контроль уровня гемоглобина и артериального давления [54, 70].

ЛИТЕРАТУРА

1. Blackwell K., Gascón P., Sigounas G., Jolliffe L. rHuEPO and improved treatment outcomes: potential modes of action. Oncologist 2004;9(Suppl 5):41–7.
2. De Gaona E.R., Rifón J., Pérez-Calvo J. et al. Anemia in chronic lymphatic leukemia: is erythropoietin the solution. Rev Med Univ Navarra 2007;51(1):3–10.
3. Zinzani P.L., Tani M., Alinari L. et al. Role of anemia in survival of patients with elderly aggressive non-Hodgkin's lymphoma after chemotherapy. Leuk Lymphoma 2005;46(10):1449–54.
4. Samuelsson J. Long-standing resolution of anemia in symptomatic low-grade non-Hodgkin's lymphoma patients treated with recombinant human erythropoietin as sole therapy. Med Oncol 2002;19(1):69–72.
5. Kyle R.A. Multiple myeloma: review of 869 cases. Mayo Clin Proc 1975;50:29–40.
6. Ludwig H. Anemia of hematologic malignancies: what are the treatment options? Semin Oncol 2002;29 (3 Suppl 8):45–54.

7. Moullet I., Salles G., Ketterer N. et al. Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients. Ann Oncol 1998;9:1109–15.
8. Straus D.J. Epoetin alfa therapy for parameters with hematologic malignancies and mild anemia. Clin Lymphoma 2003;4(Suppl 1):13–7.
9. Dammacco F., Luccarelli G., Prete M., Silvestris F. The role of recombinant human erythropoietin alpha in the treatment of chronic anemia in multiple myeloma. Rev Clin Exp Hematol 2002;Suppl 1:32–8.
10. Truong P.T., Parhar T., Hart J. et al. Population-based analysis of the frequency of anemia and its management before and during chemotherapy in patients with malignant lymphoma. Am J Clin Oncol 2010;33(5):465–8.
11. Steurer M., Wagner H., Gastel G. Prevalence and management of anaemia in haematologic cancer patients receiving cyclic nonplatinum chemotherapy: results of a prospective national chart survey. Wien Klin Wochenschr 2004;116(11–12):367–72.
12. Hershman D.L., Buono D.L. et al. Patterns of Use and Risks Associated With Erythropoiesis-Stimulating Agents Among Medicare Patients With Cancer. J Natl Cancer Inst 2009;101(23):1633–41.
13. Богданов А.Н., Новик А.А. Диагностика и дифференциальная диагностика анемий. Вестн Гематологии 2005;1(4):63–70.
14. Mittelman M. The implications of anemia in multiple myeloma. Clin Lymphoma 2003;4(Suppl 1):23–9.
15. Hudis C.A., van Belle S., Chang J., Muenstedt K. rHuEPO and treatment outcomes: the clinical experience. Oncologist 2004;9(Suppl 5):55–69.
16. Eve H.E., Rule S.A. Autoimmune haemolytic anaemia associated with mantle cell lymphoma. Int J Hematol 2010;91(2):322–5.
17. Zent C.S., Ding W., Reinalda M.S. et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: changes in clinical presentation and prognosis. Leuk Lymphoma 2009;50(8):1261–8.
18. Gaya A., Urbano-Ispizua A., Fernández-Avilés F. et al. Anemia associated with impaired erythropoietin secretion after allogeneic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and response to treatment. Biol Blood Marrow Transplant 2008; 14(8):880–7.
19. Mauro F.R., Gentile M., Foa R. Erythropoietin and chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2002;Suppl 1:21–31.
20. Гусева С.А. Анемии при хронических и опухолевых заболеваниях. Укр журн гематологии и трансфузиологии 2003;4:32–8.
21. Мулле И., Саль Г., Кеттерер Н. и др. Частота и значение анемии у больных с неходжкинскими лимфомами. Анемия у онкол больных 2002;1:19–21.
22. Littlewood T., Mandelli F. The effects of anemia in hematologic malignancies: more than a symptom. Semin Oncol 2002;29(3)Suppl 8:40–4.
23. Pierce C.N., Larson D.F. Inflammatory cytokine inhibition of erythropoiesis in patients implanted with a mechanical circulatory assist device. Perfusion 2005;20(2):83–90.
24. Rizzo J.D., Lichtin A.E., Woolf S.H. et al. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. Blood 2002;100(7):2303–20.
25. Птушкин В.В. Дискуссионные вопросы применения эритропоэтинов в лечении анемии у пациентов с опухолевыми заболеваниями. Онкогематология 2007;2:31–6.
26. Lombard M., Chua E., O'Toole P. Regulation of intestinal non-haem iron absorbtion. Gut 1997;40:435–9.
27. Johnson R.A., Waddelow T.A., Caro J. et al. Chronic exposure to tumor necrosis factor *in vivo* preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. Blood 1989; 74:130–8.
28. Moldawer L.L., Marano M.A., Wei H. et al. Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia *in vivo*. FASEB J 1989; 3:1637–43.
29. Сараева Н.О. Механизмы развития анемии при гемобластозах. Гематол и трансфузиол 2007;52(1):31–7.
30. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002;82:47–95.
31. Tsopra O.A., Ziros P.G., Lagadinou E.D. et al. Disease-related anemia in chronic lymphocytic leukemia is not due to intrinsic defects of erythroid precursors: a possible pathogenetic role for tumor necrosis factor-alpha. Acta Haematol 2009;121(4):187–95.
32. Гуревич К.Я., Константинов Ю.В., Коробицын Л.П. и др. Человеческий рекомбинантный эритропоэтин (эпокрин) в лечении анемии. Практическое руководство. СПб., 2004. 60 с.
33. Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф., Демихов В.Г. и др. Применение рекормона (человеческого рекомбинантного эритропоэтина бета) в лечении эритропоэтиндефицитных анемий у детей и подростков. Пособие для врачей-гематологов и педиатров. Рязань, 2004. 48 с.
34. Романенко Н.А. Коррекция и лечение анемии у больных с гемобластозами эритроцитсодержащими компонентами крови и препаратами рекомбинантного эритропоэтина. Вестн Гематологии 2007;3(4):46–54.
35. Singh A., Eckardt K.U., Limmermann A. et al. Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. J Clin Invest 1993;91:251–6.
36. Takagi M., Migamoto Y., Kosaka M. et al. Clinical significance of serum erythropoietin levels in patients with multiple myeloma. Rinsho Ketsueki 1992;33:1151–7.
37. Han B., Shi Y.K., Zhu J. et al. Study on serum erythropoietin levels in patients with hematologic malignancies. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2006;27(8):543–5.
38. Osterborg A., Boogaerts M.A., Cimino R. et al. Recombinant human erythropoietin in transfusion-dependent anemic patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma — a randomized multicenter study. The European Study Group of Erythropoietin (Epoetin Beta) Treatment in Multiple Myeloma and Non-Hodgkin's Lymphoma. Blood 1996;87(7):2675–82.
39. Поспелова Т.И., Лямкина А.С. Уровень цитокинов (интерлейкина-1β, фактора некроза опухолей-α, интерферона-γ, интерлейкина-6) у больных лимфопролиферативными заболеваниями с анемическим синдромом. Анемия при лимфомах: научное издание. НГМУ, Новосибирск, 2008. С. 97–114.
40. Ludwig H., Fritz E. Anemia in Cancer patients. Semin Oncol 1998; 25(3)Suppl 7:2–6.
41. Абдулкадыров К.М. Переливания эритроцитов. В кн. Клиническая гематология: Справочник. СПб.: Питер, 2006. С. 403–406.
42. Приказ Минздрава РФ № 363 от 25 ноября 2002 года «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови».
43. Шевченко Ю.Л., Заривчацкий М.Ф., Жибурт Е.Б. Трансфузионные осложнения и их профилактика. В кн.: Шевченко Ю.Л., Шабалин В.Н., Заривчацкий М.Ф., Селиванов Е.А. (ред.) Руководство по общей и клинической трансфузиологии. СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2003. С. 561–588.
44. Ильина Е.Н., Говорун В.М. и Иваников И.О. Некоторые аспекты лабораторной диагностики вирусных гепатитов В и С. Тер арх 2003;75(4): 84–6.

45. Елов А.А., Федоров Н.А. и Жибурт Е.Б. Универсальные технологии генотестирования донорской крови и других клинических материалов на патогены. Трансфузиология 2006;7(3):98–118.
46. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Туполева Т.А. и др. Вирусная безопасность гемотрансфузий: обеспечивают ли ее принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С. Гематол и трансфузиол 2006;51(2):22–6.
47. Жибурт Е.Б., Караваев А.В., Филина Н.Г., Губанова М.Н. Модернизация бактериальной безопасности в трансфузиологии. Трансфузиология 2011;11(4):38–48.
48. Theakston E.P., Morris A.J., Streat S.J. et al. Transfusion transmitted Yersinia enterocolitica infection in New Zealand. Ausr N Z Med 1997;27(1):62–7.
49. Brecher M.E., Hay S.N. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005;18(1):195–204.
50. Kuehnert M.J., Roth V.R., Haley N.R. et al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. Transfusion 2001;41(12):1493–9.
51. Hershman D.L., Buono D.L., Malin J. et al. Patterns of use and risks associated with erythropoiesis-stimulating agents among Medicare patients with cancer. J Natl Cancer Inst 2009;101(23):1633–41.
52. Henke M., Laszig R., Rube C. et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2003;362:1255–60.
53. Wright J.R., Ung Y.C., Julian J.A. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. J Clin Oncol 2007;25(9):1027–32.
54. Henry D.H. Guidelines and recommendations for the management of anemia in patients with lymphoid malignancies. Drugs 2007;67(2):175–94.
55. Bennett C.L., Silver S.M., Djulbegovic B. et al. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. JAMA 2008;299(8):914–24.
56. Bohlius J., Wilson J., Seidenfeld J. et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. J Natl Cancer Inst 2006;98(10):708–14.
57. Bohlius J., Schmidlin K., Brillant C. et al. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. Lancet 2009;373:1532–42.
58. Yan J., Wang S., Mi J.B. et al. Production and characterization of anti-recombinant human erythropoietin (rhEPO) monoclonal antibody. J Immunoassay Immunochem 2004;25(1):91–101.
59. Лапчинская И.Н. Красноклеточная аплазия как осложнение терапии эритропоэтином: современное состояние проблемы. Укр журн гематологии и трансфузиологии 2004;3(4):45–7.
60. Casadevall N., Nataf J., Viron B. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients with recombinant erythropoietin. N Engl J Med 2002; 246:469–75.
61. Захаров Ю.М. Цитопротективные функции эритропоэтина. Клин нефрол 2009;1:16–21.
62. Kumar S.M., Yu H., Fong D. et al. Erythropoietin activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human melanoma cells. Melanoma Res 2006;16(4):275–83.
63. Ribatti D. Erythropoietin and tumor angiogenesis. Stem Cells Dev 2010;19(1):1–4.
64. Brines M.L., Ghezzi P., Keenan S. et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:10526–31.
65. Westenbrink B.D., Lipsic E., van der Meer P. et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor-mediated neovascularization. Eur Heart J 2007;28:2018–27.
66. Urao N., Okigaki M., Yamada H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. Circ Res 2006;98:1405–13.
67. Sartelet H., Fabre M., Castaing M. et al. Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas. Cancer 2007;110(5):1096–106.
68. Kumar S.M., Acs G., Fang D. et al. Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. Am J Pathol 2005;166(3):823–30.
69. Acs G., Zhang P.J., McGrath C.M. et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. Am J Pathol 2003;162(6):1789–806.
70. Романенко Н.А., Бессмельцев С.С., Розанова О.Е. и др. Влияние уровня ФНО-альфа на эффективность коррекции анемии у больных лимфопролиферативными заболеваниями. Онкогематология 2010;3:22–8.
71. Steinbrook R. Medicare and erythropoietin. N Engl J Med; 356(1):4–6.
72. Straus D.J. Epoetin alfa therapy for parameters with hematologic malignancies and mild anemia. Clin Lymphoma 2003;4(Suppl 1):13–7.
73. Ludwig H., Rai K., Blade J. et al. Management of disease-related anemia in patients with multiple myeloma or chronic lymphocytic leukemia: epoetin treatment recommendations. Hematol J 2002;3(3):121–30.
74. Ludwig H., Fritz E., Kotzmann H. et al. Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. N Engl J Med 1990;322:1693–9.
75. Musto P., Falcone A., D'Arena G. et al. Clinical results of recombinant human erythropoietin in transfusion-dependent patients with refractory multiple myeloma; role of cytokines and monitoring of erythropoiesis. Eur J Haematol 1997;58:314–9.
76. Dammacco F., Silvestris F., Castoldi G.L. et al. The effectiveness and tolerability of epoetin alfa in patients with multiple myeloma refractory to chemotherapy. Int J Clin Lab Res 1998;28(2):127–34.
77. Dammacco F., Castoldi G., Rodjer S. Efficacy of epoetin alfa in treatment of anemia of multiple myeloma. Br J Haematol 2001;113(1):172–9.
78. Katodritou E., Terpos E., Zervas K. et al. Hypochromic erythrocytes (%): a reliable marker for recognizing iron-restricted erythropoiesis and predicting response to erythropoietin in anemic patients with myeloma and lymphoma. Ann Hematol 2007;86(5):369–76.
79. Glossmann J.P., Engert A., Wassmer G. et al. Recombinant human erythropoietin, epoetin beta, in patients with relapsed lymphoma treated with aggressive sequential salvage chemotherapy — results of a randomized trial. Ann Hematol 2003;82(8):469–75.
80. Siakantaris M.P., Angelopoulou M.K., Vassilakopoulos T.P. et al. Correction of disease related anemia of B-chronic lymphoproliferative disorders by recombinant human erythropoietin: maintenance is necessary to sustain response. Leuk Lymphoma 2000; 40(1–2):141–7.
81. Osterborg A., Brandberg Y., Molostova V. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human erythropoietin, epoetin Beta, in hematologic malignancies. J Clin Oncol 2002;20(10):2486–94.

82. Yang S., Jun M., Hong-Li Z. et al. A multi-center open-labeled study of recombinant erythropoietin-beta in the treatment of anemic patients with multiple myeloma, low-grade non-Hodgkin's lymphoma, or chronic lymphocytic leukemia in Chinese population. Int J Hematol 2008;88(2):139–44.
83. Straus D.J., Testa M.A., Sarokhan B.J. et al. Quality-of-life and health benefits of early treatment of mild anemia: a randomized trial of epoetin alfa in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. Cancer 2006;107(8):1909–17.
84. Cazzola M., Beguin Y., Kloczko J. et al. Once-weekly epoetin beta is highly effective in treating anaemic patients with lymphoproliferative malignancy and defective endogenous erythropoietin Production. Br J Haematol 2003;122(3):386–93.
85. Osterborg A., Steegmann J.L., Hellmann A. Phase II study of three dose levels of continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in anaemic patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma receiving combination chemotherapy. Br J Haematol 2007;136(5):736–44.
86. Schmitt S., Mailaender V., Egerer G. et al. Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation in a Jehovah's Witness with multiple myeloma: review of literature and recommendations for high-dose chemotherapy without support of allogeneic blood products. Int J Hematol 2008;87(3):289–97.
87. Baron F., Frère P., Fillet G., Beguin Y. Recombinant human erythropoietin therapy is very effective after an autologous peripheral blood stem cell transplant when started soon after engraftment. Clin Cancer Res 2003;9(15):5566–72.
88. Martino M., Oliva E., Console G. et al. Administration of recombinant human erythropoietin alpha before autologous stem cell transplantation reduces transfusion requirement in multiple myeloma patients. Support Care Cancer 2005;13(3):182–7.
89. Hunault-Berger M., Tanguy-Schmidt A., Rachieru P. et al. rHuEpo before high-dose therapy allows autologous peripheral stem-cell transplantation without red blood cell transfusion: a pilot study. Bone Marrow Transplant 2005;35(9):903–7.
90. Olivieri A., Scortechini I., Capelli D. et al. Combined administration of alpha-erythropoietin and filgrastim can improve the outcome and cost balance of autologous stem cell transplantation in patients with lymphoproliferative disorders. Bone Marrow Transplant 2004;34(8):693–702.
91. Hart C., Grassinger J., Andreesen R., Hennemann B. EPO in combination with G-CSF improves mobilization effectiveness after chemotherapy with ifosfamide, epirubicin and etoposide and reduces costs during mobilization and transplantation of autologous hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant 2009; 43(3):197–206.
92. Beguin Y. Prediction of response to optimize outcome of treatment with erythropoietin. Semin Oncol 1998; 25(3 Suppl 7):27–34.
93. Hedenus M., Birgegård G., Näsman P. et al. Addition of intravenous iron to epoetin beta increases hemoglobin response and decreases epoetin dose requirement in anemic patients with lymphoproliferative malignancies: a randomized multicenter study. Leukemia 2007;21(4):627–32.
94. Katodritou E., Speletas M., Zervas K. et al. Evaluation of hypochromic erythrocytes in combination with sTfR-F index for predicting response to r-HuEPO in anemic patients with multiple myeloma. Lab Hematol 2006;12(1):47–54.
95. Cazzola M., Messinger D., Battistel V. et al. Recombinant human erythropoietin in anemia associated with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma: Dose finding and identification of predictors of respons. Blood 1995; 86:4446–53.
96. Cervantes F., Alvarez-Larrán A., Hernández-Boluda J.C. et al. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. Br J Haematol 2004; 127(4):399–403.
97. Henry D.H. Clinical application of recombinant erythropoietin in anemic cancer patients. Hematol Oncol Clin North Am 1994;8(5):961–73.
98. Ludwig H., Leitgeb C., Fritz E. et al. Erythropoietin treatment of chronic anemia of cancer. Eur J Cancer 1993;29A(Suppl 2):8–12.
99. Гусева С.А., Дарушин Е.В. и Гончаров Я.П. Коррекция анемии рекомбинантным эритропоэтином-альфа у больных миеломной болезнью. Укр журн гематологии и трансфузиологии 2003;5:11–6.

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ 3'2011

Лечение лимфом центральной нервной системы — обзор литературы и собственные данные

С.В. Миненко[1], Ю.В. Ларина[1], В.В. Птушкин[1], Н.К. Хуажева[2], В.В. Лунин[2], Т.Н. Пересторонина[1], Э.Р. Биячуев[1], А.В. Пшонкин[1], С.В. Семочкин[1], Ж.В. Шейх[2], В.Н. Яковлев[2], В.Г. Алексеев[2]

[1]ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва;

[2]ГУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина, Москва

***Контакты:** Светлана Владимировна Миненко svetlanaminenko@yandex.ru*

Поражение центральной нервной системы (ЦНС) при распространенных неходжкинских лимфомах (НХЛ) встречается с частотой 5–29%. Первичные лимфомы ЦНС (ПЛЦНС) выявляются существенно реже и составляют 1–2% лимфом и 5% всех опухолевых поражений ЦНС. Исторически при ПЛЦНС применялась радиотерапия, однако она была не способна индуцировать длительную ремиссию у большинства пациентов. Комбинированное лечение — химиотерапия + облучение — было разработано с целью повысить эффективность радиотерапии. Результаты исследований, по мнению ряда авторов, позволили разработать основу современных лечебных подходов, которая включает комбинацию высокодозного метотрексата и цитарабина с лучевой консолидацией ремиссии. Новые препараты — темозоломид, топотекан и ритуксимаб интенсивно исследуются в комбинации с базовыми препаратами. Мы проанализировали результаты лечения 11 больных с первичными (8) или вторичными (3) лимфомами ЦНС, получавших лечение в Городской клинической больнице им. С.П. Боткина. Иммуногистохимически у 9 пациентов из 11 (у всех с первичным поражением) был поставлен диагноз диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы. Все первичные больные получили метотрексат в дозе 3,5–5 г/м^2 и дополнительно (кроме 2 больных) цитарабин 2 г/м^2 — 2–4 дозы и 3 пациента помимо метотрексата и цитарабина получали ифосфамид, винкристин и этопозид в рамках детского протокола BFM-90. В последующем всем больным проводилась лучевая терапия на область головного мозга в дозе 46Гр. Непосредственная эффективность — достижение полной или частичной ремиссии — составила 75 %. Один больной погиб от инфекционных осложнений после 2-го курса химиотерапии. Раннее прогрессирование выявлено у 2 больных. Пять пациентов живы в сроки наблюдения от 6 мес до 3,5 лет и 4 из них находятся в ремиссии. Применение комбинации метотрексата и цитарабина сопровождалось нейтропенией III–IV степени практически у всех пациентов, однако длительность ее была не велика. Полученные данные находятся в соответствии с результатами современных протоколов лечения ПЛЦНС.

***Ключевые слова:** первичная лимфома центральной нервной системы, диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, метотрексат, цитарабин*

Treatment of central nervous system lymphoma — literature review and own experiences

S.V. Minenko[1], Yu.V. Larina[1], V.V. Ptushkin[1], N.K. Khuazheva[2], V.V. Lunin[2], T.N. Perestoronina[1], E.R. Biyachuev[1], A.V. Pshonkin[1], S.V. Semochkin[1], Zh.V. Sheikh[2], V.N. Yakovlev[2], V.G. Alekseev[2]

[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;

[2]Botkin Municipal Clinical Hospital, Moscow

Central nervous system (CNS) involvement in advanced non-Hodgkin's lymphoma (NHL) occurs in 5–29 % of cases. Primary CNS lymphoma (PLCNS) significantly less revealed: 1–2% of lymphoma cases and 5% of all malignant CNS diseases. Historically, PLCNS treated with radiotherapy, but the majority of patients had no long-term remission. Combined treatment (chemotherapy + radiation therap y) has been developed to improve radiotherapy efficacy. The research results, according to several authors, allowed to develop the bas is of modern medical approaches, which includes a combination of high-doses methotrexate and cytarabine with radiation therapy for remission consolidation. New drugs — temozolomide, topotecan and rituximab — in combination with conventional preparates have been studied.
Treatment results of 11 patients with primary (8) or secondary (3) CNS lymphomas treated in Botkin Municipal Clinical Hospital was analyzed. In 9 from 11 (all with primary lesion) diffuse B-large cell lymphoma w as diagnosed (by immunohistochemistry). All primary patients received 3.5–5 g/m^2 methotrexate and 2–4 doses 2 g/m^2 cytarabine (except 2 patients); 3 patients in addition received ifosfamide, vincristine and etoposide under a pediatric protocol BFM-90. Subsequently , all patients received 46 Gy cranial irradiation. 75 % of pa tients achieved complete or partial remission. One patient died from infectious complication after 2nd chemotherapy course. 2 patients have early progression. Five patients are alive with follow-up from 6 months to 3.5 years and 4 of them remains in remission. Therapy withmethotrexate + cytarabine was accompanied by III–IV grade neutropenia in the majority of patients, but its duration w as not great. The data obtained are consistent with results of modern treatment protocols PLCNS.

***Key words:** primary CNS lymphoma, diffuse B-large cells lymphoma, methotrexate, cytarabine*

Поражение центральной нервной системы (ЦНС) при лимфопролиферативных заболеваниях не редкость. По различным данным, при распространенных неходжкинских лимфомах (НХЛ) они встречаются с частотой 5–29 % [1]. Существенно реже отмечаются первичные лимфомы ЦНС (ПЛЦНС). Их частота составляет 1–2 % лимфом и 5 % всех опухолевых поражений ЦНС [2]. Единственной доказанной предпосылкой развития первичных поражений ЦНС при НХЛ является врожденное или приобретенное снижение иммунного ответа, хотя у большинства заболевших признаков иммунодефицита не наблюдается [3]. Характер иммунного дефекта, возможно, также имеет значение. Так, при тяжелом сочетанном иммунодефиците и при синдроме Вискотта–Олдрича наблюдается повышенная частота первичного лимфопролиферативного поражения ЦНС [4], в то время как при атаксии-телеангиоэктазии при общем более высоком риске возникновения лимфом учащения первичного поражения ЦНС выявлено не было [5]. Существенный вклад в повышение риска ПЛЦНС может вносить и лекарственная иммуносупрессивная терапия. Реципиенты донорской почки имеют повышение частоты развития лимфомы в 350 раз в сравнении с иммунокомпетентной популяцией, и почти половина поражений протекает с вовлечением ЦНС [6]. Наибольшая группа больных, имеющая поражение иммунной системы и повышенный риск ПЛЦНС, это ВИЧ-инфицированные пациенты. Описанная частота данного патологического состояния у пациентов со СПИДом составляет 2–6 % [7]. Рост числа ВИЧ-инфицированных за последние 20 лет сопровождался эпидемическим увеличением частоты ПЛЦНС. Следует отметить, что и в общей, иммунокомпетентной, популяции отмечено увеличение частоты данного варианта развития лимфопролиферации. При сравнении 2 временных интервалов 1973–1975 гг. и 1982–1984 гг. выявлено увеличение частоты ПЛЦНС с 2,5 до 7,5 на 10 млн жителей, что многократно превышает общий прирост заболеваемости лимфомами [8]. В 1990-е годы подобного роста не наблюдалось и отмечена стабилизация числа больных с вновь выявленным первичным поражением ЦНС [9]. Наибольшее представительство среди ПЛЦНС имеет диффузная В-крупноклеточная лимфома (до 90 %). Могут также выявляться индолентные лимфомы, лимфомы Беркитта и Т-клеточные лимфомы [10, 11].

Механизм развития ПЛЦНС у иммунокомпетентных больных объясняется как трансформацией лимфоцитов находящихся в пределах гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), так и приобретением лимфоцитами, подвергшимися трансформированию в других регионах организма, особого тропизма к тканям ЦНС.
В пользу последней гипотезы говорят антигенные отличия опухоли протекающей с/без поражения головного мозга. При этом утеря таких постоянных маркеров диффузной В-крупноклеточной лимфомы как B5, Blast 2, BB1 наблюдается и при первичных, и при вторичных лимфопролиферативных поражениях ЦНС, что говорит в пользу 2-й гипотезы [12].

В отличие от лимфом у пациентов с сохранным иммунитетом, лимфомы ЦНС при иммунодефиците, как правило, агрессивны, поликлональны, и в них обнаруживается вирус Эпштейна–Барр [13]. Роль этого вируса в генезе возникновения лимфом при иммунодепрессии, по-видимому, чрезвычайно высока. Вирус Эпштейна–Барр самостоятельно способен вызвать лимфопролиферацию *in vitro*, но *in vivo* инфицированные клоны успешно элиминируются Т-клетками. При ВИЧ-инфекции или лекарственной иммуносупрессии этот защитный механизм страдает. Риск возникновения лимфом в этом случае тем выше, чем длительнее иммуносупрессивная терапия и ниже содержание CD4-клеток [14]. Восстановление иммунитета дает обратный эффект , так, лимфопролиферативные поражения ЦНС после аллогенной трансплантации костного мозга с Т-деплецией успешно лечатся трансфузиями необлученных донорских лимфоцитов.

Медиана возраста заболевших ПЛЦНС составляет 55 лет для общей популяции и 31 год — для пациентов с поражением иммунитета, хотя заболевание может затрагивать практически все возрастные категории [15]. Соотношение женщин и мужчин при данном заболевании составляет приблизительно 3:2 в обычной популяции, в то время как среди ВИЧ-инфицированных в соотношении 9:1 преобладают мужчины. Симптоматика определяется объемом и локализацией интракраниального поражения, однако существуют некоторые особенности, отличающие проявления данного заболевания от внутричерепных опухолей иного генеза. В отличие от глиом, менингиом и вторичных поражений ЦНС другими опухолями, относительно редко встречается судорожный синдром. Напротив, очаговая симптоматика, изменения личности, головные боли и сонливость наблюдаются более чем у половины больных [16]. Возможно, это определяется преимущественным поражением лобных долей мозга. При ВИЧ-обусловленных лимфомах чаще наблюдаются тяжелые энцефалопатии с изменениями личности. При радиологическом исследовании лишь у 25% больных сохранен иммунный ответ , но более половины ВИЧ-инфицированных имеют многофокусное поражение [17]. У пятой части больных опухоль распространяется на органы зрения, что сопровождается появлением затуманенной, плывущей картинки и болезненным покраснением глаз. В случае развития соответствующей клинической симптоматики, сопровождающейся радиологической картиной, характерной для ПЛЦНС, необходимо немедленное морфологическое исследование. До его проведения следу ет по возможности воздержаться от назначения кортикостероидов, если нет угрозы вклинения. Эта рекомендация основана на высокой чувствительности клеток лимфомы к глюкокортикоидным гормонам (до полных

регрессий опухоли у части больных), что затрудняет гистологический диагноз. На первом этапе морфологический материал можно попытаться получить при люмбальной пункции, если нет противопоказаний к ее применению. Опухолевый плеоцитоз, по данным ряда авторов, имеет место у трети пациентов с ПЛЦНС [18]. Отличить опухолевый цитоз спинальной жидкости от реактивного помогает анализ клональности лимфоцитов. Существенная часть больных, тем не менее, требует нейрохирургической интервенции для получения морфологического материала. В этом случае методом выбора является стереотаксическая биопсия. При гистологическом подтверждении диагноза лимфомы ЦНС проводится лечение, включающее химиотерапию (ХТ) и радиотерапию (РТ). Хирургическое удаление опухоли в процессе «тотальной биопсии» не имеет преимущества перед стереоскопической биопсией, а среднее время жизни после операции, как единственной лечебной опции, составляет 1–4 мес [19]. Это объясняется частым наличием микрометастазов лимфомы в вещество головного мозга и глубоким распространением основной опухоли, делающими ее радикальное удаление технически крайне трудным, если вообще возможным.

Исторически РТ у больных с лимфомами ЦНС проводилась на всю область головного мозга с учетом риска многофокусного поражения. Облучение в дозе 36–50 Гр приводит к выраженной регрессии опухоли у 90% пациентов. В одном из ранних исследований использование данной методики в монотерапии сопровождалось достижением медианы общей выживаемости (ОВ) 11,6 мес [20]. Рецидивы в 61% случаев развивались в облученной зоне, что свидетельству ет о том, что только лучевая терапия не способна индуцировать длительную ремиссию у большинства пациентов. Тем не менее, она остается возможным вариантом терапии у пожилых и ослабленных больных, а также в случае индолентных лимфом.

Комбинированное лечение — ХТ + облучение — было разработано с целью повысить эффективность РТ. Ранние исследования, использовавшие курсы ХТ типа CHOP показали скромные результаты [21] в связи с плохой проницаемостью применявшихся препаратов через ГЭБ после регрессии опухоли. Первым эффективным препаратом для лечения ПЛЦНС благодаря способности проникать в ткань мозга показал себя мето трексат. В то же время данный антиметаболит имеет высокую степень ионизации при физиологических значениях pH, что препятствует его проникновению в ЦНС в высоких концентрациях. В экспериментальных исследованиях было показано, что соотношение концентрации метотрексата в спинномозговой жидкости и плазме составляет 0,13 [22]. Это делает необходимым назначение данного препарата в высокой дозе для надежного достижения туморицидной концентрации в ткани опухоли. В ретроспективном исследовании было показано, что показатели выживаемости прямо пропорциональны достижению достаточной площади под кривой концентрации метотрексата, которая должна составлять более 1,100 мкмоль/час/л [23]. Используя эти данные были разработаны рекомендации введения метотрексата в дозах 3–3,5 г/м^2 или выше в течение 4–6 ч каждые 3–4 нед. Второй препарат, способный эффективно преодолевать ГЭБ, это цитарабин [24]. Многоцентровое исследование эффективности режима на основе высокодозного метотрексата и РТ с последующим 2-кратным введением цитарабина в высокой дозе показало возможность индукции ремиссии в 96% случаев [25]. Большинство ремиссий (57%) были полными. Медиана ОВ составила около 3 лет. Роль комбинации цитарабина и метотрексата при лечении ПЛЦНС была оценена в одном из немногих сравнительных контролируемых исследований. В этом исследовании 79 пациентов — в большинстве случаев достаточно пожилые (медиана возраста более 60 лет) — были рандомизированно разделены на получение 4 курсов метотрексата в дозе 3,5 г/м^2 или метотрексата 3,5 г/м^2 с цитарабином 2 г/м^2 по 4 введения с интервалом 12 ч [26]. При отсутствии прогрессирования больные получали лучевую терапию в качестве консолидации. Общий ответ был достигнут у 40% больных в группе метотрексата (18 % полных ремиссий) и у 69 % — в группе пациентов, получающих комбинацию метотрексата и цитарабина (40 % полных ремиссий). Несмотря на меньшую в сравнении с предыдущим исследованием непосредственную эффективность медиана ОВ в группе комбинации метотрексата и цитарабина оказалась сопоставимой (около 3 лет) при существенно меньшей продолжительности лечения. Результаты этих исследований, по мнению ряда авторов, позволили разработать основу лечебных подходов, которая включает комбинацию метотрексата и цитарабина с лучевой консолидацией ремиссии. Интратекальное введение цитостатиков при подобной терапии в ряде исследований не улучшало прогноза, и его роль в настоящее время не определена. Существенным недостатком данного подхода является нейротоксичность с элементами деменции, развивающейся у значительной доли пациентов (до 20–30%) в течение нескольких лет после облучения [27]. У пожилых больных эта цифра может достигать 50% с высокой летальностью.

Поздние неврологические осложнения послужили основанием для поиска более интенсивных комбинированных химиотерапевтических режимов, которые позволят отказаться от облучения головного мозга, по крайней мере, на начальном этапе лечения. В качестве перспективных компонентов подобных комбинаций рассматриваются темозоломид, топотекан и ритуксимаб. Темозоломид и топотекан обладают высокой самостоятельной активностью при ПЛЦНС. Т емозоломид в монотерапии способен индуцировать 47 % полных ремиссий у пожилых больных с медианой ОВ 21 мес [28]. К недостаткам применения этих препаратов относят краткость полученных ремиссий и достаточно высокую миелотоксичность и нейротоксичность

[29]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования по применению различных комбинаций с включением новых препаратов, призванные повысить эффективность лечения и снизить его токсичность. Что касается ритуксимаба, то большие размеры молекулы данного моноклонального антитела, эффективно используемого при В-клеточных лимфомах, долгое время вызывали сомнения в возможности его проникновения через ГЭБ. В то же время препарат оказался действенным в монотерапии при лечении рецидивов ПЛЦНС [30] и показал хороший эффект в комбинации с высокодозным метотрексатом [31]. Подобные наблюдения открывают перед ритуксимабом перспективы стать важным компонентом комбинаций терапии первой линии в связи с низкой гематологической токсичностью и эффектом, оказываемым на резистентные лимфомы. Недавно опубликованы результаты применения интенсивного химиотерапевтического режима с ритуксимабом без лучевой консолидации. Начальная терапия включала назначение высокодозного метотрексата, темозоломида и ритуксимаба. Больные достигшие полной ремиссии получали в качестве консолидации высокие дозы цитарабина с этопозидом. Полная ремиссия была достигнута в 65% случаев. При этом медиана выживаемости без прогрессии составила 2,3 года, а расчетная 3-летняя выживаемость — 67 %. Авторы не отмечают острой или отсроченной нейротоксичности [32]. Более подробно результаты исследований представлены в таблице.

В последние годы применение получили методики введения цитостатиков на фоне препаратов повышающих проницаемость ГЭБ. Обычно применяют интраартериальное назначение маннитола, вызывающего гиперосмотическое повреждение ГЭБ, с последующим также интраартериальным введением метотрексатсодержащих комбинаций химиопрепаратов. Результативность такого лечения сопоставима с традиционным (50 % выживаемость без прогрессирования на 2 года) [33] и возникают вопросы технической выполнимости, связанной с необходимостью ежемесячных на протяжении года внутриартериальных инфузий, проводимых в состоянии общего наркоза. Недавно были опубликованы результаты применения подобной схемы лечения с включением ритуксимаба [34]. Эффективность новой схемы оказалась, по мнению авторов, существенно выше традиционной (2-летняя выживаемость без прогрессирования составила 73 %) и возможно данный метод позволит повысить эффективность лечения лимфом ЦНС.

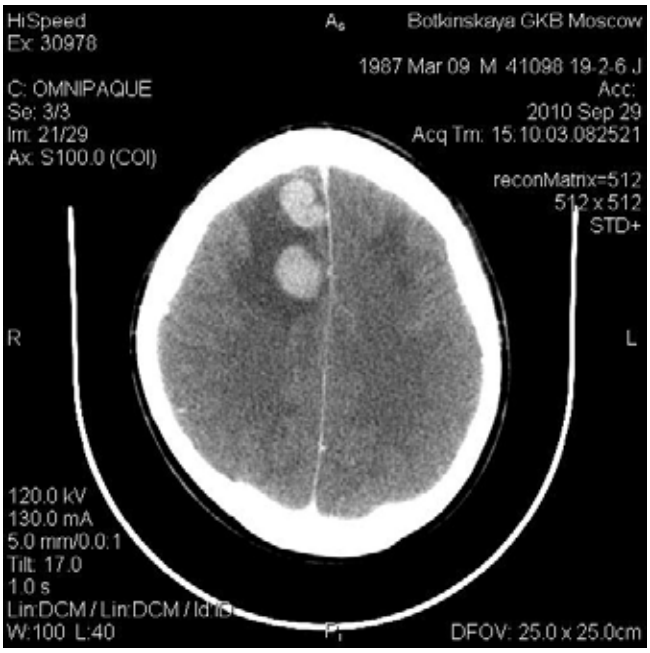
Еще одной перспективной методикой лечения ПЛЦНС является высокодозная ХТ с аутологичной трансплантацией стволовых клеток. Данный метод позволяет использовать препараты хорошо проникающие через ГЭБ — Тиотэф, бусульфан, BCNU — но обладающие крайне высокой миелотоксичностью. Исторически метод применялся у пациентов с рецидивами и резистентным течением ПЛЦНС с хорошим эффектом: частота полных ремиссий около 60 % при 45 % 2-летней ОВ [35]. Недостатками высокодозной ХТ являлись высокая смертность, связанная с лечением (16 %), и тяжелая нейротоксичность (12 %). Несколько исследований, в которых метод применялся в первой линии лечения, дали вариабельные результаты. В наиболее крупных из них 4-летняя ОВ составила 64–69 % при трансплантационной летальности 3–4 % и долговременной нейротоксичности 8–17 %. В настоящее время метод чаще применяется во 2-й линии лечения и проводятся контролируемые исследования с целью выявить возможность его использования для консолидации ремиссии вместо РТ.

Результаты исследований

Число больных	Режим	Препарат	Интратекально	Общий ответ	Полная ремиссия	Медиана наблюдения, мес	2-летняя ОВ	5-летняя ОВ	Нейротоксичность
37	ХТ	М 8 г/м² 14 дней	–	36 %	30 %	56	51 %	25 %	20 %
46	ХТ	М 8 г/м² 14 дней + ритуксимаб + темозоломид цитарабин VP-16	–	НР	63 %	40	71 %	НР	0 %
25	ХТ + РТ	М 3,5 г/м² 21 день	–	92 %	88 %	60	58 %	38 %	8 %
46	ХТ + РТ	М 1 г/м² 7 дней	Ара-С	95 %	82 %	36	62 %	37 %	22 %
79	ХТ + РТ	М 3,5 г/м² 21 день	–	40 %	30 %	30	39 %	26 %	20 %
	ХТ + РТ	М 3,5 г/м² 21 день + Ара-С 2 г/м² × 4	–	74 %	64 %		56 %	46 %	6 %
551	ХТ — РТ	М 4 г/м² × 14 дней	–	50 %	32 %				
	ХТ + РТ	М 3 г/м² × 14 дней	–	65 %	42 %				

Пациенты и методы

Мы проанализировали результаты лечения 11 пациентов с первичными (8) или вторичными (3) лимфомами ЦНС, наблюдавшихся в гематологических отделениях Городской клинической больницы им. С.П.Боткина за последние 3 года. Все эти пациенты не имели анамнестических указаний на иммунодепрессию, не получали иммуносупрессивных препаратов и были ВИЧ-негативны. Большинство из них (7 из 11) были мужчины, медиана возраста наблюдавшихся составила 43 (18–62) года. Иммуногистохимически у 9 пациентов был поставлен диагноз диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, в 1 случае — фолликулярной лимфомы 3-го цитологического типа и в 1 случае — лимфомы маргинальной зоны. Все больные с ПЛЦНС имели диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому. Множественное поражение мозга наблюдалось у половины



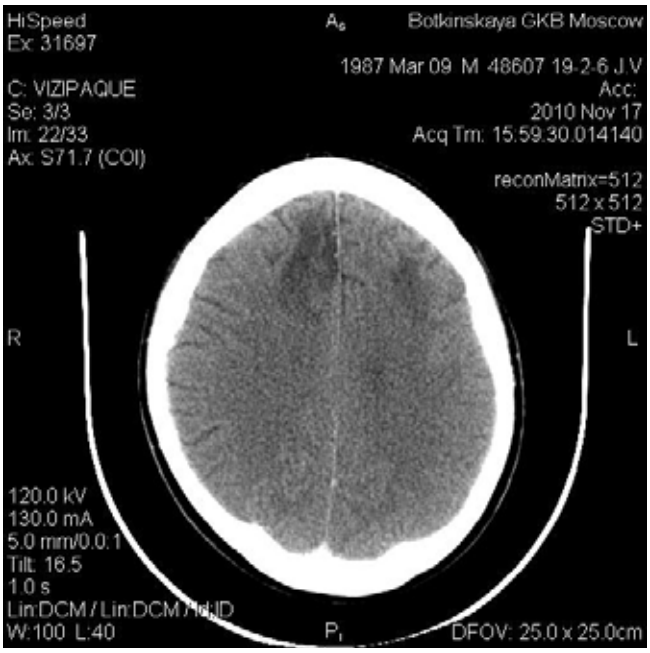
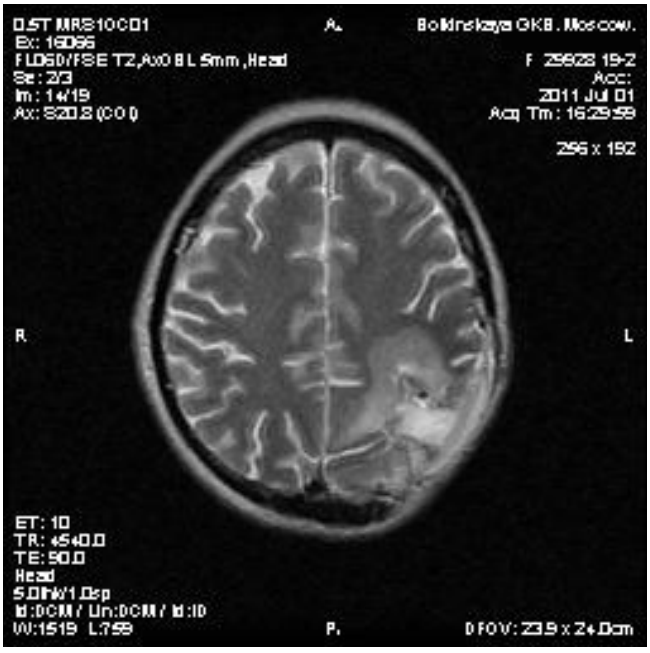


Рис. 1–2. *Больной К., 25 лет, первичная лимфома ЦНС с поражением вещества головного мозга. Гистологически: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, состояние после ХТ с использованием высоких доз метотрексата и цитарабина. Полная регрессия очагов лимфоидной инфильтрации в правой лобной доле*



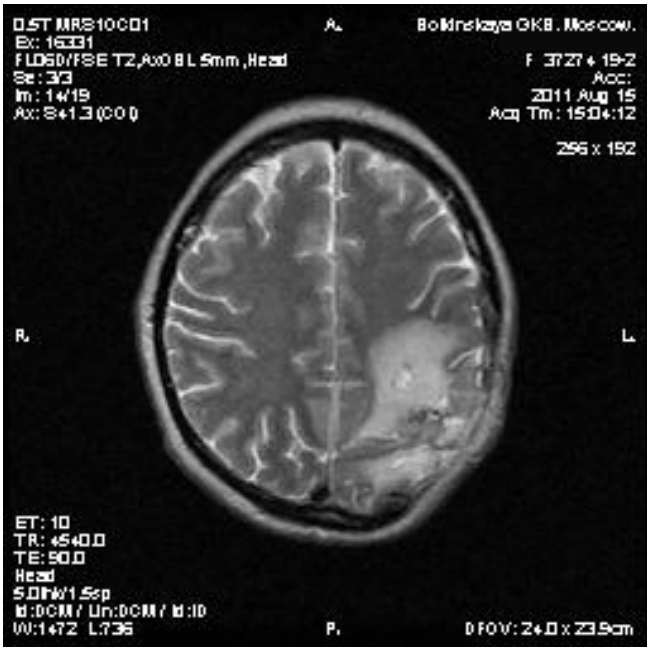


Рис. 3–4. *Больная С., 43 лет, первичная лимфома ЦНС с поражением вещества головного мозга. Гистологически: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, состояние после ХТ с использованием высоких доз метотрексата и цитарабина. Частичная регрессия очагов лимфоидной инфильтрации в левой задне-теменной области*

первичных больных. В 2 случаях отмечалось поражение оболочек головного мозга.

Все больные с ПЛЦНС (8 человек) получили начальную ХТ, включающую метотрексат в дозе 3,5–5 г/м^2, и 2 из этой группы получали препарат внутриартериально после разрушения ГЭБ в НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко и наблюдались в больнице им. С.П. Боткина в связи с рецидивом лимфомы. Из 6 первичных больных, получивших начальное лечение в больнице им. С.П. Боткина, 5 помимо метотрексата получили еще высокие дозы цитарабина 2 г/м^2 — 2–4 дозы и 3 помимо метотрексата и цитарабина — дополнительно ифосфамид, винкристин и этопозид в рамках детского протокола BFM-90. В последующем всем больным проводилась лучевая терапия на область головного мозга в дозе 46 Гр. Непосредственная эффективность — достижение полной или частичной ремиссии — составила 75 % (6 из 8 больных). Один больной погиб от инфекционных осложнений после 2-го курса ХТ. Раннее прогрессирование выявлено у 2 больных. Пятеро больных живы в сроки наблюдения от 6 мес до 3,5 лет и 4 из них находятся в ремиссии.

Трое больных с вторичным лимфопролиферативным поражением головного мозга получили исходно от 4 до 8 курсов R-CHOP и у всех была достигнута полная ремиссия. После возникновения рецидива с поражением ЦНС все больные получали высокие дозы метотрексата с цитарабином. Один пациент погиб от прогрессии лимфомы на фоне первого курса противорецидивной терапии, а у 2 больных терапия высокими дозами метотрексата позволила достичь лишь стабилизации, в связи с чем им был назначен темозоломид с ритуксимабом и глюкокортикоидами — без эффекта, больные погибли от прогрессии (рис. 1–4).

Обсуждение

ПЛЦНС имеет существенные отличия от других экстранодальных лимфом с точки зрения биологии, клинических проявлений и лечебных подходов. В то же время у многих гематологов опыт лечения ПЛЦНС ограничен из-за относительной редкости данной локализации. Несмотря на то, что облучение долгое время оставалось единственным эффективным методом терапии, в настоящее время показано, что применение цитостатиков позволяет существенно повысить действенность РТ. Среди химиопрепаратов, способных эффективно проникать через ГЭБ, наибольшую активность показал метотрексат, назначаемый в высокой дозе, однако его введение требует определенных навыков. Главная сложность заключается в необходимости мониторинга концентрации препарата с решением вопроса об отмене антидота — лейковорина — только тогда, когда метотрексат практическим полностью выведется из организма. Это требует наличия прибора, определяющего концентрацию метотрексата, и возможности проведения интенсивной гидратации, ощелачивания и контроля обмена жидкости. Детские гематологи, работающие по протоколам лечения лимфом Германской группы BFM, показали, что это вполне выполнимая задача, превратившаяся в рутинную процедуру. Второй вопрос, обычно беспокоящий специалистов это риск токсичности цитостатика, вводимого в высокой дозе. Следует сразу сказать, что токсичность высокодозного метотрексата прямо пропорциональна времени его введения и срокам назначения антидота — лейковорина. Применяемая при лечении лимфом ЦНС методика 4–6-часовой инфузии предполагает низкую токсичность с развитием глубокой цитопении лишь у 15–30 % больных. Таким образом, правильное с технической точки зрения назначение метотрексата определяет минимальную токсичность лечения.

Несколько иная ситуация при комбинировании метотрексата с высокодозным цитарабином. Многоцентровое сравнительное исследование метотрексата с комбинацией метотрексата и цитарабина показало, что гематологическая токсичность III–IV степени имела место лишь у 15 % больных в группе монотерапии, но у 92 % — в группе комбинации. Это сопровождалось более высокой токсической смертностью (2,5 % против 7,5 %), однако 5-летняя ОВ была существенно выше в группе комбинированного лечения (46 % против 26 %). Наш опыт подтверждает эти данные: у большинства пациентов назначение метотрексата в дозе 3,5–5 г/м^2 не сопровождалось выраженной нейтропенией, тромбоцитопенией или инфекцией. Также не отмечалось мукозитов более II степени тяжести. Комбинация цитарабина и метотрексата сопровождалась глубокой, но достаточно кратковременной цитопенией практически у всех больных. Профилактическое назначение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в этих случаях могло бы снизить токсичность. Небольшое количество наблюдений не позволяет проанализировать показатели выживаемости, однако применение подобной схемы лечения позволило добиться полных ремиссий, длящихся свыше 1 года, более чем у половины первичных пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bleyer W., Byrne T. Leptomeningeal cancer in leukemia and solid tumors. Current Problems in Cancer 1988; 12:183–238.

2. Freeman C., Berg J.W., Cutler S.J. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. Cancer 1972 Jan; 29(1):252–60.

3. Littman P., Wang C.C. Reticulum cell sarcoma of the brain. A review of the literature and a study of 19 cases. Cancer 1975;35:1412–20.

4. Brand M.M., Marinkovich V.A. Primary malignant reticulosis of the brain in Wiskott–Aldrich syndrome. Report of a case. Arch Dis Child 1969;44:536–42.
5. DeWeese T.L., Hazuka M.B., Hommel D.J., Kinzie J.J., Daniels W.E. AIDS-related non-Hodgkin's Lymphoma: The Outcome and Efficacy of Radiation Therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991;20:803–8.
6. Penn I. Development of cancer as a complication of clinical transplantation. Transplant Proc 1977;9:1121–7.
7. Snider W.D., Simpson D.M., Nielsen S., Gold J.W., Metroka C.E., Posner J.B. Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. Ann Neurol 1983 Oct; 14(4):403–18.
8. Eby N.L., Grufferman S., Flannelly C.M., Schold S.C. Jr, Vogel F.S., Burger P.C. Increasing incidence of primary brain lymphoma in the US. Cancer 1988 Dec 1; 62(11):2461–5.
9. Kadan-Lottic N.S., Skluzacek M.C., Gurney J.G. Decreasing Incidence rates of primary central nervous system lymphoma. Cancer 2002;95:193–202.
10. Camilleri-Broet S., Criniere E., Broet P. et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: Analysis of 83 cases. Blood 2006;107(1):190–6.
11. Shenkier T.N., Blay J.Y., O'Neill B.P. et al. Primary CNS lymphoma of T-cell origin: A descriptive analysis from the international primary CNS lymphoma collaborative group. J Clin Oncol 2005;23(10):2233–9.
12. Bashir R., Freedman A., Harris N. et al. Immunophenotypic profile of CNS lymphoma: A review of eighteen cases. J Neurooncol 1989;7:249–54.
13. Bashir R., McManus B., Cunningham C., Wiesenberger D. and Hochberg F. Detection of Eber-1 RNA in primary brain lymphomas in immunocompetent and immunocompromised patients Journal of neuro-oncology 1994; 20:47–53.
14. Levine A.M. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. Blood 1992 Jul 1;80(1):8–20.
15. Fine H.A., Mayer R.J. Primary central nervous system lymphoma. Ann Intern Med 1993;119:1093–1104.
16. O'Neill B.P., Illig J.J. Primary central nervous system lymphoma. Mayo Clin Proc 1989;64:1005–20.
17. Gabuzda D.H., Hirsch M.S. Neurologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus. Clinical features and pathogenesis. Ann Intern Med 1987 Sep; 107(3):383–91.
18. Ferreri A.J., Reni M., Pasini F. et al. A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma. Neurology 2002;58(10):1513–20.
19. Fitzsimmons A., Upchurch K., Batchelor T. Clinical features and diagnosis of primary central nervous system lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am 2005;19(4):689–703.
20. Batchelor T., Loeffler J.S. Primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 2006 Mar 10; 24(8):1281–8.
21. Nelson D.F., Martz K.L., Bonner H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: can high dose, large volume radiation therapy improve survival? Report on a prospective trial by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG): RTOG 8315. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992;23(1):9–17.
22. Mead G.M., Bleehen N.M., Gregor A. et al. A medical research council randomized trial in patients with primary cerebral non-Hodgkin lymphoma: Cerebral radiotherapy with and without cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy. Cancer 2000;89(6):1359–70.
23. Olson J.J., Blakeley J.O., Grossman S.A., Weingart J., Rashid A., Supko J. et al. Differences in the distribution of methotrexate into high grade gliomas following intravenous administration, as monitored by microdialysis, are associated with blood brain barrier integrity. Proc Am Soc Clin Oncol 2006;24(Suppl):1548.
24. Ferreri A.J.M., Guerra E., Regazzi M. Area under the curve of methotrexate and creatinine clearance are outcome-determining factors in primary CNS lymphomas. Br J Cancer 2004;90:353–8.
25. Ferreri A.J., Reni M., Pasini F. et al. A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma. Neurology 2002;58(10):1513–20.
26. DeAngelis L.M., Seiferheld W., Schold S.C., Fisher B., Schultz C.J.; Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation therapy oncology group study 93-10. J Clin Oncol 2002;20(24):4643–8.
27. Ferreri A.J., Reni M., Foppoli M. et al. High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: A randomised phase 2 trial. Lancet 2009;374(9700):1512–20.
28. Abrey L.E., DeAngelis L.M., Yahalom J. Long-term survival in primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 1998;16(3):859–63.
29. Kurzwelly D., Glas M., Roth P. et al. Primary CNS lymphoma in the elderly: Temozolomide therapy and MGMT status. J Neurooncol 2010;97(3):389–92.
30. Fischer L., Thiel E., Klasen H.A. et al. Prospective trial on topotecan salvage therapy in primary CNS lymphoma. Ann Oncol 2006;17(7):1141–5.
31. Batchelor T.T., Lesser G.J., Grossman S.A. Rituximab monotherapy for relapsed or refractory primary central nervous system lymphoma. J Clin Oncol 2008;26(Suppl); abstr. 2043.
32. Shah G.D., Yahalom J., Correa D.D. et al. Combined immunochemotherapy with reduced whole-brain radiotherapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 2007;25(30):4730–5.
33. Rubenstein J.L., Johnson J.L., Jung S.H., Cheson B.D., Kaplan L.D. Intensive chemotherapy and immunotherapy, without brain irradiation, in newly diagnosed patients with primary CNS lymphoma: Results of CALGB 50202. Blood 2010; abstr. 763.
34. Angelov L., Doolittle N.D., Kraemer D.F. et al. Blood-brain barrier disruption and intra-arterial methotrexate-based therapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma: A multi-institutional experience. J Clin Oncol 2009;27(21):3503–9.
35. Doolittle N.D., Kraemer D.F., Lacy C. et al. Enhanced Delivery of Rituximab In Combination with Methotrexate-Based Blood-Brain Barrier Disruption for Patients with Newly Diagnosed Primary CNS Lymphoma Blood 2010; abstr. 2792.
36. Soussain C., Hoang-Xuan K., Taillandier L. et al. Intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue for refractory and recurrent primary CNS and intraocular lymphoma: Societe francaise de greffe de moelle osseuse-therapie cellulaire. J Clin Oncol 2008;26(15):2512–8.

Характеристика перестроек 11q23 *(MLL)* у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом

Г.А. Цаур[1,2], А.М. Попов[1,2], О.В. Алейникова[3], Э.Г. Бойченко[4], Т.Ю. Вержбицкая[1,2], Е.В. Волочник[3], А.С. Иванова[1,2], О.В. Каленник[5], С.Ю. Ковалев[6], К.Л. Кондратчик[7], А.М. Кустанович[3], Е.С. Лапотентова[3], Д.В. Литвинов[8], И.С. Мартынкевич[9], Н.В. Мякова[8], Т.В. Наседкина[5], В.А. Овсепян[10], Ю.В. Ольшанская[8], О.М. Плеханова[1], А.В. Попа[11], Т.О. Ригер[1,2], Л.И. Савельев[1,2,11], О.В. Стренева[1,2], М.В. Стригалева[1], И.В. Шмунк[12], Е.В. Шориков[1,2], Л.Г. Фечина[1,2]

[1]ГУЗ Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург;
[2]ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург;
[3]ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск;
[4]ГУЗ Детская городская больница № 1, Санкт-Петербург;
[5]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;
[6]ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург;
[7]Морозовская детская городская клиническая больница, Москва;
[8]ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва;
[9]ФГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург;
[10]ФГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства;
[11] ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург;
[12]ОГУП Челябинская областная станция переливания крови

***Контакты:** Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru*

Целью данной работы являлась характеристика перестроек 11q23 (MLL) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включая частоту их выявления, взаимосвязь с различными иммунологическими вариантами ОЛЛ, а также определение структуры химерных транскриптов у пациентов исследуемой группы. Для этого нами обследовано 117 пациентов с ОЛЛ без синдрома Дауна в возрасте от 1 до 365 дней. Перестройки 11q23 (MLL) были выявлены у 74 (63,2%) пациентов. В этой группе преобладала транслокация t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 — 63,5% случаев, реже встречались t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1 — 18,9% случаев, t(10;11)(p12; q23)/MLL-MLLT10 и t(1;11)(p32; q23)/MLL-EPS15 — по 6,8 % случаев; t(9;11)(p22; q23)/MLL-MLLT3 — в 2,7 %. У пациентов младше 6 мес перестройки 11q23 (ML L) были выявлены достоверно чаще, чем у пациентов в возрасте 6–12 мес — 84,0 % и 47,8 % случаев соответственно (p < 0,001). BI-вариант ОЛЛ статистически значимо чаще, а BII-ОЛЛ значительно реже встречались у пациентов с наличием аномалий 11q23 (MLL) по сравнению с теми, у кого эти транслокации не были выявлены (p < 0,001 в обоих случаях). У 26 пациентов с различными перестройками гена ML L было проведено определение структуры химерного транскрипта. В зависимости от локализации точки слияния в гене ML L и генах-партнерах выявлено 7 вариантов химерного транскрипта MLL-AF4, 3 варианта MLL-MLLT1, 2 варианта MLL-EPS15. В 14 (53,8%) случаях точка слияния располагалась в 11-м экзоне гена MLL.

***Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, дети первого года жизни, транслокации района 11q23, перестройки гена MLL*

Detection of 11q23 *(MLL)* rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia

G.A. Tsaur[1,2], A.M. Popov[1,2], O.V. Aleynikova[3], E.G. Boychenko[4], T.Yu. Verzhbitskaya[1,2], E.V. Volochnik[3], A.S. Ivanova[1,2], O.V. Kalennik[5], S.Yu. Kovalev[6], K.L. Kondtratchik[7], A.M. Kustanovich[3], E.S. Lapotentova[3], D.V. Litvinov[8], I.S. Martynkevich[9], N.V. Myakova[8], T.V. Nasedkina[5], V.A. Ovsepyan[10], Yu.V. Olshanskaya[8], O.M. Plehanova[1], A.V. Popa[11], T.O. Riger[1,2], L.I. Savelyev[1,2,11], O.V. Streneva[1,2], M.V. Strigaleva[1], I.V. Shmunk[12], E.V. Shorikov[1,2], L.G. Fechina[1,2]

[1]Regional Children's Hospital № 1, Yekaterinburg;
[2]Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg;
[3]Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk;
[4]Children's Municipal Hospital № 1, St.-Petersburg;
[5]Engelgardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Science, Moscow;
[6]B. Eltsyn Ural Federal University, Yekaterinburg;
[7]Morozov Pediatric Municipal Clinical Hospital, Moscow;
[8]Federal Research Institute of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[9]Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg;
[10]Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology;
[11]Ural State Medical Academy, Yekaterinburg;
[12]Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station

117 cases of infant acute lymphoblastic leukemia without Down syndrome (aged from 1 to 365 days) were included in the current study. Rearrangements of 11q23 (MLL) were revealed in 74 (63.2%) patients. Among this group the most common rearrangement was t(4;11)

(q21;q23)/MLL-AF4 detected in 63.5% cases, less frequently was found t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1 (in 18.9% cases), t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10 and t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15 (each one in 6.8 %), t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3 in 2.7 %. Children under 6 months of age had significantly higher incidence of 11q23 (MLL) rearrangements in comparison with infants older than 6 months (84.0 % vs. 47.8 %, p < 0.001). Patients with translocations 11q23 (MLL) more frequently had BI-ALL and less frequently BII-ALL than children without these rearrangements (p < 0.001 for both). Fusion gene transcript was sequenced in 26 MLL-rearranged cases. Depending on breakpoint position within MLL and partner genes we detected 7 different types of MLL-AF4 fusion gene transcript, 3 types of MLL-MLLT1, 2 types of MLL-EPS15. The most common fusion site within MLL gene was exon 11, detected in 14 (53.8%) patients.

Key words: *acute lymphoblastic leukemia, infants, translocation 11q23, MLL rearrangements*

Введение

Ген *MLL* (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia), располагающийся на длинном плече 11-й хромосомы в регионе 11q23, состоит из 37 экзонов [1] и кодирует гистоновую метилтрансферазу. Перестройки с вовлечением района 11q23 и участием гена *MLL* встречаются примерно в 10 % всех случаев острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и в 3% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [2, 3]. Наиболее частыми генами-партнерами *MLL* являются *AF4*, *MLLT1 (ENL), MLLT3 (AF9), MLLT4 (AF6), MLLT10 (AF10)*. Суммарно они встречаются более чем в 80% всех случаев *MLL*-позитивных острых лейкозов у детей и взрослых [4].

Среди всех возрастных категорий наиболее часто перестройки гена *MLL* выявляются у детей первого года жизни с ОЛЛ [5, 6], где частота их выявления может достигать 79% [7, 8]. Несмотря на относительную редкость ОЛЛ у детей данной возрастной группы, он представляет большой интерес для исследователей как из-за неблагоприятного прогноза [9–13], так и из-за особенностей биологии опухоли и наличия широкого спектра перестроек гена *MLL* [6, 14], которые могут возникать *in utero* [10, 15].

По механизму образования все перестройки 11q23 (*MLL*) можно разделить на инверсии, делеции, внутренние тандемные повторы, вставки, транслокации с вовлечением 3 и более хромосом, а также комбинации различных вариантов, например транслокация с одновременной делецией части гена *MLL* [4]. Наиболее часто встречаются реципрокные транслокации, на долю которых приходится более 80 % всех случаев перестроек 11q23 (*MLL*) как при ОЛЛ, так и при ОМЛ [16]. На сегодняшний день на молекулярном уровне охарактеризовано 64 транслокации [4]. Столь большое число перестроек затрудняет проведение молекулярно-генетической диагностики и верификацию гена-партнера[12].

Необходимо отметить, что особую ценность приобретает выявление перестроек гена *MLL* в свете того, что они представляют собой удобную мишень для мониторирования минимальной остаточной болезни (МОБ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ранее, в рамках протокола MLL-Baby [17], нам удалось показать прогностическую значимость выявления МОБ данным способом [18], а также раннего достижения молекулярной ремиссии у пациентов с наличием различных перестроек гена *MLL* [19].

Целью данной работы являлась характеристика перестроек гена *MLL* (11q23) у детей первого года жизни с ОЛЛ.

Материалы и методы

Проанализированы данные 117 пациентов с ОЛЛ без синдрома Дауна в возрасте от 1 до 365 дней (медиана — 211 дней). Их подробная характеристика представлена в табл. 1. Диагноз ОЛЛ у станавливался на основании стандартных цитоморфологических показателей [20], дополненных данными иммунофенотипирования согласно критериям группы EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) [21]. Все пациенты получали терапию по одному из следующих химиотерапевтических протоколов: MLL-Baby, ALL-MB-2002, ALL-MB-2008, ALL-BFM 90, ALL-MB 91, CO ALL в детских онкогематологических клиниках Российской Федерации

Таблица 1. *Инициальные данные 117 детей первого года жизни с ОЛЛ*

	n	%
Возраст		
Младше 6 мес	50	42,7
Старше 6 мес	67	57,3
Пол		
Мужской	43	36,8
Женский	74	62,2
Иммунофенотип		
Нет данных	3	–
BI-ОЛЛ	59	51,8*
BII-ОЛЛ	35	30,7*
BIII-ОЛЛ	17	14,9*
Т-ОЛЛ	3	2,6*

** Процент рассчитан от 114 пациентов, которым было проведено иммунофенотипирование.*

Таблица 2. *Число пациентов, обследованных разными методами и их комбинациями*

Метод	Число пациентов
Цитогенетика как единственный метод	14
ОТ-ПЦР как единственный метод	38
FISH как единственный метод	1
Цитогенетика + ОТ-ПЦР	35
Цитогенетика + FISH	24
ОТ-ПЦР + FISH	29
Цитогенетика + ОТ-ПЦР + FISH	23

и Республики Беларусь. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

Для цитогенетического анализа использовали клетки костного мозга и периферической крови, которые брали до начала терапии и культивировали 1 ч («прямые препараты») и/или 24–48 ч. Препараты окрашивали G-методом с предварительной обработкой трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 20 метафазных пластинок. Кариотипирование проводили в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека [22]. В 30 случаях дополнительно проводили исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с локус-специфичным зондом LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, США) согласно инструкции производителя.

Всем пациентам проводилось определение следующих химерных транскриптов: *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1, MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT4, MLL-MLLT10, MLL-ELL*. У 11 пациентов с отсутствием вышеуказанных химерных транскриптов дополнительно определяли экспрессию *MLL-SEPT9*, *MLL-MLLT11, MLL-EPS15*. Выявление химерных транскриптов проводили методом гнездной обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) или ОТ-ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе (набор реагентов «ЛК-Био чип», Биочип-ИМБ, Россия) по ранее описанным протоколам [19, 23–25]. В дальнейшем оба метода представлены как метод ОТ-ПЦР.

Число пациентов, обследованных разными методами и их комбинациями, приведено в табл. 2. Стандартное цитогенетическое исследование проведено 73 пациентам, ОТ-ПЦР — 102, FISH — 30. Все 3 метода одновременно применены у 23 пациентов. Использование того или иного метода выявления перестроек 11q23 (*MLL*) было обусловлено диагностическими возможностями каждой из лабораторий, проводивших обследование пациентов.

Для выявления типа химерных транскриптов проводили секвенирование полученных ПЦР-продуктов в прямом и обратном направлении на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США) с использованием «BigDy e Terminator 3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

При сравнении групп пациентов по качественным признакам применяли критерий χ^2 с поправкой Йетса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Анализ результатов проводили с помощью программ для статистической обработки данных Statistica 6.0.

Результаты

В исследованной группе перестройки гена *MLL* (11q23) выявлены у 74 из 117 (64,2 %) пациентов. Частота выявления перестроек 11q23 (*MLL*) при использовании различных методов диагностики представлена в табл. 3. Сравнение частоты выявления перестроек 11q23 (*MLL*), проведенных разными методами, показало, что при использовании FISH перестройки гена *MLL* выявлялись несколько чаще (73,3 %), но полученные результаты статистически не отличались от результатов цитогенетического (60,3 %) и молекулярно-генетического (61,8 %) методов исследования ($p = 0,303$ и $p = 0,326$ соответственно).

Результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований представлены в табл. 4.

Таблица 3. *Сравнение цитогенетического и молекулярно-генетических методов для выявления перестроек 11q23 (MLL)*

Метод	Обследовано ($n = 117$)	Выявлено ($n = 74$)
Цитогенетическое исследование	73	44 (60,3 %)
ОТ-ПЦР	102	63 (61,8 %)
FISH	30	22 (73,3 %)

Таблица 4. *Выявленные перестройки 11q23 (MLL)*

	n	%
Всего обследовано	117	
Всего выявлено перестроек гена *MLL*	74	63,2
t(4;11)(q21;q23) / *MLL-AF4*	47	40,2
t(11;19)(q23;p13) / *MLL-MLLT1*	14	12,0
t(9;11)(p22;q23) / *MLL-MLLT3*	2	1,7
t(10;11)(p12;q23) / *MLL-MLLT10*	5	4,3
t(1;11)(p32;q23) / *MLL-EPS15*	5	4,3
Неизвестный ген-партнер	1	0,9

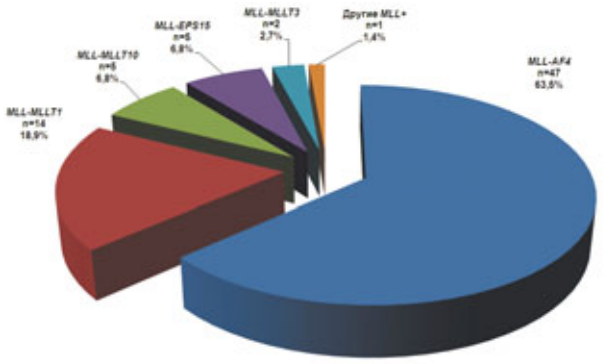


Рис. 1. *Относительная частота выявления перестроек 11q23 (ML L) у пациентов с ОЛЛ*

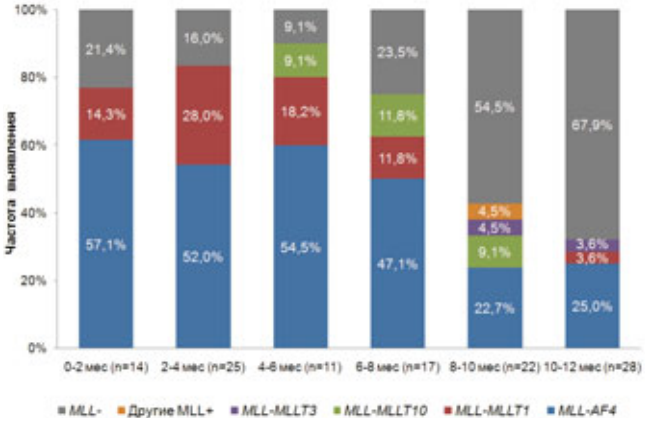


Рис. 2. *Встречаемость перестроек 11q23 (MLL) в различных возрастных группах*

Самой частой была транслокация t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4*, на 2-м месте — t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1*, другие перестройки гена *MLL* наблюдались значительно реже. В 1 (0,9%) случае методом FISH на интерфазных ядрах была выявлена перестройка гена *MLL*, однако идентифицировать ген-партнер не удалось. Относительная частота выявления перестроек 11q23 *(MLL)* представлена на рис. 1. На долю t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* приходилось 63,5% и 18,9 % от числа выявленных перестроек *MLL*/11q23 соответственно.

Для исследования взаимосвязи между перестройками 11q23 *(MLL)* и возрастом пациентов все случаи ОЛЛ у детей первого года жизни были разделены на 6 возрастных групп (рис. 2). Частота выявления t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* постепенно снижалась с увеличением возраста пациентов (от 57,1% в возрастной группе 0–2 мес до 25,0 % у детей в возрасте 10–12 мес), однако обнаруженные различия не достигли статистической значимости ($p = 0,088$). Транслокация t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* наиболее часто фиксировалась у детей в возрасте 2–4 мес — в 7 (28,0%) из 25 случаев. Четверо из 5 пациентов с t(10;11)(p12;q23)/*MLL-MLLT10* были старше 6 мес. Случаи с наличием t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EPS15* практически равномерно представлены во всех возрастных группах. Т ранслокация t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* не выявлялась у пациентов младше 8 мес.

При разделении пациентов на 2 группы — старше и младше 6 мес — выявлено, что у детей в возрасте младше 6 мес перестройки 11q23 *(MLL)* были обнаружены достоверно чаще (84,0% случаев) по сравнению с пациентами в возрасте 6–12 мес (47,8% случаев) ($p < 0,001$). Статистически значимые различия сохранялись для t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* (54,0% и 29,8% соответственно) ($p = 0,014$) и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* (22,0% и 4,5% соответственно) ($p = 0,009$).

Результаты иммунофенотипирования опухолевых клеток представлены в табл. 5. У 39 (83,0 %) из 47 пациентов с наличием t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* был обнаружен BI-ОЛЛ. Значительно реже у пациентов с данной хромосомной аберрацией выявлялись BII- и BIII-варианты (10,6% и 6,4% соответственно). Все пациенты с наличием t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EPS15*,

Таблица 5. *Число пациентов с различными иммунологическими вариантами ОЛЛ и наличием перестроек 11q23 (MLL)*

	BI-ОЛЛ	BII-ОЛЛ	BIII-ОЛЛ	Т-ОЛЛ	Нет данных	Всего
t(4;11)(q21;q23) / *MLL-AF4*	39	5	3	0	0	47
t(11;19)(q23;p13) / *MLL-MLLT1*	5	3	5	0	1	14
t(9;11)(p22;q23) / *MLL-MLLT3*	0	2	0	0	0	2
t(10;11)(p12;q23) / *MLL-MLLT10*	2	0	3	0	0	5
t(1;11)(p32;q23) / *MLL-EPS15*	5	0	0	0	0	5
Неизвестный ген-партнер *MLL*	1	0	0	0	0	1
Нет перестроек 11q23 *(MLL)*	7	25	6	3	2	43
Всего	59	35	17	3	3	117

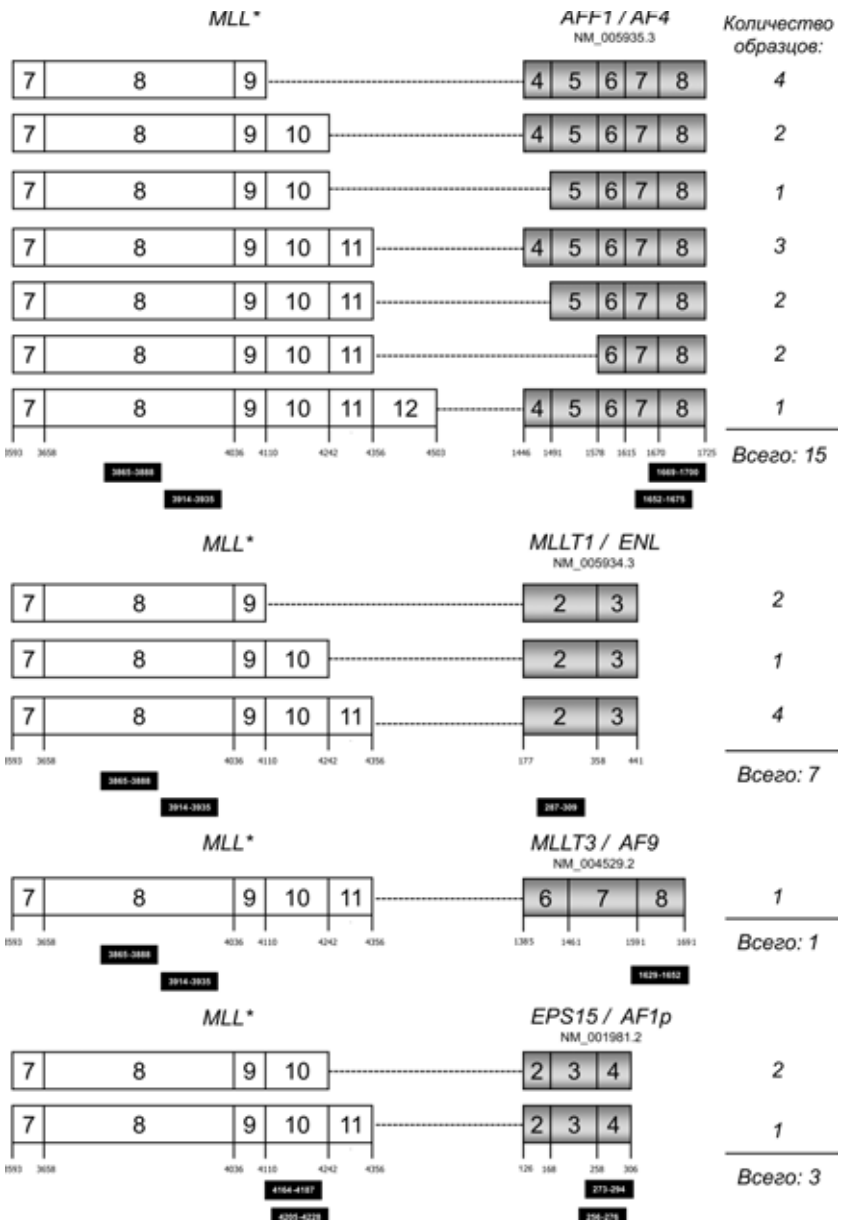


Рис. 3. *Локализация точек слияния в гене MLL и генах-партнерах у 26 пациентов. Белые прямоугольники — экзоны гена MLL, серые — экзоны генов-партнеров. Для всех генов-партнеров приведены номера референсных последовательностей (NM) нормальных транскриптов.*
** Нумерация экзонов гена MLL дана по работе Nilson et al., 1996 [1]. Праймеры для проведения гнездной ОТ-ПЦР схематически представлены в виде черных прямоугольников. Цифры внутри черных прямоугольников соответствуют местам начала и конца праймера по отношению к нормальной мРНК соответствующего транскрипта. Цифры под схематическим изображением экзонов соответствуют месту началу экзона*

t(10;11)(p12;q23)/*MLL-MLLT10,* а также с неопределенным геном-партнером *MLL* имели BI-ОЛЛ или BIII-ОЛЛ, в то время как оба пациента с t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* — BII-ОЛЛ. При наличии t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* по 5 (38,5 %) из 13 пациентов имели BI-ОЛЛ и BIII-ОЛЛ, а 3 (23,1 %) — BII-ОЛЛ. У пациентов с отсутствием перестроек *MLL*/11q23 в большинстве случаев (60,1 %) зафиксирован BII-ОЛЛ.

Таким образом, у пациентов с наличием перестроек 11q23 *(MLL)* BI-ОЛЛ встречался достоверно чаще, чем другие иммунологические варианты ($p < 0,001$). В то же время BII-ОЛЛ у этих пациентов выявлялся значительно реже, чем BI и BIII ($p < 0,001$). Связи наличия BIII-ОЛЛ с выявлением перестроек 11q23 *(MLL)* выявлено не было ($p = 0,989$). У пациентов с Т-ОЛЛ ($n = 3$) перестроек гена *MLL* (11q23) нами не найдено.

Исследование методом секвенирования для выявления структуры химерного транскрипта было выполнено у 26 больных. Из этого числа 15 пациентов имели *MLL-AF4*, 7 — *MLL-MLLT1*, 3 — *MLL-EPS15*, 1 — *MLL-MLLT3*. Среди всех транскриптных вариантов *MLL-AF4* наиболее часто был обнаружен вариант со слиянием 9-го экзона гена *MLL* и 4-го экзона гена *AF4* (e9e4) — в 4 случаях из 15. Реже выявлялись

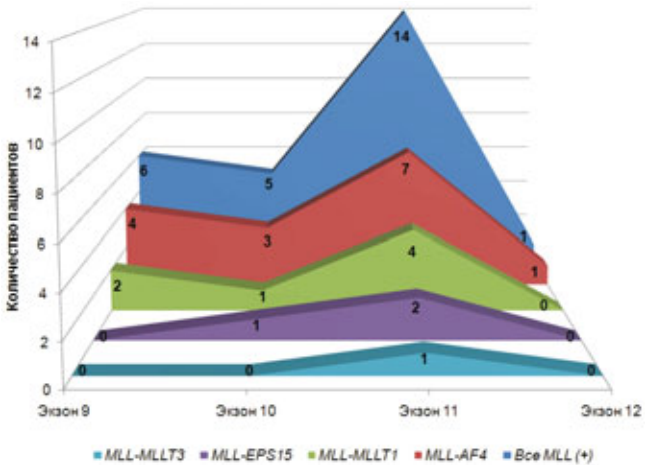


Рис. 4. *Распределение точек слияния в гене MLL. Представлены результаты определения точек слияния в регионе с 9-го по 12-й экзоны гена MLL у 26 пациентов с ОЛЛ, включая 15 случаев MLL-AF4, 7 случаев MLL-MLLT1, 3 случая MLL-EPS15, 1 случай MLL-MLLT1*

химерные транскрипты e11e4 — 3 случая, e10e4, e11e5, e11e6 — по 2 случая каждого соответственно (рис. 3). Среди транскриптных вариантов *MLL-MLLT1* преобладал e11e2 — 4 случая из 7. У всех 7 пациентов точка слияния в гене *MLLT1* находилась во 2-м экзоне. Среди 3 пациентов с наличием химерного транскрипта с *MLL-EPS15* у 2 был выявлен вариант e11e2, у 1 — e10e2. Единственный пациент с *MLL-MLLT3*, у которого была определена структура химерного транскрипта, имел точку слияния в 11-м и 6-м экзонах соответственно. Суммарно наиболее частой точкой слияния в гене *MLL* являлся 11-й экзон, на долю которого приходится более половины всех исследованных нами случаев — 14 из 25 (рис. 4).

Обсуждение

В настоящей работе проведено исследование частоты встречаемости различных перестроек 11q23 (*MLL*) у детей первого года жизни с диагнозом ОЛЛ. Эти перестройки нами были выявлены у 74 (63,2 %) из 117 пациентов. Оказалось, что частота обнаружения вышеуказанных перестроек ниже, чем в международном исследовании Interfant-99, где перестройки *MLL* были зарегистрированы в 79,3 % случаев (расчет сделан от числа информативных исследований) [7], а также в 2 последовательных исследованиях MLL96 и MLL98, где частота выявления перестроек гена *MLL* составила 78,4% [8]. В то же время наши результаты соответствуют данным, полученным в разное время в Бразилии — 58,1% [26], Германии — 65,9%, [27], Великобритании — 66,0% [28], США — 68,7% [13]. Однозначно объяснить причину полученных различий не представляется возможным. При этом следует отметить, что большинство пациентов, включенных в исследование Interfant-99, наряду с цитогенетическим и молекулярно-генетическим исследованиями были обследованы методом FISH [7], а всем пациентам, получавшим терапию по протоколам MLL96 и MLL98, проводилось исследование методом гибридизации по Саузерну [8]. Оба метода позволяют выявить любые перестройки *MLL,* в том числе криптические. В то же время проведенное в рамках данной работы сравнение частоты выявления перестроек 11q23 (*MLL*) не выявило статистически значимых различий использования 3 диагностических методов. Однако это может быть связано с недостаточной мощностью исследования, в частности, небольшим количеством пациентов, которым проводилась FISH.

Сравнение относительной частоты выявления различных перестроек 11q23 (*MLL*) показало, что наиболее часто в исследованной нами группе встречались t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1,* что полностью совпадает с ранее опубликованными данными [4, 7, 8, 13, 26–28]. Данные литературы по частоте встречаемости транслокации t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* противоречивы: ряд исследователей ставят ее на 3-е место по частоте обнаружения у детей первого года жизни с ОЛЛ (11,2–15,6 %) [7, 8, 13], в то же время в работе C.-H. Pui et al. при анализе данных 11 кооперативных групп по лечению ОЛЛ у детей младше 12 месяцев данная транслокация была выявлена только в 3,7% случаев от общего числа перестроек 11q23 (*MLL*) [12]. В нашем исследовании t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* встретилась только у 2 (2,7 %) пациентов.

Несколько чаще, чем это описывалось ранее (6,7 % по сравнению с 2,3–3,0 %) [4, 12] нам встретилась реципрокная транслокация t(1;11)(p32;q23), ведущая к образованию химерного гена *MLL-EPS15.* Ген *EPS15* (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15), также известный как *AF1P*, *AF-1P*, *MLLT5*, впервые описан Bernard et al. в 1994 г. [29]. Данный ген, расположенный на коротком плече 1-й хромосомы в регионе 1p32, кодирует один из рецепторов эпидермального фактора роста. В отличие от белков AF4, MLL T1, MLLT3 и MLLT10, которые располагаются в ядре клетки, EPS15 локализуется в цитоплазме, что обу славливает несколько иной механизм взаимодействия с белком MLL [30]. При этом происходит образование дву спиральных олигомеров EPS15, которые только в таком виде способны приводить к лейкемической трансформации белка MLL. Следует отметить, что t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EPS15* примерно с одинаковой частотой (2–3 %) описывается у детей как при ОЛЛ, так и при ОМЛ [4, 31].

По нашим данным, частота выявления перестроек 11q23 *(MLL)* достоверно отличалась у детей младше и старше 6 мес ($p < 0,001$); при этом пик приходится на возрастную группу 4–6 мес, где эта величина достигла 91,9 %. Сходные результаты получены и другими исследовательскими группами [32, 33]. Описанное в отдельных работах преобладание частоты выявления перестроек гена *MLL* у детей в первые 3 месяца жизни по сравнению с более старшими детьми первого года жизни [26] не нашло подтверждения в нашей работе.

Проведенный нами анализ иммунофенотипа опухолевых клеток показал преобладание у детей первого года жизни BI-варианта ОЛЛ, который был выявлен у 51,8% пациентов, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными, в которых BI-ОЛЛ выявлялся с частотой 47,3–64,6% [26, 27, 34]. Мы вместе с другими авторами отмечаем доминирование этого иммунологического варианта у пациентов с наличием перестроек 11q23 *(MLL)* и, наоборот, более частое выявление BII-ОЛЛ среди больных, у которых эти перестройки не были обнаружены [26, 27, 32, 34].

Большая вариабельность точек разрыва в гене *MLL* и генах-партнерах значительно усложняет выявление отдельных перестроек и использование их в качестве мишеней для мониторинга МОБ. В связи с этим чрезвычайно важно определять структуру химерных транскриптов для последующего качественного и количественного анализа МОБ методом ПЦР в реальном времени. Известно, что, в отличие от взрослых пациентов с ОЛЛ, у детей первого года жизни наиболее частой зоной разрыва в гене *MLL* является интрон 11, на долю которого приходится до половины всех случаев перестроек гена *MLL* [4, 35]. На уровне матричной РНК (мРНК) это приводит к образованию химерных транскриптов с точкой слияния в экзоне 11. В нашей работе это встретилось у 14 (53,8%) из 26 обследованных пациентов. Кроме того, для *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-EPS15* нами выявлено более 1 варианта химерных транскриптов. Наибольшей гетерогенностью обладал *MLL-AF4*, для которого выявлено 7 транскриптных вариантов; для *MLL-MLLT1* было найдено 3 варианта, для *MLL-EPS15* — 2. При этом, если в *MLLT1* и *EPS15* точка слияния в гене-партнере была постоянной (экзон 2 во всех случаях), то в *AF4* было выявлено 3 точки слияния — экзон 4 (11 случаев), экзон 5 (3 случая) и экзон 6 (2 случая).

Исследование инициальных характеристик у пациентов первого года жизни с ОЛЛ важно по ряду причин. Показано, что такие параметры, как возраст, инициальный лейкоцитоз, наличие и тип перестроек 11q23 (*MLL*), иммунофенотип и ответ на терапию оказывают важное влияние на исход данного заболевания [7, 12, 36–39].

Известно, что бессобытийная выживаемость детей младше 12 месяцев, больных ОЛЛ, значительно уступает таковой детей старше 12 месяцев [12, 40, 41]. Имеются существенные различия и среди пациентов первого года жизни. Показано увеличение длительности бессобытийной выживаемости в соответствии с увеличением возраста пациентов [5, 7], а минимальная продолжительность бессобытийной выживаемости зафиксирована у пациентов с лейкозом, манифестировавшим в течение первого месяца жизни [42].

Практически все исследовательские группы сходятся в том, что наличие любых перестроек 11q23 (*MLL*) значительно ухудшает прогноз заболевания [7–9, 12, 13]. В то же время существует мнение о неравнозначной прогностической роли различных аномалий 11q23 (*MLL*) при ОЛЛ у детей первого года жизни. Традиционно считается, что наиболее неблагоприятной является транслокация t(4;11)/*MLL-AF4*, в то время как прогноз для пациентов с t(11;19)/*MLL-MLLT1* и t(9;11)/*MLL-MLLT3* — несколько лучше [12, 36, 43]. С другой стороны, в рамках проспективного исследования Interfant-99 пациенты с любой из вышеперечисленных транслокаций имели сходные показатели бессобытийной выживаемости [5]. Все это подчеркивает необходимость дальнейшего накопления данных о связи конкретных перестроек с исходами ОЛЛ у детей первого года жизни.

Выводы

1. Перестройки района 11q23 с вовлечением гена *MLL* выявлены нами у 63,2% пациентов с ОЛЛ. Среди пациентов исследованной группы преобладали t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* — 63,5% случаев и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* — 18,9% случаев.

2. Наиболее часто перестройки 11q23 *(MLL)* обнаружены в возрастной группе 4–6 месяцев, где частота выявления достигла 91,9%, а наиболее редко– у пациентов в возрасте 10–12 месяцев (32,1%).

3. У пациентов в возрасте младше 6 месяцев перестройки 11q23 *(MLL)* были выявлены в 84,0% случаев, а в возрасте 6–12 месяцев — в 47,8% случаев.

4. BI-вариант ОЛЛ достоверно чаще, а BII-ОЛЛ значительно реже встречались у пациентов с наличием перестроек 11q23 (*MLL*).

5. При исследовании структуры химерных транскриптов выявлено, что наиболее часто точка слияния располагается в 11-м экзоне гена *MLL*.

Авторы выражают глубокую признательность Е.В. Флейшман и О.И. Соковой за ценные советы и критические замечания, полученные в процессе работы над статьей, а также благодарят врачей-гематологов и детских онкологов, предоставивших данные о пациентах первого года жизни с острыми лейкозами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nilson I., Loechner K., Siegler G. et al. Exon/intron structure of ALL1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias. Br J Haematol 1996;94(4):966–72.
2. Armstrong S., Look A. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2005;23:6306–15.
3. Schoch C., Schnittger S., Klaus M. et al. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. Blood 2003;102:2395–402.
4. Meyer C., Kowarz E., Hofmann J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia 2009;23:1490–9.
5. Reaman G., Zeltzer P., Bleyer W. et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the Children's Cancer Study Group. J Clin Oncol 1985;3:1513–21.

6. Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui C.-H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood 2000;96:24–33.
7. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. Lancet 2007;370(9583):240–50.
8. Tomizawa D., Koh K., Sato T. et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. Leukemia 2007;11:2258–63.
9. Chen C-S., Sorensen P., Domer P. at el. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood 1993;81:2386–93.
10. Greaves M. Infant leukemia: biology, aetiology and treatment. Leukemia 1996;10:372–7.
11. Isoyama K., Eguchi M., Hibi S. et al. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). Br J Haematol 2002;118:999–1010.
12. Pui C.-H., Chessells J., Camitta B. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. Leukemia 2003;17:700–6.
13. Hilden J., Dinndorf P., Meerbaum S. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. Blood 2006;108:441–51.
14. Cimino G., Rapanotti M., Sprovieri T., Elia L. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. Haematologica 1998;83:350–7.
15. Gale K., Ford A., Repp R. et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13950–4.
16. Slany R. The molecular biology of mixed lineage leukemia. Haematologica 2009;94:984–93.
17. Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. Blood 2007;110(11):832A. Abstr. 2828.
18. Tsaur G., Popov A., Nasedkina T. et al. Minimal residual disease monitoring by quantification of fusion gene transcript in infant with MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia by MLL-Baby protocol. Blood 2010;116(21):1126. Abstr. 2731.
19. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. Онкогематология 2010;2:46–54.
20. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33:451–8.
21. Bene M., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995;9(10):1783–6.
22. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Editors: Shaffer L.G., Tommerup N. Karger, Basel, Switzerland, 2005.
23. Borkhardt A., Repp R., Haupt E. et al. Molecular analysis of MLL/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1994;8:549–53.
24. Pallisgaard N., Hokland P., Riishoj D. et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. Blood 1998;92:574–88.
25. Dongen van J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia 1999;13:1901–18.
26. Emerenciano M., Arias D., Coser V. et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian collaborative study group of infant acute leukemia. Pediatr Blood Cancer 2006;47:549–54.
27. Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia — combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. Leukemia 2002;16:1685–90.
28. Chessells J., Harrison C., Kempski H. et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. Leukemia 2002;16:776–84.
29. Bernard O., Mauchauffe M., Mecucci C. et al. A novel gene, AF-lp, fused to HRX in t(1;11)(p32;q23) is not related to AF-4, AF-9 nor ENL. Oncogene 1994;9:1039–45.
30. DiMartino J., Cleary M. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. Br J Haematol 1999;106:614–26.
31. Harrison C., Cuneo A., Clark R. et al. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. Leukemia 1998;12:811–22.
32. Jansen M., Corral L., van der Velden V. et al. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. Leukemia 2007;21:633–41.
33. Lightfoot T. Aetiology of Childhood Leukemia. Bioelectromagnetics 2005; Suppl 7:5–11.
34. Mathew S., Behm F., Dalton J., Raimondi S. Comparison of cytogenetics, Southern blotting and fluorescence *in situ* hybridization as methods for detecting MLL gene rearrangements in children with acute leukemia and with 11q23 abnormalities. Leukemia 1999;13:1713–20.
35. Burmeister T., Meyer C., Schwartz S. et al. The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. Blood 2009; 113:4011–5.
36. Pui C.-H., Gaynon P., Boyett J. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. Lancet 2002;359:1909–15.
37. Silverman L., McLean T., Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. Cancer 1997;80:2285–95.
38. Dordelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. Blood 1999;94:1209–17.
39. Velden van der V., Corall L., Valsecchi M. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. Leukemia 2009;23:1073–9.
40. Pui C.-H., Frankel L., Carroll A. et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): A collaborative study of 40 cases. Blood 1991;77:440–7.
41. Mann G., Cazzaniga G., van der Velden V. et al. Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) in children one year and older: the 'big sister' of the infant disease? Leukemia 2007;21:642–6.
42. Linden van der M., Valsecchi M., De Lorenzo P. et al Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. Blood 2009; 114:3764–8.
43. Pui C.-H., Ribeiro R., Campana D. et al. Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. Leukemia 1996;10:952–6.

Нарушения в системе белка p53 и их влияние на патогенез хронических лимфопролиферативных заболеваний

П.М. Кондратовский, А.И. Дубиков, А.Ю. Дорошевская
Владивостокский государственный медицинский университет

Контакты: *Павел Максимович Кондратовский k855va@gmail.com*

В настоящее время активно обсуждается роль белков семейства p53 как в рамках патогенеза хронических лимфопролиферативных заболеваний, так и в свете растущего интереса к терапевтическому потенциалу так называемых малых молекул, способных влиять на регуляторные «взаимоотношения» молекул p53, MDM2, p21 и PUM A. Представленная статья является попыткой обобщить данные экспериментальных моделей на тканях опухоли и мышиных моделях и доступных в литературе исследований с использованием материала лимфоидных опухолей человека. Рассмотрены как аспекты прогностической значимости экспрессии белков семейства p53 при лимфопролиферативных заболеваниях, так и возможные терапевтические подходы, использующие особенности взаимоотношений p53-молекулы с генами-регуляторами и эффекторами.

Ключевые слова: *хронические лимфопролиферативные заболевания, лимфомы, хронический лимфолейкоз, апоптоз, p53, MDM2, p21, PUMA*

P53 pathway changes and their influence on chronic lymphoproliferative diseases pathogenesis

P.M. Kondratovskiy, A.I. Dubikov, A.Yu. Doroshevskaya
Vladivostok State Medical University

The role of p53 family proteins, both in the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders, and in aspects of the growi ng interest in the therapeutic potential of so-called small molecules capable of influencing the regulatory "relationship" of p53, MDM2, p21 and P UMA is currently actively debated. The article is an attempt to summarize the data on experimental tumor and mouse models and available in the literature results of studies using human lymphoid tumors. Prognostic significance of p53 family proteins expression in lymphoproliferativ e diseases and possible therapeutic approaches using the features of the p53 relationship with regulators and effectors genes are considered.

Key words: *chronic lymphoproliferative diseases, lymphomas, chronic lymphocytic leukemia, apoptosis, p53, MDM2, p21, PUMA*

Введение

Учение о лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) — пожалуй, самая обширная область гематологии и внутренних болезней. Поскольку клетки, составляющие иммунную систему, являются широко распространенными и обладают значительной функциональной гетерогенностью, ЛПЗ могут возникать фактически в любом органе и иметь различные гистологические черты, клинические проявления и прогноз.

Во всем мире наблюдается рост частоты неходжкинских лимфом (НХЛ). В России, по данным РО НЦ им. Н.Н. Блохина РАМН за 2004 год и отдельных публикаций, показатель заболеваемости всеми формами лимфом составил 8,0 на 100 тыс. населения, что на 3,9 % больше, чем в 2003 г. Заболеваемость хроническим лимфолейкозом колеблется от 2,0 до 6,0 на 100 тыс. взрослого населения. Максимальный уровень заболеваемости приходится на возраст 70–79 лет за счет НХЛ. В целом наблюдается линейная зависимость возраста и заболеваемости всеми формами лимфом.

Утрата контроля над пролиферацией, вызванная последствиями транслокаций хромосомного материала, открывает путь к неоплазии, но сама по себе недостаточна для злокачественной трансформации. Имеющиеся данные свидетельствуют, что для окончательного становления автономной пролиферации клеток (опухоли) необходимо наличие еще как минимум одного случайного неблагоприятного события.

В настоящее время активно обсуждается роль белков семейства p53 как в рамках патогенеза хронических ЛПЗ, так и в свете растущего интереса к терапевтическому потенциалу так называемых малых молекул, способных влиять на регуляторные «взаимоотношения» молекул p53, MDM2, p21 и PUMA. Данные в этой области проходят стадию первоначального накопления и представлены экспериментальными моделями на тканях опухоли и мышиных моделях и доступных в литературе исследований с использованием материала лимфоидных опухолей человека представлены сравнительными описаниями частоты экспрессии различных белков семейства p53 с выводами об их вероятной прогностической значимости. Принимая во внимание лавинообразный рост подобных сообщений и привлекательность идеи использования воздействия малых молекул на регуляторные механизмы естественной клеточной гибели, особенно в такой широко распространенной группе онкогематологических заболеваний, возникает естественный интерес к анализу доступных литературных данных и проведению иссле-

дований на материале опухолей человека с использованием современных технологий.

Апоптоз и онкогенез

Одним из важных патогенетических механизмов онкогенеза является нарушение механизма программируемой гибели клетки — апоптоза. Апоптоз регулируется белками p53 и Bcl-2. Дикий (т. е. нормальный) тип p53 индуцирует апоптоз, а Bcl-2 и Bcl-X его блокируют. В результате мутации дикого типа *TP53* образуется мутантный тип гена *TP53*, клетка теряет способность к апоптозу, вследствие чего может возникать опухоль. Дикий тип гена *TP53* является геном-супрессором, продукт которого ингибирует трансформацию клеток, мутантный ген *TP53* — онкогеном, который наряду с другими онкогенами участвует в механизмах канцерогенеза. Дикий тип белка p53 не только индуцирует апоптоз, но и блокирует клеточный цикл, возможно, совместно с MYC протеином, в точке контроля в фазе G1 или перехода фазы G1 в S-фазу . Продукты гена *TP53* нужны клетке для инициации апоптоза в ответ на генотоксические повреждения. Этот фундаментальный путь позволяет организму освобождаться от поврежденных и потенциальных опухолевых клеток [1] (рис. 1).

Другие гены, контролирующие апоптоз, — это семейство *Bcl-2*. Первым белком, регулирующим апоптоз, был описан Bcl-2, кодиру емый протоонкогеном *Bcl-2*. Затем было выявлено целое семей ство генов *Bcl-2*, контролирующих апоптоз.

Ген *TP53*, располагающийся на коротком плече хромосомы 17, кодирует образование ядерного белка, состоящего из 393 аминокислот, с молекулярной массой 53 кД. Т етрамер p53 функционируе т как транскрипционный фактор, связываясь своим карбоксильным окончанием со специфическими регионами генов-мишеней [2]. Белок p53 находится в цитоплазме в латентном состоянии, активация его происходит не только в ответ на поражение ДНК, но также может явиться следствием многих других процессов, происходящих в клетке, в том числе, активации онкогенов, гипоксии, дефицита питания, старения и др. (рис. 2).

При активации белок p53 способен инициировать независимо друг от друга 2 программы:

• временную остановку клеточного цикла в G1-фазе с помощью белка p21W AFI, ингибирующего циклин-зависимые киназы;

• стимуляцию апоптоза путем активации генов *Bax* или *Bid* — проапоптотических генов семьи *Bcl-2* и/или активации образования свободных форм кислорода, способствующих выходу цитохрома из митохондрий.

Экспериментальные данные с выключением генов позволяют предположить, что приоритетной для большинства клеток является программа временной остановки митотического цикла. Есть сведения и об участии p53 в процессах репарации ДНК путем активации гена *P53R2*, кодирующего рибонуклеотидредуктазу . Программа апоптоза включается при невозможности репарировать ДНК во время остановки клеточного цикла и/или дефиците белка p21W AFI. В некоторых клетках генетически обусловлен приоритет программы апоптоза при активации гена *TP53*.

Основной функцией гена *TP53* следует считать включение программы апоптоза при повреждении клеточного генома, что можно рассматривать как защитную реакцию организма от накопления генетически дефектных клеток. Снижение активности гена *TP53* или мутация в нем, приводящая к потере способности к включению апоптоза, является серьезным фактором, предрасполагающим к возникновению опухолей и развитию резистентности к химиотерапии. Мутация гена *TP53* обнаруживается более чем в половине раковых опухолей, частота ее повышается при длительной химиотерапии.

Итак, ген *TP53* необходим для реализации программы апоптоза при повреждении ДНК и токсических воздействиях на клетку. Следующим шагом в проведении проапоптотического сигнала по этому пути является включение семьи *Bcl-2* генов.

Интерес к апоптозу резко возрос в середине 80-х годов, когда было выявлено [3, 4], что усиление активности онкогена *Bcl-2*, являющееся следствием обычной для В-клеточной фолликулярной лимфомы человека транслокации t(14;18), приводит к образованию опухолевого клона не за счет у силения пролиферации, а вследствие повышения выживаемости опухолевых клеток. Позднее было показано, что при этой транслокации онкоген *Bcl-2*, изначально располагавшийся на хромосомном сегменте 18q21, сливается с локу сом, кодирующим тяжелую цепь Ig на хромосоме 14q32, что приводит к его повышенной экспрессии. Молекулярно-генетические исследования показали, что в так называемую семью *Bcl-2* генов, картированных у человека на хромосоме 18, входят и другие гены, экспрессирующие белки с противоположной функцией [5–7].

В настоящее время клонировано 16 генов, составляющих эту семью. Белки, производные этих генов, объединяет сходный морфологический состав — каждый из них имеет хотя бы одну из четырех консервативных аминокислотных последовательностей, характерных для Bcl-2. Эти последовательности известны как регионы, гомологичные Bcl-2 (BH1–BH4). Функциональное значение этих регионов до конца не ясно, но, по мнению некоторых исследователей, именно они определяют реактивные способности белков этого семейства.

Только 6 белков из 16 контролиру емых генами семейства *Bcl-2* оказывают антиапоптотическое действие: защищают клетки от широкого спектра физиологических и экспериментальных воздействий, направленных на индукцию апоптоза. К таким стимулам относятся повреждение ДНК, действие глюкокортикоидов, прекращение цитокиновой регуляции и др.

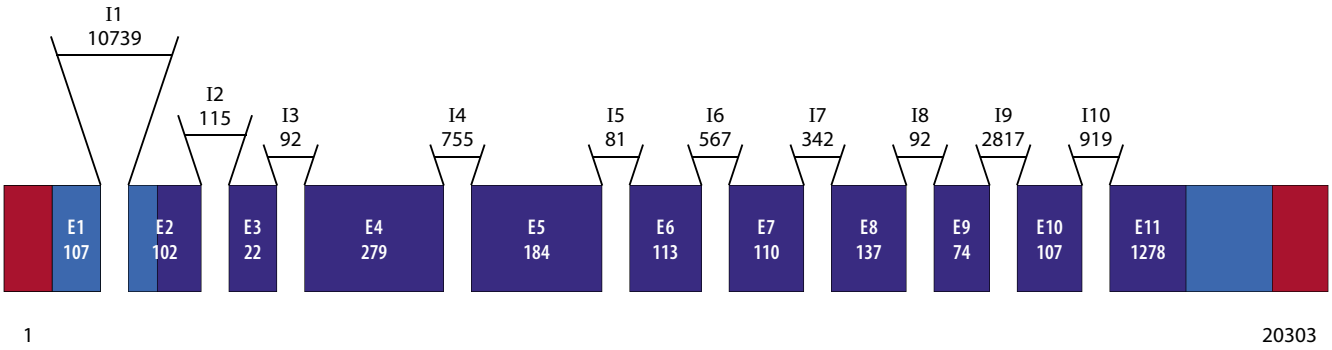


Рис. 1. *Структура гена p53 человека: 22 000 пар оснований; 11 экзонов (синий цвет), кодирующих матричную РНК. Т рансляция начинается в экзоне 2. Размеры экзонов и интронов указаны в парах оснований*

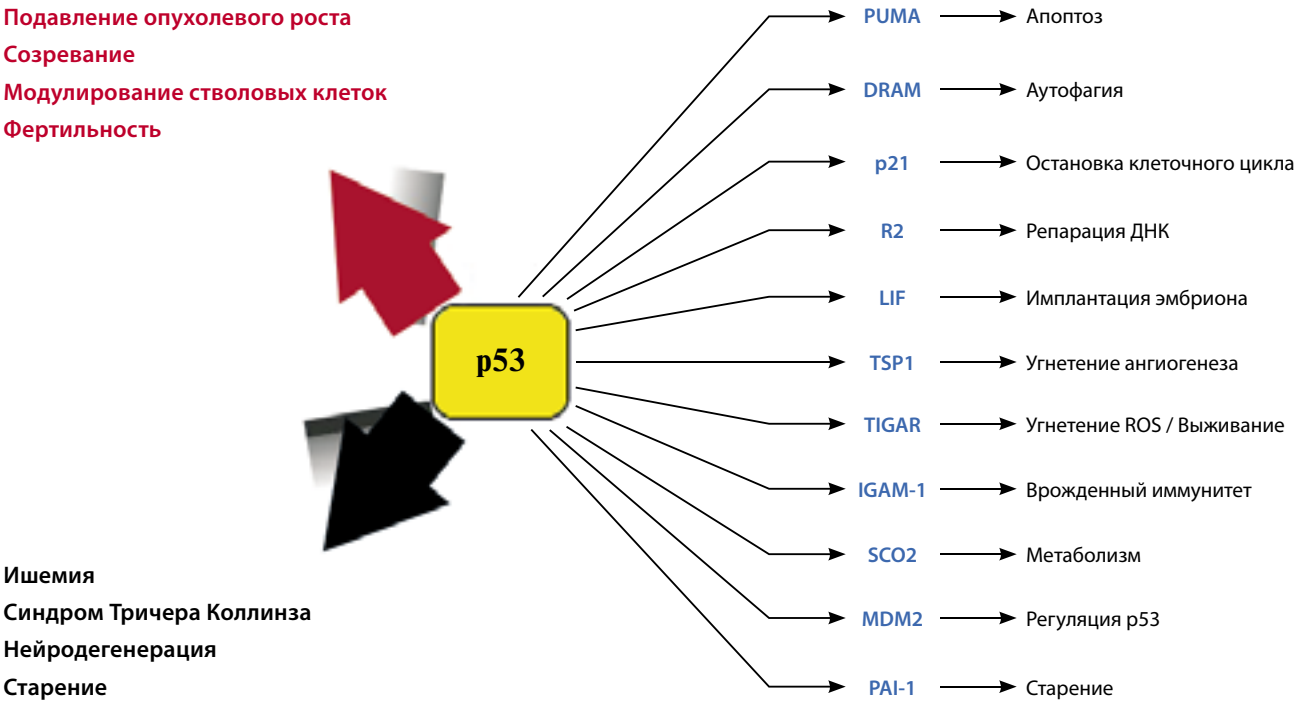


Рис. 2. *Схема основных каскадов, в которых участвует p53*
В дополнение к своей хорошо известной роли опухолевого супрессора, p53 также регулирует другие клеточные (справа) и физиологиче ские/па-тологические процессы (слева). Эти процессы включают как положительные исходы (красная стрелка), так и заболевания и другие неблагоприятные исходы (черная стрелка). Также показаны примеры генов-мишеней p53 (выделены синим цветом), регулируемые p53 и влекущие указанные клеточные ответы

Некоторые из белков этой группы имеют COO H-концевой гидрофобный регион, ответственный за прикрепление белков к наружной поверхности митохондриальной мембраны.

Остальные 10 членов семьи Bcl-2 вызывают апоптоз. Эти проапоптотические белки могут быть подразделены на 2 подгруппы в зависимости от числа BH-регионов, которыми они располагают. Первые 3 имеют по 2–3 BH-региона, в то время как у 7 остальных обнаруживается только 1 BH3-регион. Именно с этим регионом связывают проапоптотическую функцию белков. Многие из проапоптотических белков так же, как антиапоптотические белки этой семьи, имеют концевой гидрофобный домен, но в отличие от последних не прикрепляются к митохондрии до получения проапоптотического сигнала.

Восприятие анти- или проапоптотических сигналов членами семьи Bcl-2 происходит как на уровне генов (так, белок p53 повышает экспрессию гена *Bax*), так и на уровне посттранскрипционных белков (действие цитокинов). При этом между самими белками наблюдаются сложные взаимодействия, иногда антагонистические.

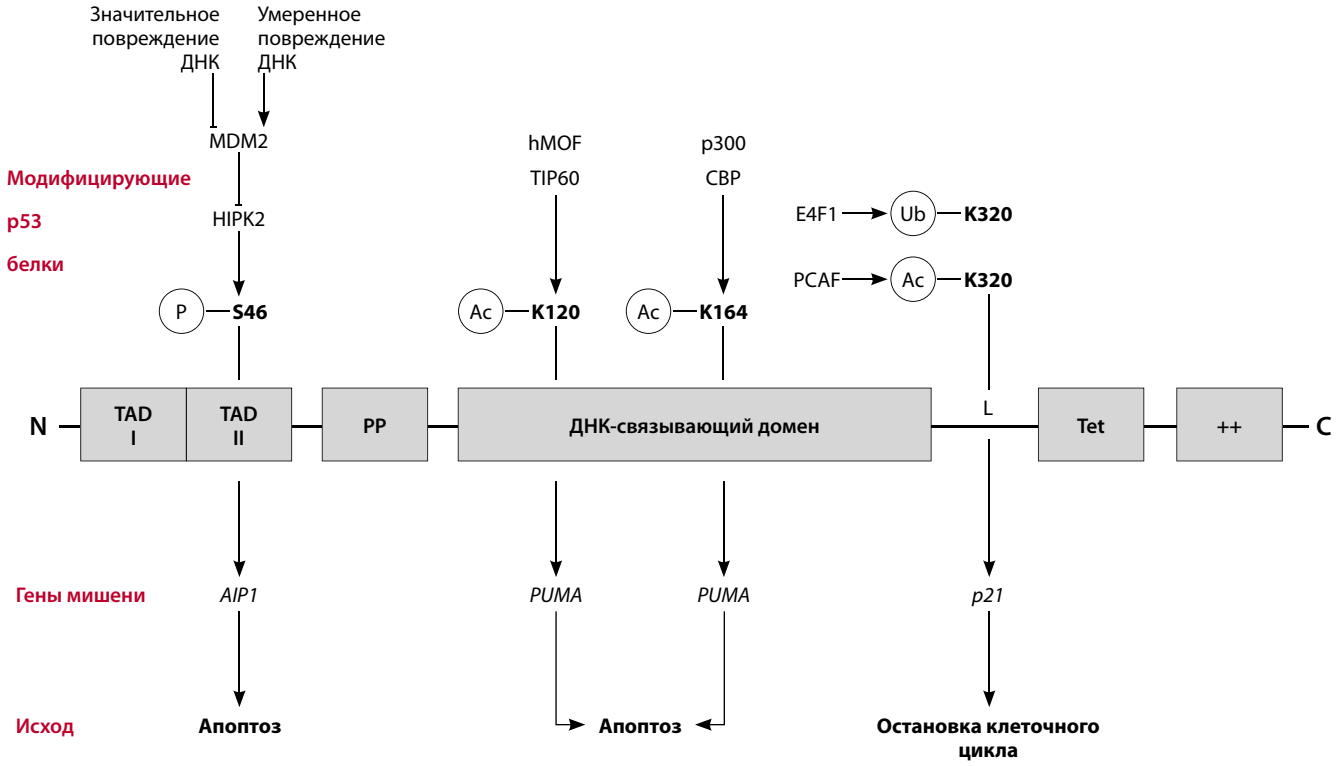


Рис. 3. *Основные функциональные домены p53 и основные механизмы его регуляции*
Основные домены p53 включают домены активации транскрипции (T AD I, остатки 20-40 и T AD II, остатки 40-60), пролиновый домен (PP , остатки 60-90), ДНК-связывающий домен (остатки 100-300), связывающий регион (L, остатки 301-324), домен тетрамеризации (Tet, остатки 325-356) и основной С-терминальный домен (++, остатки 363-393). Приведены примеры, в которых есть некоторые остатки, модифициру емые через фосфорилирование (P), ацетилирование (Ac) или убиквинирование (Ub), что приводит к специфическим клеточным исходам в ответ на активацию p53 (для примера — апоптоз или остановка клеточного цикла), что в свою очередь зависит от преимущественной активац ии указанных генов-мишеней

В процессе этих взаимодействий про- и антиапоптотические протеины могут образовывать гомо- и гетеродимеры как внутри своей группы, так и с протеинами противоположной направленности действия.

В результате многочисленных экспериментов к настоящему времени сложилось впечатление, что решение, жить или умереть клетке, принимается на уровне семьи Bcl-2 на основании относительного преобладания активных супрессоров или промоторов апоптоза [7, 8] (рис. 3).

P53 белок и хронические лимфопролиферативные заболевания

Известно, что от 50 до 80 % солидных опухолей содержат мутации гена *TP53*. Исследования, проведенные ранее, показали, что мутантный *TP53* определяется в 16% фолликулярных лимфом [9] и в 13% первичных В-крупноклеточных лимфом средостения [10]. По данным Gaidano et al., мутации *TP53* были выявлены в опухолевой ткани MALT-лимфом высокой степени злокачественности [11]. В этих условиях именно врожденные полиморфизмы гена *TP53*, приводящие к нарушению функционирования соответствующего белка, могут обусловливать предрасположенность их носителей к развитию неходжкинских злокачественных лимфом.

Ниже приведены иллюстрации частоты мутационных событий и их распределение в гене *TP53* при В-клеточных лимфомах/лейкозах и В-клеточных НХЛ (рис. 4–7).

Ряд исследователей в своих работах указывают на влияние экспрессии белка p53 и мутационного статуса *TP53* на прогноз, ответ на проводимую терапию у больных с ЛПЗ. Отмечено повышение экспрессии p53 при Т- и NK-клеточных лимфомах с редко встречающимися мутациями гена [12]. С другой стороны, снижение экспрессии белка p53 и мутации гена *TP53* приводят к ухудшению ответа на терапию при кожных лимфомах [13]. Выяснено, что мутации в *TP53* являются спутниками озлокачествления MAL Т-лимфом [14], потеря экспрессии p53 и нарушения регуляции гена приводят к резистентности к лечению и ухудшению прогноза при лимфомах из клеток маргинальной зоны селезенки [15], лимфомах из клеток зоны мантии [16] и фолликулярных лимфомах [17].

Имеются данные, что уровень экспрессии p53 может отличаться в зависимости от степени злокачественности. В недавнем исследовании показано, что более высокий уровень экспрессии p53 имеют лимфомы высокой степени злокачественности и соответственно более низкий — лимфомы низкой степени злокачественности [18].

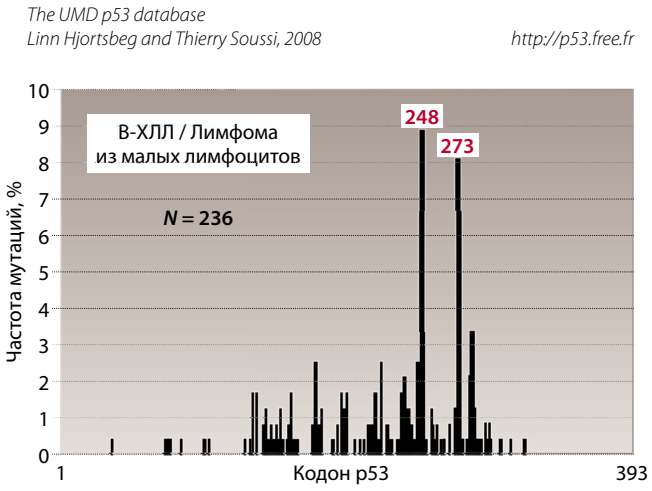


Рис. 4. *Мутационные события в гене p53 при В-клеточных лимфомах/лейкозах*

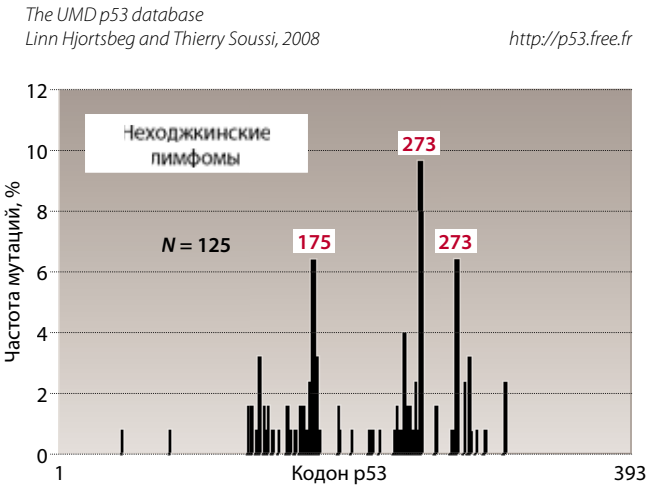


Рис. 6. *Мутационные события в гене p53 при В-клеточных НХЛ*

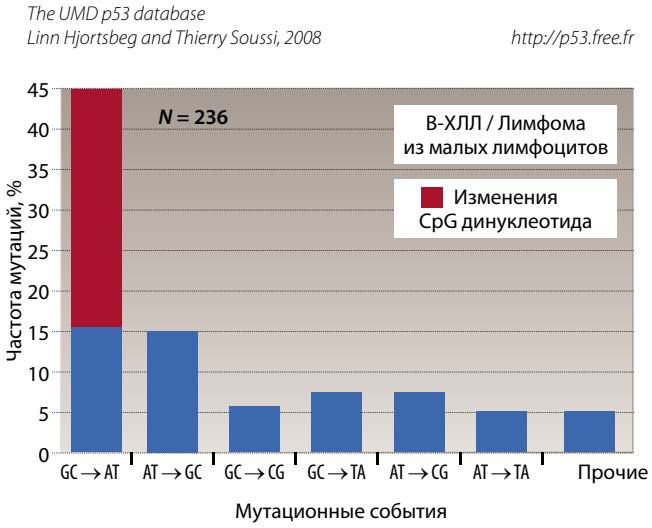


Рис. 5. *Распределение мутаций p53 при В-клеточных лимфомах/лейкозах*

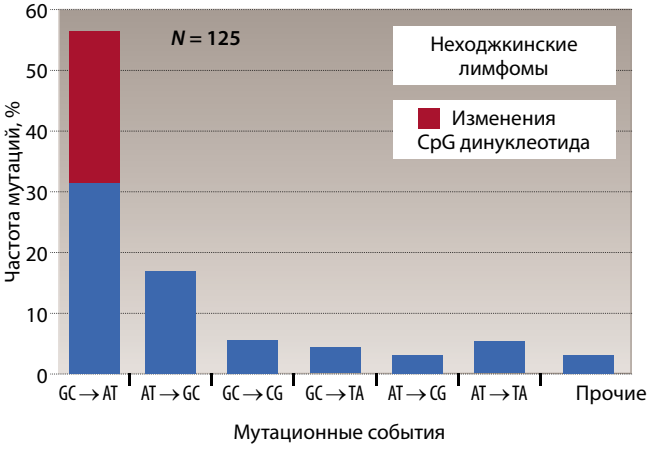


Рис. 7. *Распределение мутаций p53 при В-клеточных НХЛ*

Что касается хронического лимфолейкоза, то экспрессия p53 в подавляющем большинстве случаев для этого заболевания нехарактерна. Случаи заболевания с гиперэкспрессией p53 характеризуются более агрессивным течением, как правило, плохим ответом на терапию, в том числе и пуриновыми аналогами, что происходит либо ввиду мутаций *TP53* с развитием множественной лекарственной устойчивости, либо со снижением апоптотической гибели клеток при воздействии пуриновых аналогов [19].

Практический интерес представляют потенциальные возможности использования измененной экспрессии p53 при различных ЛПЗ у человека как в диагностическом, так и в терапевтическом аспектах. Очевидно, что само по себе изменение экспрессии p53 не имеет самостоятельного значения без изучения полиморфизма ассоциированных с ним генов-эффекторов, каковыми являются молекулы PUMA, p21, MDM2.

Белок PUMA: активный участник лимфопролиферации

Доминирующий взгляд на ключевую роль p53 в развитии феномена программированной клеточной смерти (апоптоз) не подвергается сомнению. Однако неуклонно растет количество фактов, указывающих на то, что p53 обладает и другими функциями, сдерживающими процессы пролиферации и злокачественного роста. То, что апоптоз не является единственным феноменом в арсенале p53, стало очевидным с открытием белка PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis). PUMA — единственный BH3 (Bcl-2 homology domain 3) протеин, инициирующий митохондриальный путь апоптоза. Изучение мышей, не имеющих этого протеина, показало, что PUMA необходим для развития апоптоза в ответ на активацию p53-молекулы во многих тканях [20]. Т ем не менее нулевые по белку PUMA мыши необязательно разви-

вают злокачественные опухоли [21], хотя ряд исследований показал, что потеря PUMA способству ет канцерогенезу, определяемому онкогеном *MYC* [22]. Становится ясным, что p53 может сохранять антипролиферативные свойства даже в отсутствие апоптотического ответа.

В 2 исследованиях, результаты которых опубликованы в журнале Genes & Development [23, 24], изучали белок PUMA в условиях повреждения ДНК. Известно, что p53 не может инициировать процесс апоптоза в отсутствие белка PUMA. Принимая во внимание этот факт, исследователи создали линию нокаутированных по гену *PUMA* мышей и подвергли их воздействию радиации, вызывающей повреждение молекул ДНК. Ученые ожидали увидеть быстрое развитие опухолей и гибель животных, но вместо этого мыши жили дольше, чем животные из контрольной группы.

Другая исследовательская группа, под руководством Андреаса Штрассера (Andreas Strasser), наблюдала этот же феномен: отсутствие белка PUMA нисколько не вредило мышам, подвергшимся воздействию радиации и, напротив, увеличивало продолжительность их жизни в сравнении с нормальными животными, подвергавшимися облучению [24]. Исследования проводились на конкретном типе опухоли, а именно на тимической лимфоме, которая была вызвана многократным воздействием радиации на экспериментальных животных в течение месяца.

В то же время другими авторами на модели лимфомы Беркитта у мышей было отчетливо показано, что делеция гена *PUMA* приводит к ускорению лимфомогенеза и 75% клеток опухолевой линии избавляется от его экспрессии [22]. Более того, в 40 % первичных опухолей вообще не выявлено какого-либо уровня экспрессии PUMA [22].

Анализ литературных данных, посвященных исследованию экспрессии PUMA и его связи с белком p53 при ЛПЗ, позволяет предполагать, что наибольшее значение нарушения в белке PUMA, со снижением его экспрессии, имеют при В-клеточных ЛПЗ [21, 24].

Исследование экспрессии PUMA при хроническом лимфолейкозе в сопоставлении с уже достаточно известными прогностическими факторами, такими как стадия заболевания, экспрессия CD38, ZAP-70, уровни ЛДГ и β2-микроглобулина, а также неблагоприятными хромосомными аномалиями, отчетливо демонстриру ет снижение уровня экспрессии PUMA при всех факторах плохого прогноза [25]. Голландские исследователи продемонстрировали, что терапия пуриновыми аналогами вызывает индукцию проапоптотических генов *Bax* и *PUMA*, опосредованную p53, с более выраженным эффектом в случае наличия мутаций в генах *IgVH* [26].

Следует отметить, что вышеприведенные исследования проводились на мышиных моделях В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности, а указаний на исследования в группе более распространенных В-зрелоклеточных лимфом с использованием опухолевого материала лимфомной ткани человека нам не встретилось. Т акже вызывают ряд вопросов противоречия, связанные с ролью нарушений в активности гена *PUMA*, а именно отсутствие однозначного эффекторного ответа при его инактивации или снижении экспрессии. Тем более актуальной становится попытка комплексной оценки системы медиаторов и эффекторов системы p53 при ЛПЗ.

Белок p21 и p53: диалектика взаимодействия и особенности экспрессии при лимфопролиферативных заболеваниях

P53 содержит также другие возможности антипролиферативного эффекта. Одной из них является способность останавливать клеточную пролиферацию и рост, эффективно останавливать клеточный цикл, активируя транскрипцию ингибитора циклин-зависимой киназы p21, хотя несколько других генов-мишеней p53-молекулы (*14-3-3 sigma* и *GADD45*) могут вносить свой вклад в этот феномен [27]. При этом надо отметить, что p21 чрезвычайно чувствителен к самым низким концентрациям p53 и ведет к немедленной остановке клеточного цикла в фазе G1 при малейшем повреждении клетки, позволяя ей пережить неблагоприятный период. Однако в случае канцерогенеза (или нецелесообразной пролиферации) подобного рода реакция позволит сохраниться клеткам со злокачественным потенциалом. Серия интереснейших исследований высветила важность феномена старения в ингибировании злокачественной пролиферации и идентифицировала при этом ключевую роль p53-молекулы в биологическом ответе подобного рода. В нескольких работах было показано, что ключевую роль в развитии феномена старения играет повреждение ДНК через активацию онкогенов или в ответ на дисфункцию теломер, что повышает активность p53 протеина [28, 29].

Более того, старение остается ключевым феноменом в ответ на активацию p53 при злокачественной пролиферации в далеко зашедших стадиях. В моделях на мышах реактивация p53 белка привела к существенной регрессии различных типов злокачественных опухолей, доказывая высокий терапевтический потенциал такого подхода к лечению [30–32]. Что интересно, при саркомах и карциномах в ответ на повышение активности p53-молекулы развивается прежде всего феномен старения, а не апоптоза. Хотя исследования на культурах тканей свидетельствуют о том, что развитие феномена старения является скорее цитостатическим ответом, стабилизирующим заболевание, но не вызывающим его обратное развитие, исследования *in vivo* отчетливо показали возможность полной эрадикации злокачественного клона при сопутствующей стимуляции иммунной системы [32]. Одним из ключевых регуляторов p53 опосредованного старения является белок p21 [33]. Супрессия злокачественной пролиферации мутантной формой p53 R172P, дефект-

ной по апоптозу, сопровождается, прежде всего, активацией p21-молекулы и феномена старения [34, 35]. Более того, введение мутантной формы p53-линии мышей нулевой по наличию p21 белка, приводило к полной потере способности к остановке клеточного цикла и ускоряло рост злокачественных опухолей [36]. Все эти факты убедительно свидетельствуют, что p53 опосредованная активация p21-молекулы является важным звеном в угнетении злокачественной пролиферации через феномен старения.

Складывается впечатление, что p53-зависимые феномен апоптоза и феномен старения являются своего рода страховкой друг для друга и развитие того или иного определяется конкретным типом клеток и состоянием окружающей среды (тканевым контекстом).

На модели тимической лимфомы было показано, что снижение экспрессии p21 у мышей нока утных или гаплодефицитных по *TP53* сдерживает темпы прогрессирования опухоли и приводит к увеличению средней продолжительности жизни [37]. Более того, выяснено, что снижение экспрессии p21 у облученных мышей снижает вероятность возникновения лимфомы, а уровень апоптоза у p21 дефицитных мышей выше, чем у мышей с достаточной (профицитной) экспрессией p21.

Большое ретроспективное исследование, выполненное на гистологическом материале различного типа ЛПЗ, достаточно четко дает понять, что повышение экспрессии p21, напрямую коррелирующее в большинстве случаев с повышенной экспрессией p53, более характерно для анапластических вариантов лимфом, тогда как при CD30 негативных вариантах лимфопролиферации экспрессии этих партнеров не выявлено [38].

Исследователи из Китая на примере NK/T-клеточной лимфомы показали, что интенсивность экспрессии p21 прямо коррелирует с экспрессией p53 и зависит от стадии заболевания и степени его злокачественности. Чем более продвинута стадия заболевания и (или) имеется более злокачественный гистологический вариант болезни, тем интенсивнее будет экспрессия p21 и p53 [39].

Данную тенденцию можно проследить и по материалам, представленным корейскими коллегами. Анализ экспрессии p21 и p53 в группе лимфом желудка продемонстрировал активность p21 и p53 белков практически только у В-крупноклеточных лимфом, тогда как в группе В-зрелоклеточных MAL Т-лимфом экспрессия p53 единичная, а p21 вовсе отсутствует [40].

Обзор литературных данных роли p21 при ЛПЗ раскрывает как минимум одну сторону вопроса, а именно, экспрессия p21 в подавляющем большинстве случаев коррелирует с экспрессией p53 и характерна для быстро растущих и продвинутых вариантов пролиферации. Это может оказаться полезным для определения дополнительных прогностических характеристик заболевания, и заставляет задуматься о p21-молекуле как о потенциальной терапевтической мишени.

MDM2-молекула — негативный регулятор p53 белка

При нормальных условиях в клетке экспрессируются и белок p53, и белок MDM2. Функция белка MDM2 первоначально была у становлена у мышей, отсюда название MDM2 (mouse double minute chromosome amplified oncogene — онкоген, который был амплифицирован на хромосоме типа «double minute»).

N-концевой домен белка MDM2 связывается с N-концевым трансактивирующим доменом белка p53. Таким образом, белок MDM2 препятствует активирующему действию белка p53. Кроме того, комплекс MDM2:p53 является ингибитором транскрипции (вероятно, вследствие сохранения способности белка p53 к присоединению к ДНК). Опубликованы детальные обзоры о взаимодействии p53 с MDM2 [41–44].

Недавнее исследование, показавшее, что потеря p53 приводит к снижению ранней летальности у мышей с мутацией *MDM2* (отсутствует активность лигазы Е3), указывает на первичную роль MDM2 в деградации p53 [45]. Как было показано, MDM2 способен уменьшать ацетилирование белка p53, смещая остаток p300, ингибируя и разрушая белок PCAF [46, 47]. MDM2 также может рекрутировать гистоновые деацетилазы HDAC1 и KAP1, которые являются дополнительными инструментами, с помощью которых MDM2 репрессирует ацетилирование p53 или гистонов в местах связывания с p53. MDM2, экспрессиру емый из эндогенных локусов, ассоциируется с p53 в зоне *p21* промотора [48, 49]. Гиперэкспрессируемый эктопически MDM2 (MdmX) связывается с некоторыми другими целевыми промоторами p53, за исключением самого *MDM2* промотора [49].

Повышение в 2 раза уровня MDM2 в клетках линии H1299 в условиях тетрациклин-регулируемой экспрессии p53 сопровождается снижением уровня PIG3, но не влияет на экспрессию p21 и *Bax* [48]. В связи с наличием способности смещать деацетилазы или убиквинировать гистон H2B, а, возможно, и через другие механизмы MDM2, белок ассоцииру ется с p53-молекулой в зоне промоторов генов-мишеней, тем самым отрицательно влияя на трансактивацию p53 [50].

Белок MDM2 является ферментом группы Е3 системы убиквитин-зависимого протеолиза, причем MDM2 специфичен в отношении белка p53. Это означает , что белок MDM2 катализиру ет перенос активированного убиквитина с фермента группы Е2 на белок p53. Таким образом, белок MDM2 является Е3-лигазой. Маркированный убиквитином белок p53 является субстратом для 26S-протеасомы, которая осуществляет протеолиз молекул белка p53. В нестрессовых у словиях постоянно образуется комплекс MDM2:p53 и осуществляется протеолиз p53. Этим объясняется низкая концентрация p53 в клетке в отсутствие стресса. Центральная роль белка MDM2 в деградации белка p53 подтверждается и тем фактом, что добавление к клеткам моноклональных

антител к комплексу MDM2:p53 приводит к значительному увеличению концентрации белка p53. Из приведенных рассуждений становится понятным, что повышенная экспрессия белка MDM2 является онкогенным фактором, а сам белок следует отнести к протоонкогенам.

Анализ 87 случаев НХЛ и в более специализированной группе В-клеточных MALT-лимфом на предмет коэкспрессии p53, p21 и MDM2 [51, 52] выявил, что преимущество в коэкспрессии одновременно 3 протеинов имели лимфомы более высокой степени злокачественности. Авторы указывают, что в отсутствие экспрессии p53 не стоит ждать экспрессии p21 и MDM2, а одновременная экспрессия всех 3 белков указывает на наличие, скорее всего, дикого (немутантного) p53. Вместе с тем дискордантная экспрессия p53 в отсутствие экспрессии p21 и MDM2 доказывает присутствие мутировавшего варианта p53 белка. В свою очередь, отсутствие экспрессии MDM2 при сохраненной экспрессии p53 и p21 не исключает как мутацию p53 с сохраненным (независимо) уровнем p21, так и само нарушение регуляции MDM2 при диком типе p53.

На основании ретроспективного анализа комплексного иммуногистохимического исследования гистологического материала 186 случаев фолликулярной лимфомы с использованием значительного количества антител, в частности, к MDM2, p21 белкам, а также клинических данных, было отмечено, что случаи с более высокой экспрессией MDM2 характеризовались менее длительной общей выживаемостью. Это позволило включить ряд иммуногистохимических критериев, в том числе уровень экспрессии MDM2, в международный прогностический индекс фолликулярной лимфомы [53].

Непосредственное участие MDM2 белка в лимфомогенезе было подтверждено в другом исследовании. На материале В-клеточных опухолей мышей показано, что увеличенная экспрессия MDM2 способствует пролиферации и уменьшает чувствительность к p53-обусловленному апоптозу, что связано с угнетением p53 и подавлением экспрессии p21. Отмечено также повышение уровня спонтанных генетических аномалий в клетках этих линий, что также способствовало В-клеточной трансформации *in vivo* [54].

Недавнее исследование на материале анапластической крупноклеточной лимфомы, характеризующейся в большинстве случаев наличием транслокации t(2;5)(p23;q35), которая кодирует, в свою очередь, продукцию NPM-ALK белка со свойствами киназы, показало, что вновь образованный белок обладает способностью инактивировать и/или уменьшать уровень дикого p53. В связи с этим опухолевая линия с данной хромосомной аномалией обладает сниженной способностью к апоптозу и, несмотря на наличие немутантного p53, — нормальной экспрессией MDM2. Более того, применение Nutlin-3a, связывающего MDM2, приводит к активации апоптоза в клетках опухоли [55].

Описано успешное применение новых терапевтических агентов при хроническом лимфолейкозе. Исходя из того, что в большинстве случаев хронического лимфолейкоза имеется гиперэкспрессия MDM2, препятствующая активации p53-опосредованного апоптоза в ответ на стандартную химиотерапию, Kensuke Kojima et al. предложили использовать малую молекулу Nutlin-3a, как антагонист MDM2-молекулы. Nutlin-3a вызывает как транскрипционно-зависимую, так и транскрипционно-независимую индукцию апоптотических механизмов, стимулируя, при сочетанном применении с флударабином, значительное повышение уровня p53 белка [56].

Вполне очевидно, что самостоятельной роли в патогенезе хронических ЛПЗ MDM2 не играет. Несмотря на достаточно хорошо описанные общие механизмы взаимодействия в системе p53-MDM2, в доступных литературных источниках пока недостаточно данных, чтобы можно было сделать окончательный вывод о роли подобного тандема в патогенезе лимфопролиферации.

Терапевтический потенциал

Несмотря на то что многие аспекты «жизни» молекулы p53 еще не изучены, представляется вполне реальным использование регуляторных механизмов p53 в лечении многих заболеваний. Поскольку функция p53 нарушена при многих пролиферативных процессах, особенно злокачественного характера, независимо от морфологического типа ткани и локализации, кажется логичным восстановление ингибиторных свойств белка p53. Эта концепция получила наглядное подтверждение в экспериментальных моделях на животных, в которых реактивация нормального белка p53 сопровождалась выраженной регрессией опухолевой массы [30–32].

Каким же образом молекула p53 может быть реактивирована? Одно из направлений, которое оказалось успешным, это использование генной терапии для введения p53 в опухоль с использованием в качестве вектора аденовируса [57]. Существенно расширившееся понимание механизмов регуляции функций молекулы p53 привело к созданию препаратов (малых молекул), которые способны стабилизировать и активировать p53 протеин. Недавно были идентифицированы клеточные ингибиторы сиртуина, белка, который может ограничивать диапазон активности p53 [58].

Надо отметить, что создание подобного рода лекарств вызвало большую дискуссию об их потенциальной токсичности, обусловленной системной активацией молекулы p53 в здоровых тканях. В экспериментальных моделях на животных отсутствие MDM2 в здоровых тканях, экспрессирующих p53, сопровождалось множеством побочных эффектов [59]. Авторы высказывают мнение, что, может быть, лекарства,

ингибирующие активность MDM2, будут менее эффективны, но с лучшей переносимостью в сравнении с препаратами, удаляющими этот ген. Более того, поскольку ингибиторы активности не являются генотоксичными, они смогут избежать побочных эффектов, характерных для традиционной химиотерапии, также активирующей функции молекулы p53 в клетках. Интересно, что в некоторых исследованиях было показано, что лечение ингибиторами MDM2 было эффективней, если в клетке были запущены сигнальные механизмы, возникающие при повреждении ДНК. Последнее обстоятельство отличает здоровую клетку от злокачественной [60]. Если использование активаторов p53-молекулы кажется перспективным при злокачественной пролиферации, следует оценить возможный побочный эффект ускоренного старения — следствие длительной системной терапии подобного рода препаратами. Восстановление функций мутантного p53 в злокачественных опухолях — очень сложная задача, хотя описаны малые молекулы, способные реактивировать нормальные функции молекулы p53 [61]. Такого рода подход является наиболее трудным, но он обещает избирательное воздействие на злокачественные клетки с мутантной формой p53.

Одна из перспективных областей — это применение малых молекул, способных угнетать активность негативного регулятора p53-молекулы, — MDM2 белка. Опубликовано достаточно большое количество работ по использованию таких малых молекул на моделях ЛПЗ у животных, и в частности мышей [62–68]. Наиболее исследованы возможности одной из первых, использованной в терапевтических целях, малой молекулы Nutlin-3a. Изучены возможности нутлина в активации апоптоза при лимфомах из клеток зоны мантии как в монотерапии [62], так и в комбинации с другими проапоптотическими препаратами, такими как бортезомиб. При этом терапевтический ответ наблюдался даже в линии клеток, резистентных к монотерапии бортезомибом [63, 64]. Описаны терапевтическая активность Nutlin-3a на модели анапластической крупноклеточной лимфомы [65], у спешное его применение в комбинации с другими цитостатическими препаратами при хроническом В-клеточном лимфолейкозе [66].

Проходят доклинические испытания и другие малые молекулы, способные специфически угнетать активность MDM2, отличаясь в большинстве своем аффинностью действия, но имеющие сходные механизмы и сопоставимую эффективность *in vitro* и *in vivo*. Подобные исследования, например, проведены на клеточной линии фолликулярной лимфомы с использованием малых молекул MI-319, MI-219 в сопоставлении с Nutlin-3a [67]. Описано эффективное применение малой молекулы MI-63, нарушающей взаимодействие между MDM2 (HDM2) и p53, в комбинации с ингибиторами протеосом (бортезомибом) на клеточной линии лимфомы из клеток мантийной зоны и множественной миеломе [68].

Концепция реактивации нормальных функций p53 белка в озлокачествленных клетках подтверждается экспериментальными исследованиями и рядом исследований у человека, показавшими связь между мутациями p53-молекулы и плохим прогнозом [69]. Однако клеточный ответ на стимуляцию p53 может широко варьировать от смерти клетки до выживания, что трудно предсказать. В самом деле, ингибирование функции p53 белка при раке молочной железы защищает раковые клетки от некоторых видов химиотерапии и, таким образом, ассоциируется с плохим ответом на лечение [70]. Возможно, подобного рода эффект можно использовать как повод к изменению тактики терапевтического подхода. Отсутствие ответа опухолевой клетки на манипуляции с p53-молекулой предполагает сохранение чувствительности к химиотерапевтическим препаратам, воздействующим на S-фазу или G2/M-фазу клеточного цикла. Эти лекарственные препараты будут менее токсичными для нормальной клетки [71]. Продолжением этой идеи является использование препаратов, активирующих p53 с целью защиты здоровых клеток во время химиотерапии [72, 73].

Что интересно, идея хемопротекции нормальных клеток предлагает в том числе использовать лекарственные препараты, ингибирующие p53-молекулу . Понятно, что большинство токсических эффектов во время химиотерапии генотоксическими препаратами обусловлено активацией p53-молекулы и p53-индуцированной смертью радиочувствительных клеток гематопоэтической системы, эпителия кишечника и других тканей. В этом случае супрессия функций p53-молекулы в здоровых клетках поможет защитить их от смерти и повысить толерантность больного к более высоким дозам химиопрепаратов и лучевой нагрузки [74, 75].

Что касается использования белка PUMA как мишени для потенциальных терапевтических воздействий, то препарат ABT-263, ингибирующий белок PUMA, недавно успешно прошел I фазу клинических испытаний [24].

Выводы

Таким образом, ЛПЗ являются широко распространенными заболеваниями с тенденцией к постоянному росту. Они характеризуются значительной разнородностью благодаря особенностям созревания клеток иммунной системы, что в большинстве случаев ведет к фактической неизлечимости патологического процесса, несмотря на разработанные в последнее время новые терапевтические агенты. Эти особенности диктуют необходимость разработки новых и коррекции существующих подходов в терапии ЛПЗ.

В основе патогенеза ЛПЗ лежат изменения на уровне человеческого генома. До настоящего времени окончательно неясна роль системы белка p53 в патогенезе онкологических заболеваний в целом и ЛПЗ в частно-

сти, ввиду необычайно широкого спектра эффекторных ответов p53. Изучение роли программируемой клеточной гибели, взаимоотношений p53-молекулы с генами-регуляторами и эффекторами в процессе развития ЛПЗ может открыть новые перспективы не только в диагностике, но и в лечении этого вида патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. СПб.: «Наука», 1996.
2. Hansen R., Oren M. P53 from inductive signal to cellular effect. Curr Opin Genet 1997;7:46–51.
3. Bakhshi A.J., Jensen P., Goldman P. et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell 1985;41:889–906.
4. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J. et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. Science 1985;229:1390–3.
5. Deary M., Smith S., Sclar J. Cloning and structional analysis of cDNAs Bcl-2 and a hybrid Bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. Cell 1986;47:19–23.
6. Kelekar T., Thompson C. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. Trends Cell Biol 1998;8:324–30.
7. Puthalakath H., Huang D., O'Reily L. et al. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell 1999;3:287–96.
8. Oltvai Z., Korsmeyer S. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell 1994;79:189–92.
9. Bellido M., Capello D., Altes A. et al. Bcl-6 p53 mutations in lymphomas carrying the Bcl-2/Jh rearrangement. Haematologica 2002;87(9):908–17.
10. Scorpa A., Moore P.S., Rigaurd G. et al. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. Br J Haematol 1999;107(1):106–13.
11. Gaidano G., Volpe G., Pastore C. et al. Detection of BCL-6 rearrangements and p53 mutations in MALT-lymphomas. Am J Hematol 1997;56(4):206–13.
12. Petit B., Leroy K., Kanavaros P. et al. Expression of p53 protein in T- and natural killer-cell lymphomas is associated with some clinicopathologic entities but rarely related to p53 mutations. Hum Pathol 2001 Feb;32(2):196–204.
13. Kapur S., Tiemann M., Menke M.A. et al. The role of p53 and anaplastic lymphoma kinase genes in the progression of cutaneous CD30(+) lymphoproliferative diseases. Indian J Med Res 2005 Jan;121(1):46–54.
14. Поддубная И.В. Лимфосаркома желудочно-кишечного тракта (клиника, диагностика, лечение). Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1985.
15. Gruszka-Westwood A.M., Hamoudi R.A., Matutes E. et al. P53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. Blood 2001 Jun 1;97(11):3552–8.
16. Greiner T.C., Moynihan M.J., Chan W.C. et al. P53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. Blood 1996 May 15;87(10):4302–10.
17. Sander C.A., Yano T., Clark H.M. et al. P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. Blood 1993 Oct 1; 82(7):1994–2004.
18. Villuendas R., Piris M.A., Orradre J.L. et al. P53 protein expression in lymphomas and reactive lymphoid tissue. J Pathol 1992 Mar;166(3):235–41.
19. Cordone I., Masi S., Mauro F.R. et al. P53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. Blood 1998 Jun 1;91(11):4342–9.
20. Yu J., Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. Cancer Cell 2003;4:248–9.
21. Michalak E.M., Villunger A., Adams J.M. et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. Cell Death Differ 2008;15:1019–29.
22. Garrison S.P., Jeffers J.R., Yang C. et al. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B cell lymphomagenesis. Mol Cell Biol 2008;28:5391–402.
23. Labi V., Erlacher M., Krumschnabel G. et al. Apoptosis of leukocytes triggered by acute DNA damage promotes lymphoma formation. Genes Dev 2010 August 1; 24:1602–7; doi:10.1101/gad.1940210.
24. Michalak E.M., Vandenberg C.J., Delbridge A.R., Wu L., Scott C.L., Adams J.M., Strasser A. Apoptosis-promoted tumorigenesis: gamma-irradiation-induced thymic lymphomagenesis requires Puma-driven leukocyte death. Genes Dev 2010 August 1;24:1608–13; doi:10.1101/gad.1940110.
25. Zhu H.J., Xu W., Cao X. et al. Detection of puma mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR in chronic lymphocytic leukemia and its clinical significance. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2010 Aug;18(4):843–8.
26. Mackus W.J., Kater A.P., Grummels A. et al. Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. Leukemia 2005 Mar;19(3):427–34.
27. El-Deiry W.S. Regulation of p53 downstream genes. Semin Cancer Biol 1998;8:345–57.
28. Deng Y., Chan S.S., Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. Nat Rev Cancer 2008;8:450–8.
29. Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., Barteck J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. Science 2008;319:1352–5.
30. Martins C.P., Brown-Swigart L., Evan G.I. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. Cell 2006;127:1323–34.
31. Ventura A., Xu G., Wang H. et al. Expressions of p53 and p21 in nasal NK/T-cell lymphoma and their relationship with the proliferation and apoptosis of cells. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2009 Jan;23(2):73–6.
32. Xue W., Zender L., Miething C. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature 2007;445:656–60.
33. Brown J.P., Wei W., Sedivy J.M. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science 1997;277:831–4.
34. Cosme-Blanco W., Shen M.F., Lazar A.J.F. et al. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigeesis *in vivo* by initiating p53-dependent cellular senescence. EMBO Rep 2007;8:497–503.
35. Van Nguyen T., Puebla-Osorio N., Pang H. et al. DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. J Exp Med 2007;204:1453–61.
36. Barboza J.A., Liu G., El-Naggar A.K. et al. p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:19842–7.
37. De la Cueva E., García-Cao I., Herranz M. et al. Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. Oncogene 2006 Jul 6; 25(29):4128–32. Epub 2006 Feb 6.
38. Chilosi M., Doglioni C., Magalini A. et al. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. Blood 1996 Nov 15; 88(10):4012–20.
39. Xu G., Wang H., He G. et al. Expressions of p53 and p21 in nasal NK/T-cell

lymphoma and their relationship with the proliferation and apoptosis of cells. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2009 Jan;23(2):73–6.
40. Go J.H., Yang W.I. Expressions of p53 and p21 in primary gastric lymphomas. J Korean Med Sci 2001 Dec;16(6):731–5.
41. Marine J.C., Francoz S., Maetens M. et al. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of MDM2 and MDM4. Cell Death Differ 2006;13:927–34.
42. Marine J.C., Dyer M.A., Jochemsen A.G. MDMX: from bench to bedside. J Cell Sci 2007;120:371–8.
43. Poyurovsky M.V., Prives C. Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. Genes Dev 2006;20:125–31.
44. Toledo F.G., Wahl M. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. Nat Rev Cancer 2006;6:909–23.
45. Itahana K., Mao H., Jin A. et al. Targeted inactivation of MDM2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. Cancer Cell 2007;12:355–66.
46. Ito A., Lai C.H., Zhao X. et al. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. EMBO J 2001;20:1331–40.
47. Teufel D.P., Freund S.M., Bycroft M. et al. Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:7009–14.
48. Ohkubo S., Tanaka T., Taya Y. et al. Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53-dependent transcription. J Biol Chem 2006;281:16943–50.
49. Tang Y., Zhao W., Chen Y., et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. Cell 2008;133:612–26.
50. Minsky N., Oren M. The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. Mol Cell 2004;16:631–9.
51. Tzardi M., Kouvidou Ch., Panayiotides I. et al. p53 protein expression in non-Hodgkin's lymphoma. Comparative study with the wild type p53 induced proteins MDM2 and p21/waf1. Clin Mol Pathol 1996 Oct;49(5):278–82.
52. Stefanaki K., Tzardi M., Kouvidou C. et al. Expression of p53, p21, MDM2, Rb, Bax and Ki67 proteins in lymphomas of the mucosa-associated lymphoid (MALT) tissue. Anticancer Res 1998 Jul–Aug; 18(4A): 2403–8.
53. Camacho F.I., Bellas C., Corbacho C. et al. Improved demonstration of immunohistochemical prognostic markers for survival in follicular lymphoma cells. Mod Pathol 2011 May;24(5):698–707. Epub 2011 Jan 14.
54. Wang P., Lushnikova T., Odvody J. et al. Elevated MDM2 expression induces chromosomal instability and confers a survival and growth advantage to B cells. Oncogene 2008 Mar 6;27(11):1590–8.
55. Cui Y.X., Kerby A., McDuff F.K. et al. NPM-ALK inhibits the p53 tumor suppressor pathway in an MDM2 and JNK-dependent manner. Blood 2009 May 21;113(21):5217–27.
56. Kojima K., Konopleva M., McQueen T. et al. MDM2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2006 August 1; 108(3):993–1000.
57. Senzer N., Nemunaitis J. A review of contusugene ladenovec (Advexin) p53 therapy. Curr Opin Mol Ther 2009; 11:54–61.
58. Lain S., Hollick J.J., Campbell J. et al. Discovery, *in vivo* activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. Cancer Cell 2008;13:454–63.
59. Ringshausen I., O'Shea C.C., Finch A.J. et al. MDM2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity *in vivo*. Cancer Cell 2006;10:501–14.
60. Brummelkamp T.R., Fabius A.W., Mullenders J. et al. An shRNA barcode screen provides insight into cancer cell vulnerability to MDM2 inhibitors. Nat Chem Biol 2006;2:202–6.
61. Selivanova G., Wiman K.G. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. Oncogene 2007;26:2243–54.
62. Drakos E., Atsaves V., Li J. et al. Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma. Leukemia 2009 Apr;23(4):784–90.
63. Jin L., Tabe Y., Kojima K. et al. MDM2 antagonist Nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma. Cancer Lett 2010 Dec 28;299(2):161–70.
64. Tabe Y., Sebasigari D., Jin L. et al. MDM2 antagonist nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res 2009 Feb 1;15(3):933–42.
65. Drakos E., Atsaves V., Schlette E. et al. The therapeutic potential of p53 reactivation by nutlin-3a in ALK+ anaplastic large cell lymphoma with wild-type or mutated p53. Leukemia 2009 Dec;23(12):2290–9.
66. Coll-Mulet L., Iglesias-Serret D., Santidrián A.F. et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 2006 May 15; 107(10):4109–14.
67. Mohammad R.M., Wu J., Azmi A.S. et al. An MDM2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals. Mol Cancer 2009 Dec 3;8:115.
68. Jones R.J., Chen Q., Voorhees P.M. et al. Inhibition of the p53 E3 ligase HDM-2 induces apoptosis and DNA damage — independent p53 phosphorylation in mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res 2008 Sep 1;14(17):5416–25.
69. Petitjean A., Achatz M.I., Borresen-Dale A.L. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 2007;26:2157–65.
70. Bertheau P., Espie M., Turpin E. et al. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. Pathobiology 2008; 75:132–9.
71. Sur S., Pagliarini R., Bunz F. et al. A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:3964–9.
72. Carvajal D., Tovar C., Yang H. et al. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. Cancer Res 2005;65:1918–24.
73. Kranz D., Dobbelstein M. Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phase-specific chemotherapy. Cancer Res 2006;66:10274–80.
74. Gudkov A.V., Komarova E.A. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. Biochem Biophys Res Commun 2005;331:726–36.
75. Strom E., Sathe S., Komarov P.G. et al. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. Nat Chem Biol 2006;2:474–9.

Оценка возможности использования центрифугирования для ускоренного проведения анализа с использованием иммунологических биочипов для исследования клеток крови

А.В. Шишкин[1], Н.Г. Овчинина[1], С.С. Бессмельцев[2]
[1]ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия;
[2]ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

***Контакты:** Александр Валентинович Шишкин Shishkin_lab@mail.ru*

При исследовании клеток с помощью иммунологических биочипов (микроматриц) достаточно длительным является этап инкубации с клеточной суспензией. Он занимает от 20 до 60 мин, если осаждение клеток на поверхность биочипа происходит за счет силы тяжести. Возможно уменьшение длительности этого этапа с помощью центрифугирования. В данной работе рассматривается влияние центрифугирования на результаты анализа. Оцениваются изменения морфологических характеристик клеток при их осаждении с различным ускорением. Также показана перспективность использования центрифугирования в тех случаях, когда необходимо добиться высокой плотности связывания в тестовых участках биочипа клеток, присутствующих в исследуемом образце в малых концентрациях.

***Ключевые слова:** иммунологический биочип, определение поверхностных антигенов клеток, осаждение клеток*

Assessment of centrifugation using for accelerated immunological microarray analysis for blood cells investigation

A.V. Shishkin[1], N.G. Ovchinina[1], S.S. Bessmeltsev[2]
[1]Izhevsk State Medical Academy;
[2]Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg

Phase of incubation microarray with cell suspension is prolonged when cells are investigated. It takes from 20 to 60 min if cell sedimentation on the surface of microarray is the result of gravity. Decrease of this stage duration is possible due to centrifugation. In th is article influence of centrifugation on results of analysis is considered. Changes of morphological description of cells are estimated when they a re precipitated with different acceleration. Also availability of centrifugation using when it is necessary to obtain the high density of cell binding in test regions of microarray if cells concentration in sample is small is demonstrated.

***Key words:** immunological microarray, surface cell antigens detection, cell sedimentation*

Перспективным направлением иммунодиагностики является исследование клеток с использованием иммунологических биочипов, содержащих иммобилизованные антитела, специфичные к поверхностным антигенам клеток [1–9]. Такой анализ позволяет одновременно определить множество антигенов на разных клетках при очень низком расходе антител. Иммунологический биочип данного класса, как правило, представляет собой твердую подложку, в строго определенных участках («пятнах») которой иммобилизованы молекулы антител [1–9]. Проведение анализа включает в себя инкубацию биочипа с суспензией исследуемых клеток. Клетки оседают на поверхность биочипа и прочно связываются в области тестовых участков при наличии у них соответствующих антигенов, а несвязавшиеся клетки устраняют при его последующей отмывке. Если осаждение клеток осуществлялось без перемешивания, плотность заполнения тестовых участков биочипа оказывается прямо пропорциональна содержанию клеток, имеющих соответствующие антигены [7, 8]. Это позволяет осуществлять его качественную, полуколичественную или количественную оценку. Кроме того, ранее была показана возможность выполнения окрашивания и морфологического исследования связанных клеток при использовании биочипов, изготовленных на прозрачных химически стойких подложках [7–9].

В процессе проведения анализа осаждение клеток на поверхность биочипа происходит под действием силы тяжести. Данный этап обычно занимает от 20 до 60 мин. Поэтому представляется актуальным сокращение времени проведения анализа за счет ускоренного осаждения клеток. Некоторые иммунологические субпопуляции клеток присутствуют в исследуемом образце в небольших концентрациях и заполняют соответствующие тестовые участки биочипа с низкой плотностью. Вместе с тем данные клетки могут представлять для исследователя значительный интерес. Поэтому в ряде случаев может потребоваться достижение более высокой плотности их связывания. В одной из предыдущих работ [7] была показана возможность подобного концентрирования. Его принцип заключался в том, что после осаждения клеток осуществляли смывание несвязавшихся клеток, а затем вновь осаждали клетки на поверх-

ность биочипа. При этом анализ выполняли с использованием инкубационно-отмывочной кюветы или в проточной камере. Недостатком данного подхода являлось значительное увеличение продолжительности анализа. Особенно длительными были этапы, связанные с осаждением клеток. В связи с этим представляется перспективной идея использования центрифугирования для их более быстрого выполнения.

Цель работы — оценка влияния на результаты анализа ускоренного осаждения клеток с использованием центрифугирования, а также оценка возможности его применения в процессе концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа.

Материалы и методы

Устройство биочипов и их изготовление. Иммунологический биочип представлял собой прозрачную пластиковую подложку, на которой в строго определенных тестовых участках (пятнах) были иммобилизованы мышиные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD3, CD4, CD16, CD19, CD20, CD41, CD44, CD45, CD56. Такая панель антител позволяла определять в исследуемом образце содержание Т-, В-, NK-лимфоцитов, общее содержание лейкоцитов, относящихся к различным субпопуляциям, а также наличие тромбоцитов. Тестовые участки были отделены друг от друга фоновыми участками подложки, не содержащими иммобилизованных антител.

При изготовлении биочипов капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложки в заранее отмеченные участки. Далее подложки помещали в камеру со 100 % влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего высушивали на воздухе и замораживали при – 26 °С в герметичных контейнерах. При таком хранении биочипы не теряли своих свойств по меньшей мере в течение 12 мес.

Приспособление для ускоренного осаждения клеток на поверхность биочипа. Приспособление (рис. 1*а, б*) имеет корпус, состоящий из разъемных секций, и дно (изготовленное из прозрачного материала), к которому герметично крепится биочип. Приспособление, которое в собранном виде представляет собой емкость, крепится на роторе центрифуги ОПН-3 вместо стакана, предназначенного для размещения пробирки (рис. 1*в*). При этом ротор центрифуги должен быть тщательно уравновешен. Расстояние от центра ротора центрифуги до поверхности биочипа составляет 121 мм. Таким образом, относительное центробежное ускорение при частоте вращения ротора 1000 об/мин составляло 135,28 g, при 1500 об/мин — 304,38 g, при 1000 об/мин — 1217,5 g.

Приготовление суспензии исследуемых клеток. Лейкоциты выделялись из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности. Затем выделенные клетки от 1 до 4 раз отмывали 0,9% раствором NaCl для уменьшения содержания в исследуемом образце тромбоцитов и остатков разрушенных лейкоцитов. Для этого суспензию клеток переносили в пробирки, разводили изотоническим раствором до объема 10 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осажденные клетки ресуспензировали в 10 мл изотонического раствора, после чего вновь выполняли центрифугирование. Осадок клеток, полученный после последнего центрифугирования, ресуспензировали в растворе, содержащем 0,1% сухого молока, 20% (по объему) инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5 мМ ЭДТА в PBS. Концентрацию лейкоцитов и объем суспензии подбирали таким образом, чтобы осажденные клетки заполняли всю поверхность дна емкости одним слоем.

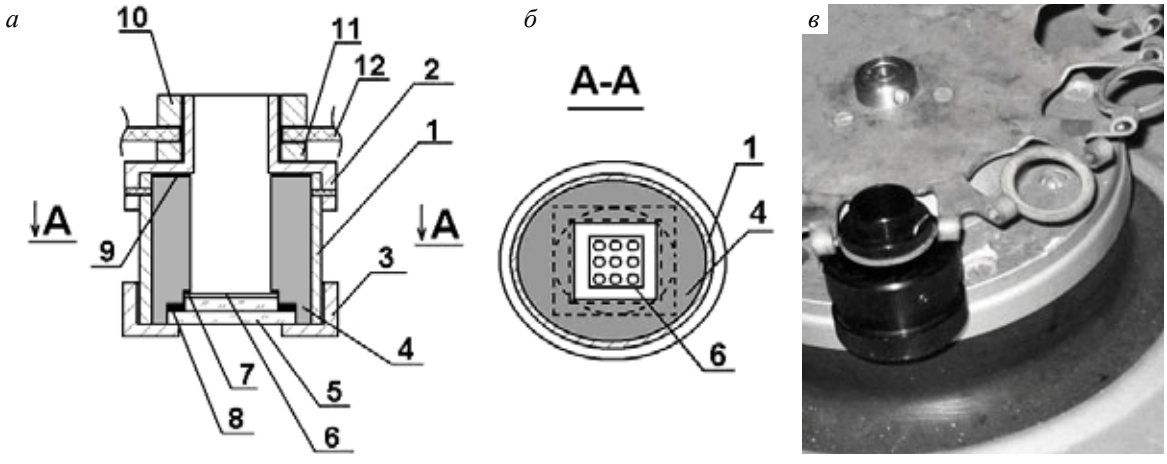


Рис. 1. *Приспособление для осаждения клеток на поверхность биочипа путем центрифугирования: а — вид сбоку в разрезе; б — вид сверху в разрезе; в — приспособление, закрепленное на роторе центрифуги ОПН-3; 1 — центральная секция корпуса; 2 — верхняя секция корпуса;3 — нижняя (прижимающая) съемная секция корпуса; 4 — съемная вставка; 5 — дно; 6 — биочип; 7, 8, 9 — герметизирующие эластичные прокладки; 10 — крепление; 11 — съемное кольцо; 12 — ротор центрифуги*

В тех случаях, когда выполнялось концентрирование клеток в области пятен биочипа, использовалась суспензия клеток с концентрацией в 2 раза выше.

Подготовка биочипа к проведению анализа. После разморозки биочип закрепляли в инкубационно-отмывочной кювете или приспособлении для ускоренного осаждения клеток, ополаскивали 1 % раствором BSA в буфере PBS, затем проводили 3-кратную отмывку 0,05% раствором детергента T ween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1 % раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч при перемешивании на шейкере. Затем вновь выполняли 3-кратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка при проведении анализа без использования центрифугирования. В незакрепленное в центрифуге приспособление с находящимся в нем биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 мин без какого-либо перемешивания. После завершения инкубации биочип несколько раз ополаскивали PBS для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами. Качество отмывки оценивали при помощи инвертированного микроскопа. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител.

Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка при проведении анализа с использованием центрифугирования. Приспособление для ускоренного осаждения клеток с биочипом закрепляли на роторе центрифуги ОПН-3 (рис. 1). В емкость приспособления вносили исследуемую клеточную суспензию. Осуществляли центрифугирование в течение 2 мин. Затем из приспособления сливали жидкость и выполняли отмывку биочипа от несвязавшихся клеток так же, как было описано выше.

Концентрирование клеток в области тестовых участков биочипа с использованием центрифугирования. В течение 1 мин осаждали клетки на поверхность биочипа, точно так же, как было описано выше. После этого центрифугу останавливали, встряхивали приспособление и вновь проводили осаждение клеток. Данные манипуляции выполняли несколько раз (см. далее). Затем осуществляли отмывку биочипа от несвязавшихся клеток.

Окрашивание связавшихся с биочипом клеток. Сразу же после завершения отмывки биочипа выполняли фиксацию клеток метанолом в течение 12 мин. Затем биочип высушивали на воздухе и окрашивали раствором азура и эозина. Далее биочип промывали проточной водой, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали.

Приготовление из биочипа долговременного препарата для микроскопического исследования. Биочип извлекали из приспособления и заключали его между тщательно обезжиренными предметным и покровным стеклами в композицию для приготовления долговременных микропрепаратов «Shandon-Mount» («Thermoelectron corporation», США). Микропрепарат помещали под пресс до затвердевания композиции.

Считывание и обработка результата. В каждом пятне биочипа определяли плотность связывания клеток — отношение количества клеток, связанных в определенном участке, к площади поверхности данного участка. Для этого на микрофотографии каждого пятна выбирали 3–4 участка, соответствующих областям размерами 100 × 100 мкм, и определяли в каждом из них количество связанных клеток. Полученные значения усредняли. Далее полученные результаты выражали в процентах. За 100 % принимали среднюю плотность связывания клеток в области пятен с антителами, специфичными к антигену CD45 (присутствующему на лейкоцитах практически всех типов). Исходя из этого выполняли пересчет в проценты значений плотности связывания клеток в области других пятен. Ранее было показано [7, 8], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания, выраженные в процентах значения плотности связывания клеток в тестовых участках биочипа оказываются весьма близки значениям фактического процентного содержания в образце клеток, имеющих соответствующие антигены.

Для апробации предлагаемого метода использовалась кровь здорового человека.

Результаты

При проведении анализа без центрифугирования лейкоциты не разрушались и хорошо сохраняли свои морфологические признаки, что наглядно показано на рис. 2.

Для контроля использовался метод проточной цитофлуориметрии. Как видно из рис. 3, результаты оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены, хорошо соответствовали данным проточной цитофлуориметрии.

Для оценки загрязненности поверхности биочипа осевшими тромбоцитами использовалось пятно с антителами, специфичными к антигену CD41. В тех экспериментах, где центрифугирование не применялось, количество тромбоцитов, осевших на поверхность биочипа, было весьма невелико (рис. 2*б*) и не могло оказывать заметного влияния на результат анализа.

Если центрифугирование выполнялось при 3000 об/мин, происходило значительное повреждение или даже полное разрушение большинства лейкоцитов (рис. 4). Наиболее сильно повреждались $CD16^+$-клетки (рис. 4*б*).

Между тем, если центрифугирование выполнялось при 1500 об/мин, то повреждалось меньшее число клеток, но полностью данная проблема не решалась. В тех случаях, когда выполнялось центрифугирование при 1000 об/мин, лимфоциты сколько-нибудь существен-

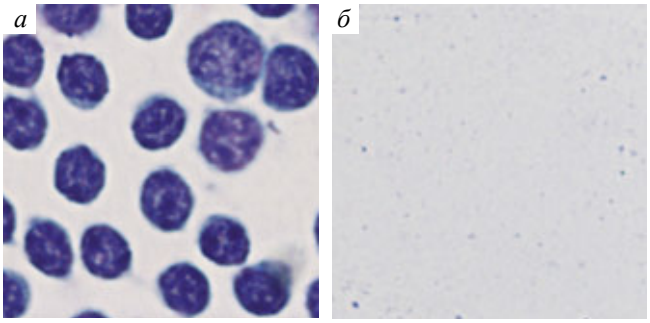


Рис. 2. *Микрофотографии клеток, связавшихся в области тестовых участков биочипа: а — лейкоциты различных типов, связавшиеся в области пятна с антителами анти-CD45; б — небольшое количество тромбоцитов (экранирующих менее 1 % площади поверхности), связавшихся в области пятна с антителами анти-CD41. Осаждение клеток выполнялось без использования центрифугирования. Окраска по Романовскому–Гимзе. Увеличение в 1000 раз*

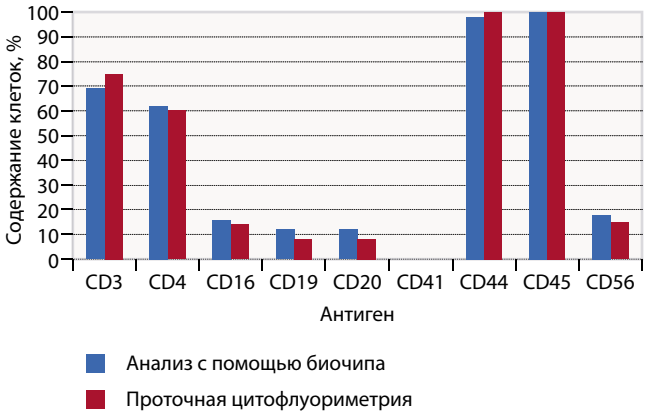


Рис. 3. *Результат оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены, с использованием биочипа и методом проточной цитофлуориметрии*

ных морфологических изменений не имели (рис. 5). Миелоидные клетки (присутствующие в пятнах с антителами, специфичными к антигенам CD44 и CD45) также не разрушались. По морфологическим признакам их можно было четко отличить от лимфоцитов.

В большинстве экспериментов на этапе пробоподготовки выделение лейкоцитов из крови осуществлялось в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (1077 г/л). В этих случаях на этапе осаждения клеток на поверхность биочипа пришлось столкнуться со следующей проблемой. При использовании центрифугирования на поверхность биочипа в значительном количестве осаждались тромбоциты и фрагменты клеток, разрушившихся на предшествующих этапах анализа. Они были лишены цитоплазмы и ядра, но сохраняли антигены, позволяющие им связываться в области тех или иных участков биочипа с иммобилизованными антителами. На рис. 5 видно, что лейкоциты не разрушились в процессе центрифугирования при 1000 об/мин.

Количество осажденных тромбоцитов и фрагментов разрушенных клеток было особенно велико при цент-

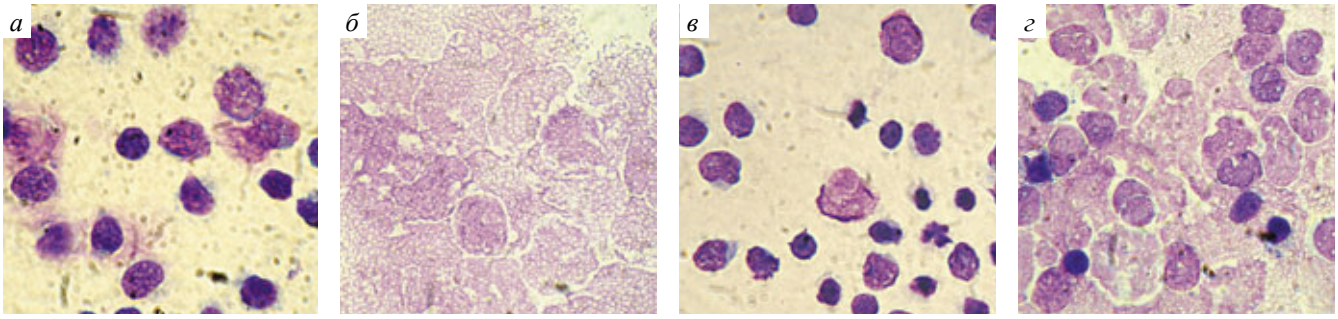


Рис. 4. *Клетки, связавшиеся в тестовых участках биочипа с различными антителами: а — анти-CD3; б — анти-CD16; в — анти-CD19; г — анти-CD45. Осаждение клеток на биочип осуществлялось на центрифуге ОПН-3 при 3000 об/мин 2 мин. Окраска по Романовскому–Гимзе. Увеличение в 600 раз. Клетки деформированы либо полностью разрушены*

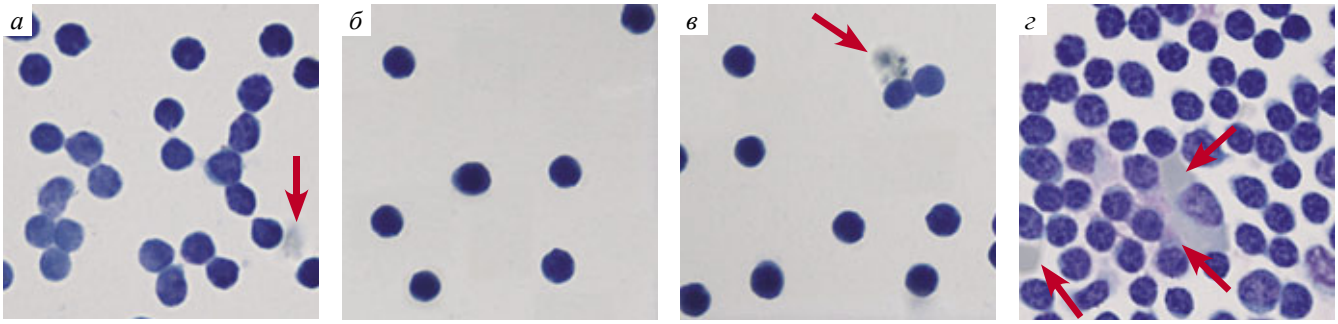


Рис. 5. *Клетки, связавшиеся в тестовых участках биочипа с различными антителами: а — анти-CD3; б — анти-CD16; в — анти-CD19; г — анти-CD45. Осаждение клеток на биочип осуществлялось на центрифуге ОПН-3 при 1000 об/мин. Окраска по Романовскому–Гимзе. Увеличение в 600 раз. Клетки не разрушаются и сохраняют свои морфологические признаки. В области пятен связывается небольшое количество фрагментов клеток, которые подверглись разрушению, вероятно, еще на предшествующих этапах анализа (отмечены стрелками). С целью уменьшения данной примеси на этапе пробоподготовки выполнялась 4-кратная отмывка выделенных лейкоцитов*

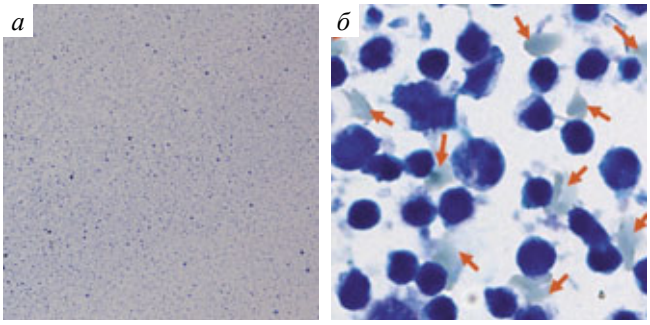


Рис. 6. *Микрофотографии, демонстрирующие осаждение на поверхность биочипа большого количества тромбоцитов и клеток, разрушенных на этапе пробоподготовки, при недостаточной очистке исследуемой клеточной суспензии и центрифугировании при 3000 об/мин: а — тромбоциты, связавшиеся в области тестового участка (пятна) биочипа с антителами, специфичными к антигену CD41; б — клетки, связавшиеся в области тестового участка (пятна) биочипа с антителами, специфичными к антигену CD45. Фрагменты клеток, лишенные ядра, отмечены стрелками. Увеличение в 1000 раз. Окраска по Романовскому–Гимзе.*

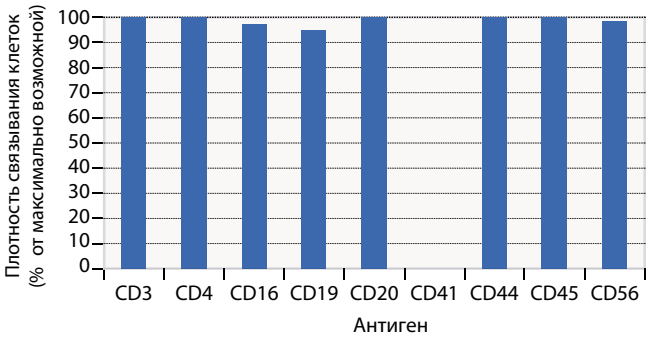


Рис. 7. *Заполнение связанными клетками тестовых участков биочипа после выполнения концентрирования с использованием центрифугирования*

рифугировании при 3000 об/мин и в тех случаях, когда после выделения тромбоцитов отмывка выполнялась всего 1–2 раза (рис. 6). Тромбоциты и фрагменты разрушенных клеток частично экранируют поверхность биочипа и не дают связаться с иммобилизованными антителами части исследуемых клеток. Поэтому плотность связывания лейкоцитов (рис. 6*б*) оказывалась меньше максимально возможной. Для того чтобы уменьшить содержание этих примесей в исследуемом образце, была использована 4-кратная отмывка выделенных клеток и уменьшение ускорения при центрифугировании. Количество осаждаемых на поверхность биочипа тромбоцитов и разрушенных лейкоцитов при этом существенно снижалось. Проведение многократной отмывки требует дополнительных затрат времени, а также уменьшает выход выделяемых лейкоцитов, что требует повышенного расхода клинического материала. Полностью решить указанные проблемы удалось только при использовании 2-ступенчатого градиента на этапе фракционирования клеток.

При проведении анализа с использованием центрифугирования получаемые результаты значительно отличались от результатов эксперимента, в котором центрифугирование не использовалось. Отмечалось «завышение» плотности связывания клеток в области тех участков биочипа, где она должна была являться невысокой. Воспроизводимость результатов, особенно при центрифугировании при 3000 об/мин, была неудовлетворительной.

Ранее была показана возможность повышения плотности связывания в области тестовых участков биочипа клеток, присутствующих в исследуемом образце в малых количествах, путем многократного чередования осаждения клеток на поверхность биочипа и смывания несвязавшихся клеток [7]. Однако такой подход требовал больших затрат времени. Поэтому была предпринята попытка использования центрифугирования для ускорения данного процесса. В ходе проведения анализа этапы осаждения клеток центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1 мин чередовались со встряхиванием емкости (которое выполнялось после полной остановки ротора центрифуги). После выполнения 12 циклов осаждения и смывания удавалось добиться практически предельного заполнения клетками всех тестовых участков биочипа (рис. 7).

Обсуждение

Таким образом, использование ускоренного осаждения клеток крови позволило практически на 1 ч уменьшить время проведения анализа. В то же время точность результатов снизилась. Вероятно, одной из основных причин этого была вибрация центрифуги. Поэтому данный подход может быть использован только в тех случаях, когда необходимо быстро полуколичественно или качественно определить наличие или отсутствие в образце той или иной субпопуляции клеток.

При центрифугировании происходит удар движущихся с ускорением клеток о твердую и недеформируемую поверхность биочипа. При большом ускорении может происходить разрушение клеток. Вопрос о различной устойчивости к такому воздействию у разных типов лимфоцитов требует дальнейшего изучения. Лимфоциты здорового человека не разрушались, если их осаждение на поверхность биочипа осуществлялось центрифугированием при 1000 об/мин (135,28 g). Однако нельзя исключать, что в случае исследования других типов клеток при данных условиях не будет происходить их разрушения. Поэтому может оказаться целесообразным проведение осаждения с меньшим относительным центробежным ускорением. Это потребует внесения существенных изменений в конструкцию центрифуги или использования центрифуги другой модели.

При выполнении концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа за счет использования центрифугирования продолжительность исследования сократилась на несколько часов по сравнению с исходной методикой, описанной в работе [7]. Тем не менее при этом требовалась многократная остановка

центрифуги для встряхивания емкости с биочипом, что приводило к дополнительным затратам времени.

Для того чтобы устранить данный недостаток, необходимо или встряхивать ротор в процессе вращения (вызывать вибрацию) или кратковременно снижать частоту его вращения (выполнять торможение). Данные процессы должны контролироваться, чтобы не происходило отрыва специфически связанных клеток. Это также требует внесения существенных изменений в конструкцию центрифуги.

Представляется перспективным использование описанного подхода для диагностики минимальной остаточной болезни при многих онкогематологических заболеваниях. Однако в связи с малым содержанием таких клеток (порядка 1 на 10^6 клеток и менее) потребу ется выполнение множества циклов осажде ния-смывания и использование суспензии со значительно большей общей концентрацией клеток. Кроме того, существенным изменениям придется подвергнуть конструкцию тест-системы. Вместо биочипа с множеством тестовых участков, имеющих малые размеры, в этом случае необходима тест-система, вся поверхность которой покрыта антителами, специфичными к одному антигену, или же тест-система, имеющая несколько тестовых участков очень больших размеров и практически полностью лишенная фоновых участков. Это необходимо для того, чтобы с антителами связалось как можно большее количество клеток, среди которых будет проводиться поиск минорных субпопуляций.

Клетки опухолевых заболеваний системы крови не содержат каких-то уникальных поверхностных антигенов. От нормальных клеток они отличаются комбинациями антигенов. Для того чтобы отличить опухолевую клетку от нормальных клеток, имеющих один и тот же определяемый антиген, потребуется определение коэкспрессии нескольких антигенов. Для этого после завершения концентрирования клеток и проведения отмывки может быть выполнена обработка поверхности тест-системы мечеными антителами.

Выводы

1. Использование центрифугирования для осаждения клеток на поверхность биочипа значительно ускоряет проведение анализа, но снижает воспроизводимость результатов и точность оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены. Такой подход не может быть использован в тех случаях, когда необходима точная количественная оценка данных показателей.

2. Разрушение лейкоцитов не отмечается при их осаждении на поверхность биочипа с относительным ускорением центрифугирования 135,28 g. При использовании центрифугирования для осаждения клеток на поверхность биочипа исследуемая суспензия должна быть тщательно очищена от примеси тромбоцитов и клеток, разрушенных на этапе пробоподготовки.

3. Ускоренное осаждение клеток центрифугированием может применяться при выполнении концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа, требующего выполнения нескольких этапов осаждения/отмывки.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Belov L., de la Vega O., dos Remedios C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. Cancer research 2001; 61:4483–9.
2. Belov L., Huang P., Barber N. et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. Proteomics 2003;3:2147–54.
3. Belov L., Huang P., Chrisp J.S. et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells. J Immunol Methods 2005;305:10–9.
4. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers. Proteomics 2006; 6:1791–802.
5. Woolfson A., Stebbing J., Tom B. et al. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals. Blood 2005;106(3):1003–7.
6. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells. Cancer Research 2000;60:3429–34.
7. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа. LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG, 2010. 158 с.
8. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток. Биол мембр 2008;4:277–84.
9. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для исследования эритроцитов человека. Биол мембр 2008; 4:267–76.

Молекулярные механизмы лейкозогенеза

Лекция № 3

Гемобластозы миелоидного происхождения

Д.А. Домнинский

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва

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

Molecular mechanisms of leukaemogenesis
3. Myeloid hematological malignancies

D.A. Domninsky

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

Предисловие

В 2 предыдущих лекциях были рассмотрены основные клеточные механизмы, нарушение которых способно вызвать индукцию онкогенных процессов в кроветворных клетках. Геномные аберрации, ведущие к развитию гемобластозов, условно подразделяются на 2 группы (мутации класса I и класса II), которые взаимно дополняют онкогенный потенциал друг друга (см. лекции № 1 и № 2 в журнале «Онкогематология» № 4 за 2010 г. и № 1 за 2011 г. соответственно). В этой лекции будут обсуждаться основные типы рекуррентных геномных аберраций, встречающихся при лейкозах миелоидного происхождения, а также механизмы реализации онкогенного потенциала этих генетических нарушений.

Глава I. Современные принципы классификации гемобластозов

В последние годы молекулярно-генетическая характеристика опухолевых клеток становится ключевым диагностическим и прогностическим фактором. Прогностическая составляющая этой характеристики заключается в высокой степени корреляции между наличием определенного набора геномных аберраций и особенностями заболевания. Диагностическая составляющая позволяет вносить уточнения в существующую классификацию гемобластозов, выделяя специфичные варианты заболеваний, которым присуще наличие определенных генетических аномалий [1]. Отдельным вопросом является соотношение между этими двумя составляющими и то, какие мутации можно считать диагностическими (т. е. определяющими вариант заболевания), а какие — прогностическими. Очень часто рекуррентные аберрации имеют как диагностическое, так и прогностическое значение, но есть и исключения. Например, мутации гена *FLT3* часто встречаются при разных вариантах острого лейкоза как миелоидного, так и лимфоидного происхождения. Понятно, что такие мутации являются прогностическим фактором, а не диагностическим. Можно предположить, что к диагностическим аберрациям относятся нарушения, которые инициируют онкогенез в клетках, имеющих миелоидную или лимфоидную природу и находящихся на разных уровнях дифференцировки, что и обуславливает фенотип опухоли. К аберрациям, имеющим прогностическое значение, следует отнести дополнительные онкогенные мутации, которые могут быть комплементарны инициирующим (диагностическим) мутациям (мутация класса I + мутация класса II) и оказывать влияние на характер протекания болезни.

В таблице приведен список рекуррентных генных аберраций при гемобластозах миелоидного происхождения, которые согласно рекомендациям ВОЗ имеют диагностический характер [1, 2]. Краткое описание понятий и терминов, применяемых для описания генетических аномалий, приведено в Приложении. Подразделение острого миелолейкоза (ОМЛ) на различные варианты, приведенное в таблице, основано на рекуррентных геномных изменениях в лейкозных клетках. В одних случаях классификация ВОЗ почти полностью совпадает с FAB-классификацией, составленной на основе цитоморфологической характеристики опухоли. Например, при М3-типе ОМЛ по FAB-классификации (ОПЛ, острый промиелоцитарный лейкоз) хромосомная транслокация t(15;17)(q22;q12), связанная с образованием химерного гена *PML-RARA*, встречается у 98% больных. У 2% пациентов также выявляются транслокации, которые затрагивают локу с 17q12 и приводят к рекомбинации гена *RARA* с иными генами-партнерами. В других случаях FAB-классификация является очень «широкой» — некоторые типы ОМЛ не всегда сочетаются с какой-либо одной специфичной геномной аберрацией. Например, только в 40% случаев М2-типа ОМЛ по FAB-классифика-

Подтипы ОМЛ, выделенные в отдельные группы по классификации ВОЗ [1] (*), и подтипы миелопролиферативных заболеваний [2], характеризующиеся специфичными рекуррентными генными аберрациями

Заболевание, хромосомная транслокация	**Химерные гены**	**% (**)**
ОМЛ, t(8;21)(q22;q22) [M2]	*RUNX1-RUNX1T1*	100
ОМЛ, inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22) [M4Eo]	*CBFB-MYH11*	100
ОМЛ, t(9;11)(p22;q23) [M4, M5]	*MLL-MLLT3*	100
ОМЛ, t(6;9)(p23;q34) [M2]	*DEK-NUP214*	100
ОМЛ, inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2) [M0, M4]	*RPN1-EVI1*	100
ОМЛ, t(1;22)(p13;q13) [M7]	*RBM15-MKL1*	100
ОПЛ, t(15;17)(q22;q12) [M3]	*PML-RARA*	100
ОМЛ с мутациями в гене *NPM1*		100
ОМЛ с мутациями в гене *CEBPA*		100
Миелопролиферативные заболевания		
Ph+ ХМЛ, t(9;22)(q34;q11)	*BCR-ABL1*	100
Истинная полицитемия, мутация *JAK2* V617F мутации в 12-м экзоне гена *JAK2*		 95 5
Эссенциальная тромбоцитемия, мутация *JAK2* V617F		50
Хронический идиопатический миелофиброз, мутация *JAK2* V617F мутация *MPL* W515L/K		 50 5
Хронический нейтрофильный лейкоз, мутация *JAK2* V617F		 20
Хронический эозинофильный лейкоз с del14q12	*FIP1L1-PDGFRA*	100
Хронический эозинофильный лейкоз с перестройками в локусе 5q33	варианты химерного гена *PDGFRB*	100
Лейкоз/лимфома стволовых клеток с перестройками в локусе 8p11	варианты химерного гена *FGFR1*	100
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз,		
мутации в гене *PTPN11*		30
мутации в гене *NF1*		15
мутации в гене *RAS*		15
Системный мастоцитоз, мутации гена *KIT*		100

(*) В квадратных скобках указан тип ОМЛ по FAB-классификации, из которого выделен указанный подтип ОМЛ. (**) Частота встречаемости геномных аберраций при данном типе заболевания.
Аббревиатуры: BCR – breakpoint cluster region; CBFB – core binding factor β; CEBPA (C/EBPα) – CCAAT enhancer binding factor α; EVI1 – ecotropic viral integration site 1; FGFR1 – fibroblast growth factor receptor 1; FIP1L1 – FIP1 like 1 (где FIP1 – factor interacting with PAP); MKL-1 – megakaryoblastic leukemia (также известен как MAL, megakaryocytic acute leukemia); MLL – mixed lineage (myeloid/lymphoid) leukemia; MLLT3 – mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3 (также известен как AF9 – ALL1-fused gene from chromosome 9, где ALL1 – старое название гена MLL); MPL – myeloproliferative leukemia virus, human homolog (также известен как TPOR, рецептор тромбопоэтина); MYH11 – smooth-muscle myosin heavy chain 11; NF1 – neurofibromin 1; NPM1 – nucleophosmin 1; NUP214 – nucleoporin 214kDa; PDGFRB – platelet-derived growth factor receptor β; PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor α; Ph – филадельфийская хромосома (22q–); PML – promyelocytic leukemia; PTPN11 – protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; RARA – retinoic acid receptor α; RAS – rat sarcoma virus; RBM15 – RNA binding motif protein 15 (также известен как OTT, one twenty-two); RPN1 – ribophorin 1; RUNX1 – runt-related transcription factor 1 (также известен как AML1 – acute myeloid leukemia 1); RUNX1T1 – runt-related transcription factor 1; translocated to 1 (также известен как ETO – eight twenty one).

П р и л о ж е н и е . ***Основные типы геномных аберраций***

Геномные аберрации можно условно подразделить на крупные (хромосомные) аберрации, которые выявляются цитогенетическими методами, и более мелкие (скрытые, криптические) аберрации, которые можно выявить только молекулярными методами, типа ПЦР и секвенирования ДНК. На **рис. I** показаны 2 основных типа хромосомных аберраций: (**1**) Сбалансированные (реципрокные) хромосомные транслокации не приводят к изменению количества генетического материала. В области хромосомной рекомбинации могут образовываться химерные гены, одна часть которых («голова», N-концевая часть гибридного белка) принадлежит гену из одной хромосомы, а другая («хвост», С-концевая часть гибридного белка) – гену из другой хромосомы. С химерных генов экспрессируются гибридные (или «слитные», fusion) белки. Химерные гены образуются на обеих рекомбинантных хромосомах, но только один из них, как правило, обладает онкогенным потенциалом. Ген на другой хромосоме, так называемый реципрокный ген, может кодировать гибридный реципрокный белок, структура которого является зеркальным отражением онкобелка (см. **рис. I**, слева внизу). Если хромосомы обмениваются фрагментами разной величины, то хромосома, получившая больший фрагмент, обозначается как «Nq+» (или «Np+», если транслокация затронула короткое плечо хромосомы N), а другая, уменьшившаяся в размере хромосома, обозначается как «Nq–» или «Np–». (**2**) Несбалансированные аберрации могут приводить к увеличению (gain) или потере (loss) генетического материала. Увеличение генетического материала (помимо полной или частичной трисомии) может представлять собой внутри- или внехромосомную амплификацию, приводящую к возникновению однородно окрашенных локусов (**HSR**, **h**omogeneously **s**taining **r**egions) или двойных минихромосом (**dmin**, **d**ouble-**min**ute chromosomes) соответственно. Потеря генетического материала может быть разного размера – от потери целых хромосом (моносомия) до потери всего лишь нескольких нуклеотидов ДНК (микроделеции).

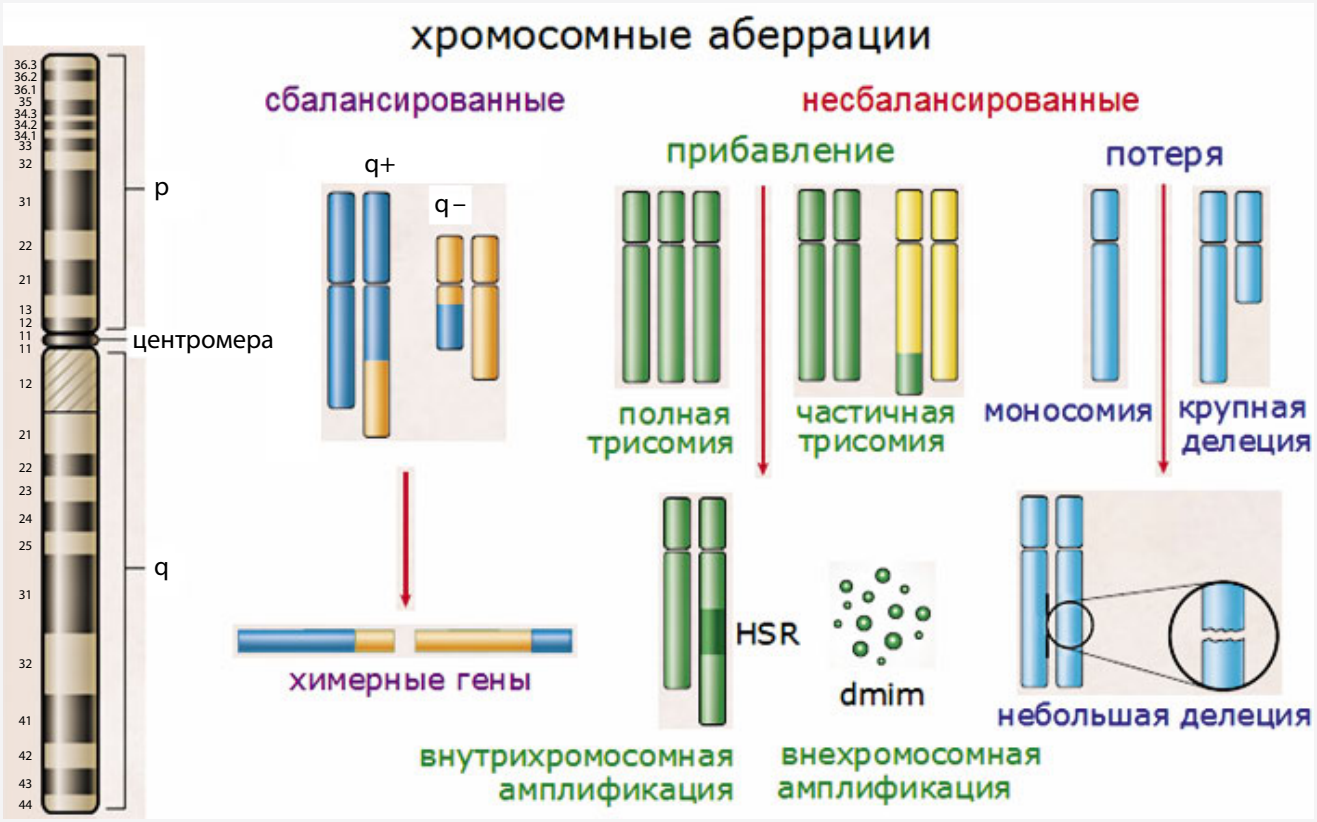


Рис. I. *Основные типы хромосомных аберраций. Рисунок адаптирован из обзора S. Frohling & H. Dohner [37]*

В хромосомах выделяют короткое (p, в акроцентрических хромосомах оно почти отсутствует) и длинное (q) «плечи», разделенные центромерой. Хромосомы содержат участки с более (гетерохроматин, «молчащая» ДНК) и менее (эухроматин, содержит активные гены) плотной упаковкой, которые отличаются по интенсивности окрашивания (полосы, бэнды, **рис. I**, слева). Нумерация этих полос (от центромеры к полюсам каждого плеча) позволяет указывать положение локусов хромосомных аберраций или месторасположение генов. Например, t(9;22)(q34.1;q11.23) означает транслокацию между хромосомами 9 и 22 с разрывами в локусах 9q34.1 и 22q11.23; inv(16)(p13.11q22.1) – инверсия хромосомы 16 с разрывом в локусах 16p13.11 и 16q22.1; del(5)(q13q35) – делеция в длинном плече хромосомы 5 с потерей материала между 5q13 и 5q35 локусами.

Однонуклеотидные (точковые) мутации подразделяют на: нейтральные (не изменяют кодируемую аминокислоту), миссенс (missense, изменение смысла кодона, кодирование другой аминокислоты), нонсенс (nonsense, бессмысленные, возникновение стоп-кодона, обрыв белкового синтеза).

Небольшие вставки (или дупликации) и делеции (если их размер не кратен 3) могут приводить к «сдвигу рамки считывания» (frameshift) и синтезу, после сайта мутации, другой белковой последовательности.Клетки опухоли генерируют большое число мутаций, но только небольшая их часть индуцирует или поддерживает онкогенез — «движущие» (driver) мутации — остальные мутации относятся к нейтральным, «пассажирским» (passenger) мутациям. Онкогенные мутации подразделяются на активирующие мутации (gain of function) и мутации инактивирующие (loss of function), частично или полностью, функции гена. Активирующие мутации, свойственные онкогенам, являются доминантно-негативными и обладают гаплонедостаточностью (haploinsufficient), когда одного нормального аллеля недостаточно для выполнения обычной клеточной функции (онкобелок всегда побеждает). Для нейтрализации активности генов-супрессоров опухолей требуется инактивация (мутации или делеции) обеих аллелей.

ции выявляется хромосомная транслокация t(8;21)(q22;q22), сопровождаемая возникновением химерного гена *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)*. Еще 1% больных ОМЛ М2 имеет t(6;9)(p23;q34) транслокацию и химерный ген *DEK-NUP214 (DEK-CAN)*, а в оставшихся 59% случаев ОМЛ М2 специфичных генетических аберраций не обнаруживается. Это может быть связано или со слишком «грубыми» цитоморфологическими критериями FAB-классификации, приведшими к объединению в одну группу целого ряда различных по своей этиологии заболеваний, или с наличием при ОМЛ М2 каких-то трудно выявляемых (криптических) мутаций. В классификации ВОЗ лейкозы с t(8;21)(q22;q22) и t(6;9)(p23;q34) хромосомными транслокациями выделены в отдельные диагностические варианты (100% в таблице). В некоторых случаях обнаружение в схожих по цитоморфологическим и иммунофенотипическим показателям заболеваниях нескольких вариантов геномных аберраций еще не является причиной подразделять их на разные подтипы, так как результатом всех этих мутаций могут быть, например, нарушения в одном и том же пути сигнальной трансдукции. В главе II будет приведен пример такого заболевания, при котором идентичная конститутивная активация одного из триггеров сигнальной трансдукции (белка RAS) вызывается несколькими генетическими нарушениями в разных генах.

Использование данных молекулярно-генетического тестирования делает классификацию гематологических опухолей сложнее, но такой подход имеет большие перспективы, так как уже сегодня позволяет точнее дифференцировать гемобластозы, выделяя группы с различным прогнозом. А в недалеком будущем такая классификация поможет при планировании индивидуальной терапевтической тактики с применением таргетных препаратов, мишенями которых являются онкогенные продукты конкретных геномных аберраций.

Глава II. Мутации I класса

К мутациям I класса относятся генетические нарушения, которые увеличивают пролиферативный потенциал и жизнеспособность клеток, повышая их способность не отвечать на проапоптотические сигналы. В гематологических опухолях рекуррентные аберрации I класса активируют гены, которые кодируют околомембранные компоненты путей сигнальной трансдукции — рецепторы и медиаторы (см. лекцию № 1, рис. 1). Основные механизмы передачи сигнала от клеточной мембраны к ядру связаны, так или иначе, с переносом фосфатных групп с одного белка на другой. Это может быть прямое фосфорилирование белков протеинкиназами, т. е. перенос фосфатных групп с АТФ на аминокислотные остатки белков-акцепторов, что приводит к активации последних. Кроме того, активацию некоторых сигнальных белков можно формально приравнять к фосфорилированию — замена ГДФ (гуанозиндифосфата) на ГТФ (гуанозинтрифосфат, т. е. «добавление» еще одной фосфатной группы в белковый комплекс) в G-белках также приводит к их активации (см. лекцию № 2). В этой главе будут рассмотрены основные механизмы онкогенной активации генов, кодирующих сигнальные белки, которые наиболее часто встречаются в гематологических опухолях. Из данных, приведенных в таблице, к мутациям класса I относятся все рекуррентные геномные аберрации, которые характерны для миелопролиферативных заболеваний. При О МЛ часто встречающиеся мутации I класса в генах *FLT3*, *KIT* и *RAS* не являются специфичными только для этого вида лейкоза, на основании этого они относятся к прогностическим признакам и не включены в классификацию ВОЗ.

Протеинкиназы — фосфатазы

«Все активные киназы похожи друг на друга, каждая неактивная киназа неактивна по-своему»
(своеобразный «научный» парафраз первых строк романа «Анна Каренина», приведенный в обзоре Луизы Джонсон и др. [3]).

Активные протеинкиназы обладают высоким онкогенным потенциалом. Поэтому в клетке существует много механизмов контроля их активности: от удаления активирующих фосфатных групп фосфатазами до полной деградации активированных белков убикви тин-протеасомной системой. Однако основным механизмом защиты является «самоконтроль» протеинкиназ — в отсутствии внешних воздействий они находятся в состоянии автоингибирования [4]. Все известные онкогенные аберрации, затрагивающие гены протеинкиназ, приводят к разрушению конформации автоингибирования. А так как в стабилизации такого автоингибирующего состояния в разных ферментах участвуют различные белковые домены (см. эпиграф к этой главе и лекцию № 2, рис. 3), то и механизмы разрушения этой конформации (онкогенная активация) в разных протеинкиназах могут существенно отличаться [4, 5].

На рис. 1А показана схема организации активной конформации киназного домена протеинкиназ. У всех исследованных протеинкиназ структурные особенности этой конформации подобны независимо от их специфичности (тирозиновые или серин-треониновые киназы) или особенностей клеточной локализации (цитозольные или рецепторные — **RTKs**, **r**eceptor **t**yrosine **k**inases) [6, 7]. К основным структурным элементам киназного домена, определяющим его активность, относятся: (**1**) петля активации (А-петля) в С-половине киназного домена, представляющая собой подвижную пептидную цепь, несущую аминокислотные остатки, способные к фосфорилированию (тирозин или треонин в зависимости от типа протеинкиназ); (**2**) в основании А-петли содержатся 2 консервативных мотива из 3 аминокислот — HRD (Г ис-Арг-Асп) и DFG (Асп-Фен-Глу), которые принимают участие

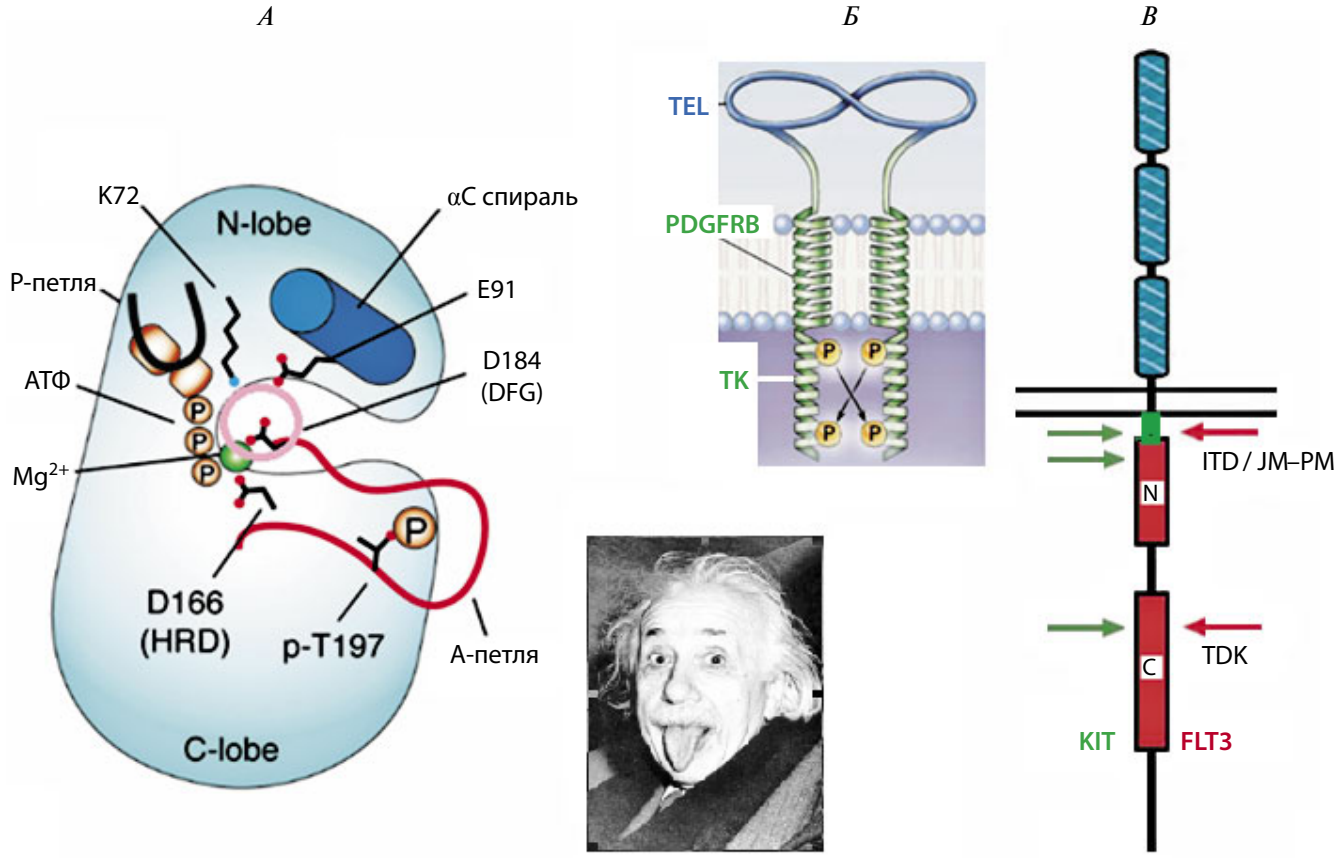


Рис. 1. *Схематическое изображение протеинкиназы в активной конформации (А) и различных вариантов онкогенной активации рецепторных протеинкиназ (Б и В): (А) Основные структурные особенности активной конформации протеинкиназ на примере протеинкиназы А. Указано положение консервативных аминокислотных остатков (международная система обозначения аминокислот): D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, K – лизин, T – треонин. Подробности см. в тексте лекции; (Б) Схема активации тирозинкиназного рецептора PDGFRB в результате хромосомной транслокации t(5;12)(q33;p13), которая приводит к образованию химерного гена TEL-PDGFRB, с которого экспрессируется гибридный белок TEL-PDGFRB, содержащий N- и C-концевые области TEL- и PDGFRB-белков, соответственно. В гибридном белке внеклеточный домен PDGFRB заменен на последовательность TEL-белка (голубой цвет), которая содержит домен димеризации, опосредующий димеризацию и онкогенную активацию белка TEL-PDGFRB, при которой сближенные киназные домены (TK) гибридных рецепторов перекрестно активируют (P, фосфорилируют) друг друга. TEL – translocation ets leuketia (также известен как ETV6, ETS variant gene 6); (В) Схема строения рецепторов KIT и FLT3. Голубым цветом окрашен внеклеточный домен, зеленым – подмембранный (JM) домен, красным – C- и N-половины киназного домена, соединенные между собой подвижным белковым «шарниром» (черная вертикальная полоса между «N» и «C»). Стрелками указано местоположение онкогенных мутаций, обнаруженных в генах KIT (зеленые стрелки) и FLT3 (красные стрелки). Подробности см. в тексте лекции. Рисунок адаптирован из работ N. Jura et al. [6] и R. Schwartz [17]*

в формировании каталитического (активного) центра белка (на рис. 1А активный центр фермента очерчен розовым кругом); (**3**) подвижная αC спираль в N-половине киназного домена осуществляет перемещения консервативного остатка глутаминовой кислоты (E91 на рис. 1А), который также формиру ет каталитический центр. Активная конформация киназного домена выглядит следующим образом: А-петля подвергнута фосфорилированию (по тирозину или треонину , в зависимости от типа протеинкиназы) и находится за пределами каталитического центра; HRD и DFG участки С-половины и глутамат αC спирали N-половины киназного домена «сдвинуты» друг к другу, формируя активный центр, способный связывать белок-субстрат и АТФ (в связывании АТФ также участвует «фосфатная петля», Р-петля). Такое взаиморасположение белковых участков внешне напоминает человека (голова — киназный домен), который высунул язык (А-петля) и при этом не раскрыл широко рот (верхнее и нижнее «небо», E91 и HRD/DFG, соответственно, формируют «активный центр»). В общем, как на знаменитой фотографии «Эйнштейн показывает язык» (рис. 1).

Как же в рамках программы строгого самоконтроля формируется огромное разнообразие неактивных конформаций протеинкиназ? Если продолжить аналогию с человеческой головой, то эти процессы можно описать примерно так: широко открытый рот (увеличение «щели» между С- и N-половинами киназного домена, которое обеспечивается подвижным белковым «шарниром» между ними, при этом пептидные мотивы, формирующие активный центр, расходятся в разные стороны), но этого мало — образовавшаяся щель заполняется близлежащими белковыми фрагментами. Как было показано ранее (см. лекцию № 2, рис. 3), разрушенный каталитический центр может стабилизироваться путем проникновения в эту область различных под-

вижных пептидных участков белка: А-петли (как, например, в случае FGFR и рецептора инсулина), С-концевого «хвоста» (TIE2 рецептор ангиопоэтинов, MET/HGFR и RON/MST1R рецепторы) и подмембранного домена (**JM**, **j**uxta**m**embrane domain; KIT, PDGFR и FLT3 рецепторы) в случае RTKs [4], или фрагментов других (регуляторных) субъединиц ферментов [6]. Протеинкиназы семейства JAK для стабилизации автоингибирующей конформации используют свой 2-й (не рабочий) киназный домен, который в процессе эволюции приобрел регуляторные функции. А в случае ц-АМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA) киназный домен ингибируется взаимодействием с регуляторной субъединицей этого фермента.

Конформация автоингибирования протеинкиназ является энергетически более выгодной, т. е. равновесие между активной и неактивной формой фермента сдвинуто в сторону неактивной конформации. Для изменения этого равновесия и разрушения стабильных ингибирующих конформаций протеинкиназ требу ется внешнее воздействие [6]. Такое воздействие могут осуществлять другие активированные киназы, например, RTKs при их связывании с лигандом, которые фосфорилируют в белках-мишенях А-петлю (или другие заполняющие «щель» пептидные фрагменты, например JM-домен), что приводит к вытеснению А-петли и формированию активного каталитического центра. Цитозольные киназы, например SRC или ABL, могут активироваться субстратами этих ферментов или адапторными белками, которые рекрутируют к своим стыковочным сайтам регуляторные SH2- и/или SH3-домены фермента, что приводит к разрушению ингибирующей конформации «широко открытый рот» (см. лекцию № 2, рис. 3А). Циклин-зависимые киназы (**CDKs**, **c**yclin-**d**ependent **k**inases), играющие ключевую роль в регуляции клеточного цикла, активируются белками циклинами. Циклины имеют участки связывания в районе αC спирали CDKs. Их связывание с киназой приводит к транслокации αC спирали в область активного центра, вытеснению из нее А-петли, формированию каталитического центра и активации CDK. Высокая внутриклеточная концентрация ц-АМФ вызывает активацию PKA — ц-АМФ связывается с регуляторной субъединицей киназы, это приводит к изменению конформации белка и освобождению активной PKA [6].

Онкогенными мутациями в генах, кодирующих протеинкиназы, являются только те, которые приводят к дестабилизации неактивной конформации фермента и, следовательно, к его неконтролируемой, конститутивной (постоянной) активации. То есть при таких мутациях изменениям подвергаются участки белка, которые отвечают за стабильность конформации автоингибирования, что делает эту конформацию энергетически невыгодной, и равновесие между активной и неактивной формой фермента сдвигается в сторону активной конформации. Зная особенности формирования неактивных структур протеинкиназ, можно в принципе предсказать местоположение возможных онкогенных мутаций в этих белках. Если, например, неактивная конформация киназы стабилизируется JM-доменом (тирозинкиназные рецепторы KIT, FLT3 и PDGFR), то можно ожидать, что мутации будут затрагивать именно этот участок рецептора. Действительно, онкогенные мутации в генах, кодирующих KIT и FLT3 рецепторы, затрагивают всего 2 участка белковой молекулы — JM-домен и А-петлю (рис. 1В) [8]. Причем если в области А-петли выявляются в основном точечные онкогенные мутации (**TKD**, **t**yrosine **k**inase **d**omain), локализованные около остатка аспартата (D835), то в JM-домене могут происходить как точечные мутации (**JM-PM**, JM single **p**oint **m**utations), так и более крупные изменения (делеции и вставки). Наиболее часто в гене *FLT3* обнаруживаются внутренние тандемные дупликации (**ITDs**, **i**nternal **t**andem **d**uplications — дублирование небольшого, кодирующего 3–10 аминокислот, участка ДНК) в JM-домене, которые имеют различное положение и размер. Наличие ITDs-мутации в гене *FLT3* существенно ухудшает прогноз. Все мутации в генах этих рецепторов (TDK и ITD/JM-PM) затрагивают область контакта А-петли и JM-домена, который играет ключевую роль в формировании неактивной конформации белка. Нарушение такого контакта вследствие изменения аминокислотных последовательностей в этой области приводит к дестабилизации неактивной конформации, конститутивной активации рецепторов и онкогенезу [9–11]. Похожий тип нарушения ингибирующих белок-белковых взаимодействий наблюдается при мутациях в гене *JAK2*, которые являются рекуррентными аберрациями при некоторых миелопролиферативных заболеваниях (см. таблицу). Так как в формировании конформации автоингибирования активное участие принимает 2-й (не рабочий) киназный домен белка, то все выявленные в гене *JAK2* онкогенные мутации (включая V617F) локализуются в области, которая кодирует N-концевую (регуляторную) часть псевдокиназного домена [12].

Наиболее частым механизмом активации генов (относящихся к мутациям как класса I, так и класса II) при гемобластозах являются сбалансированные (реципрокные) хромосомные транслокации, приводящие к возникновению химерных генов (см. Приложение и таблицу) [5, 13, 14]. При этом обычно ген-партнер по транслокации привносит в гибридный белок домены димеризации, что приводит к образованию димеров между мутантными протеинкиназами (аналогично димеризации RTKs при связывании с лигандом) и конститутивной активации ферментов. Именно таким образом активируется цитозольная киназа ABL при хромосомной транслокации t(9;22) и тирозинкиназные рецепторы FGFR1 (около 10 типов транслокаций локуса 8p11 с разными геномными локусами, приводящими к рекомбинации гена *FGFR1* с различными генами-партнерами) и PDGFRB (более 20 разных хромосомных транслокаций с участием локуса 5q33). Все эти гибридные белки имеют сходное строение: N-концевая часть белка

(«голова») принадлежит белку-партнеру и несет домены димеризации, С-концевая часть белка («хвост») представляет собой часть протеинкиназы с киназным доменом. При этом в рекомбинантных RTKs, как правило, отсутствует большая часть внеклеточного домена (которая заменяется фрагментом белка-партнера), все остальные домены RTK сохраняются, что позволяет гибридному белку функционировать в качестве лиганднезависимого, конститутивно активированного рецептора (рис. 1Б) [5, 13–15].

Достаточно необычен механизм онкогенной активации рецептора PDGFRA при хроническом эозинофильном лейкозе. Ген *PDGFRA* и его ген-партнер *FIP1L1* расположены недалеко друг от друга на 14-й хромосоме. Образование химерного гена *FIP1L1-PDGFRA* происходит в результате несбалансированной внутрихромосомной перестройки (делеции del14q12 размером 800 тыс. пар нуклеотидов), которая приводит к стыковке участков ДНК, кодирующих N-конце вую область белка FIP1L1 и С-концевую область белка PDGFRA. Однако белок FIP1L1 не имеет доменов димеризации, поэтому онкогенный потенциал гиб ридного белка FIP1L1-PDGFRA реализуется с помощью другого механизма. В белке FIP1L1-PDGFRA отсутствует (частично или полностью) JM-домен от PDGFRA, который у рецептора PDGFRA отвечает за автоингибирование, поэтому киназный домен FIP1L1-PDGFRA находится в активном состоянии. Но так как в белке FIP1L1-PDGFRA также отсутствует и трансмембранный домен (который расположен «выше» JM-домена и в гибридный белок не включается), то он не может связываться с мембраной подобно рецептору и функциониру ет в клетке как конститутивно активированная цитозольная протеинкиназа [16]. Интересно, что при других хромосомных транслокациях, в которых участвует ген *PDGFRA*, в образующихся химерных генах также отсутствует трансмембранный домен PDGFRA, а JM-домен может сохраняться полностью, но в этих случаях белок-партнер (STRN, TEL или BCR) содержит домен димеризации, что позволяет гибридному цитозольному белку находиться в активированном состоянии [18].

Знание структурных особенностей разнообразных неактивных конформаций протеинкиназ позволяет не только предсказывать расположение возможных онкогенных мутаций в этих белках (и наоборот, знание расположения онкогенных мутаций позволяет судить об автоингибирующей структуре фермента), но может помочь при проектировании нового поколения высокоспецифичных ингибиторов для различных вариантов мутантных белков. Первые ингибиторы протеинкиназ были спроектированы таким образом, что их мишенью являлись АТФ-связывающие «карманы» в активном центре ферментов. Такие ингибиторы моделировать достаточно просто, так как у исследователей есть структурный прототип лекарственного препарата — А ТФ. Однако все протеинкиназы имеют участки связывания АТФ, поэтому первое поколение ингибиторов (к которым относится, например, иматиниб) в той или иной степени инактивирует целый ряд нормальных клеточных киназ, что приводит к побочным цитотоксическим эффектам препарата. Учитывая разнообразие неактивных конформаций протеинкиназ, следует ожидать, что препараты, мишенью которых будут конкретные структуры неактивных белков, и которые будут способны переводить онкогенные киназы в неактивное состояние и фиксировать их в этой конформации, будут более специфичны и могут совершить прорыв в онкологии [6, 19]. Но об этом речь пойдет в заключительной лекции нашего цикла.

Комплексные мутации, затрагивающие RAS-сигнализацию

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ) является примером гемобластоза, развитие которого связано с онкогенными мутациями в различных генах, но все эти мутации приводят к активации одного сигнального белка (RAS) и одного сигнального пути (RAS-RAF-MAPK) (см. лекцию № 2, глава III). Чаще всего при ЮММЛ выявляются активирующие мутации в генах *RAS* (*N-RAS* и *K-RAS*) и *PTPN11* (кодирует фосфатазу SHP2, SH2 do main-containing phosphatase 2), а также инактивирующие мутации в гене *NF1* [20]. Активность малых G-белков, к которым относятся белки RAS-семейства, контролируется на нескольких уровнях: собственной ГТ Фазной активностью G-белков, факторами, увеличивающими ГТ Фазную активность G-белков (G AP, супрессоры G-белков) и факторами обмена Г ДФ на ГТФ (GEF, активаторы G-белков) (лекция № 2, глава III). NF1 относится к белкам GAP-семейства и является ингибитором RAS-белков, поэтому его инактивация приводит к увеличению активности RAS. Фосфатаза SHP2 «по определению» должна относиться к супрессорам опухолей, как и все остальные фосфатазы, но в случае ЮММЛ она выступает в роли онкогена, что является первым описанным примером такой неожиданной метаморфозы фосфатаз [21]. Действительно, фосфатазы, осуществляя дефосфорилирование сигнальных и адапторных белков, прерывают цепь сигнальной трансдукции, так как уничтожают активирующие сайты (фосфорилированные аминокислотные остатки в А-петле протеинкиназ) у первых, и стыковочные сайты (фосфотирозины) — у вторых.

На рис. 2 показан процесс активации RAS-RAF-MAPK пути сигнальной трансдукции, в котором в качестве активатора участвует SHP2-фосфатаза.

Было предложено несколько гипотез для объяснения активации SHP2-фосфатазой RAS-сигнального пути, но ни одна из них не нашла пока экспериментального подтверждения [22, 23]. Во всяком случае, установлено, что конститутивно активированная SHP2-фосфатаза формирует «шунт» (своеобразное «короткое замыкание», исключающее из сигнальной цепи активированный рецептор), который индуциру ет последова-

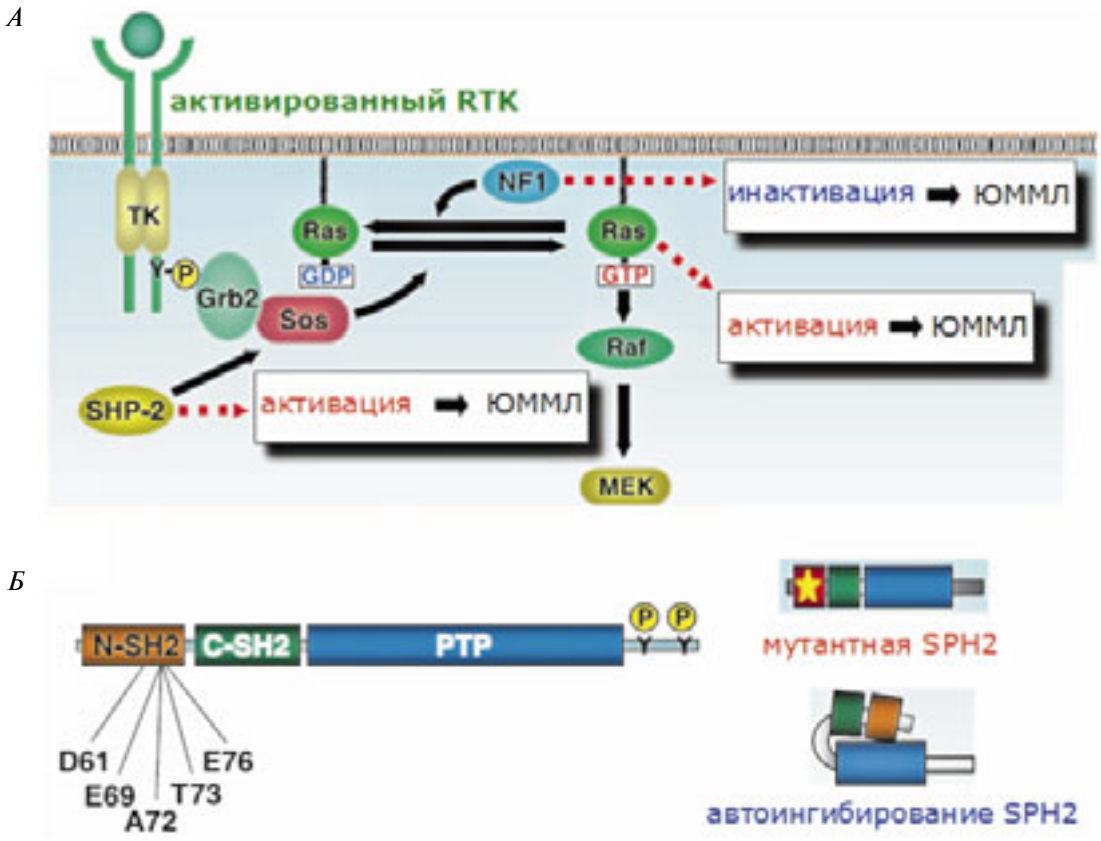


Рис. 2. *Схема 3 вариантов конститутивной активации RAS-RAF-MAPK сигнального пути (А) и активации SHP2 фосфатазы при мутагенезе (Б): (А) Активация тирозинкиназного рецептора (RTK) приводит к фосфорилированию сигнальных и адапторных белков. Активная фосфатаза SHP2 в этом процессе функционирует как индуктор сборки комплекса из адапторного белка GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) и GEF-белка SOS (son of sevenless), что приводит к активации SOS-белком G-белка RAS и «запуску» RAS-RAF-MAPK-пути сигнальной трансдукции (см. также лекцию № 2, рис. 4). Ингибитором этого процесса является GAP-белок NF1. Мутации, активирующие SHP2- или RAS-белки и инактивирующие белок NF1, приводят к одному и тому же результату – конститутивной активации RAS-RAF-MAPK-сигнального пути и индукции онкогенеза; (Б) Схема формирования неактивной структуры SHP2. Взаимодействие N-концевого SH2-домена (N-SH2) белка SHP2 с С-концевыми стыковочными сайтами (P, фосфотирозин) приводит к экранированию каталитического домена (PTP) и к автоингибированию фосфатазы (схема внизу, справа). Онкогенные мутации (обозначены звездочкой на схеме вверху , справа) изменяют ключевые аминокислотные остатки в N-SH2-до мене (D61-E76), которые отвечают за связь с фосфотирозином (схема слева). Это приводит к дестабилизации инактивирующей конформации SHP2 и конститутивной активации фосфатазы. Рисунок адаптирован из работы T. Matozaki et al. [22]*

тельную лиганд-независимую реакцию: формирование стабильного комплекса из GRB2 адапторного белка и GEF белка SOS → активация RAS-белка → MAPK каскад сигнализации.

Глава III. Мутации II класса

Из данных, приведенных в таблице, к мутациям класса II относятся все диагностические рекуррентные геномные аберрации при О МЛ. Мутации класса II, влияющие на процессы дифференцировки и самоподдержания клеток крови, чаще всего происходят в генах, кодирующих белки-регуляторы генной экспрессии. Белки, регулирующие синтез мРНК, образуют в районе генных промоторов сложные комплексы, состоящие из активаторов и коактиваторов (репрессоров и корепрессоров) транскрипции, белков-модификаторов хроматина, белков комплекса инициации транскрипции (PIC) и других белков (см. лекцию № 1, Приложения 3 и 4). Такие активирующие (или репрессирующие) транскрипцию белковые комплексы собираются благодаря большому числу очень тонких белок-ДНК и белок-белковых взаимодействий, нарушение которых (например, в результате мутаций в генах, кодирующих белки этих комплексов) может привести к фатальным для клетки последствиям, а в некоторых случаях — к развитию опухолеродных процессов. Так как все эти белки формируют своеобразный эпигенетический «ландшафт», определяющий постоянно меняющуюся на разных этапах развития клетки картину (паттерн) генной экспрессии, то кодирующие их гены можно условно отнести к «эпигенетическим» онкогенам и генам-супрессорам опухолей [24].

В рамках данного курса лекций подробно рассмотреть все лейкозогенные мутации класса II, приведенные в таблице, не представляется возможным. Поэтому основные механизмы реализации онкогенного потенциала мутаций этого класса будут рассмотрены на примере гена *MLL*, геномные аберрации с участием которого инициируют развитие опухолей как миелоидного, так и лимфоидного происхождения.

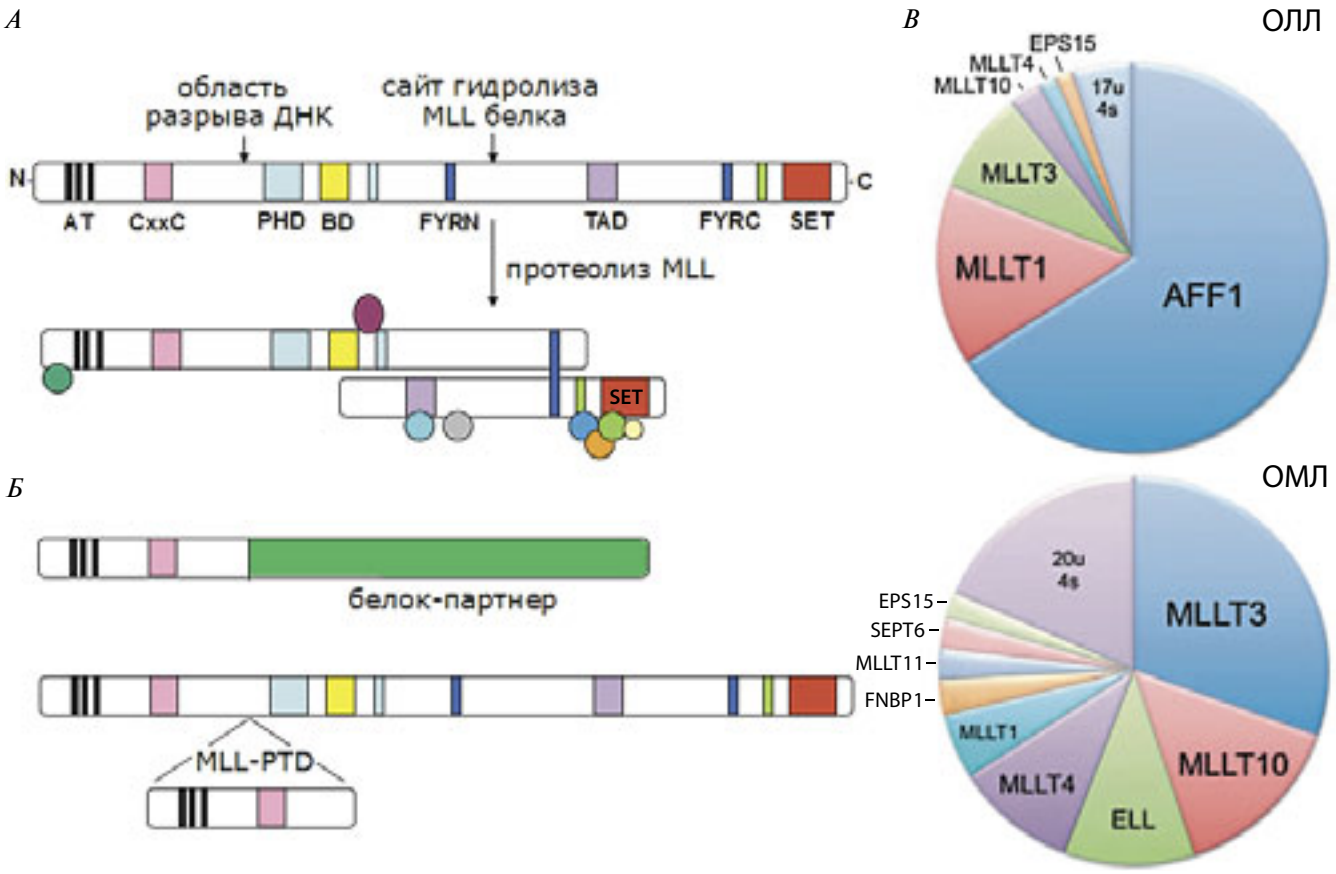


Рис. 3. *Структурная организация нормального MLL-белка (А) и 2 типов мутантных MLL-белков (Б); частота встречаемости различных рекомбинантных MLL-генов при острых лейкозах (В):*
(А) Доменная организация MLL-белка и схема его созревания. Сверху показана структура MLL-белка с указанием некоторых его функциональных доменов. Стрелками отмечена область, которая соответствует точкам разрыва ДНК при хромосомных аберрациях, а также участок расщепления MLL-белка протеазой при его созревании. Внизу показан зрелый белок, состоящий из 2 половин (MLLN и MLLC фрагменты), которые соединены мотивами димеризации (FYRN и FYRC), образуя стабильный комплекс. Разноцветные кружки обозначают различные белки, которые взаимодействуют с MLL при формировании транскрипционных комплексов. Аббревиатуры: AT – AT-hooks (мотивы связывания с AT-богатыми участками ДНК); BD – bromodomain (узнавание ацетильных групп); CxxC – цинк-пальцевый мотив (связывание с неметилированными CpG-участками промоторов); FYRN/C – FY rich N/C terminus (где F – фенилаланин, Y – тирозин); PHD – plant homeodomain (домен связывания с различными регуляторными «метками» на гистонах, например, с H3K4me3); SET – Su (var) 3-9, enchancer of zeste, trithorax (названиедомен получил по 3 белкам, у которых впервые был обнаружен; обладает HMT-активностью); TAD – trans-activation domain (белок-белковые взаимодействия, например, с гистон-ацетилтрансферазой CBP/P300); (Б) Вверху – типичная структура гибридного белка, состоящего из N-концевой части MLL-белка и C-концевой части белка-партнера. Видно, что большая часть белок-взаимодействующих доменов в рекомбинантном MLL-белке заменяется последовательностями белка-партнера. Внизу – мутантный MLL-белок с частичной тандемной дупликацией (MLL-PTD), которая сопровождается дублированием участка с 3-го по 9-й экзон; (В) Диаграмма, показывающая результаты исследования частоты встречаемости различных хромосомных транслокаций, затрагивающих локус 11q23 [29]. Определенные типы транслокаций (в порядке уменьшения частоты встречаемости) у смешанных групп (дети и взрослые) больных ОЛЛ и ОМЛ распределились следующим образом (в скобках приведены другие распространенные названия генов-партнеров, жирным шрифтом выделена транслокация t(9;11), вошедшая в классификацию ВОЗ):
– ОЛЛ (6 транслокаций составили ~94 % всех случаев): t(4;11) – ген-партнер AFF1 (AF4); t(11;19) – MLLT1 (ENL1); t(9;11) – MLLT3 (AF9); t(10;11) – MLLT10 (AF10); t(6;11) – MLLT4 (AF6); t(1;11) – EPS15. Было выявлено еще 17 других уникальных транслокаций (17u), изних 4 транслокации являлись общими для ОЛЛ и ОМЛ (4s);
– ОМЛ (9 транслокаций составили ~80 % всех случаев): t(9,11) – MLLT3; t(10;11) – MLLT10; t(11;19) – ELL; t(6;11) – MLLT4; t(11;19) – MLLT1; t(11;17) – MLLT6 (AF17); t(1;11) – MLLT11 (AF1Q); t(X;11) – SEPT6; t(1;11) – EPS15. Еще 20 уникальных транслокаций (20u) и 4 общих (4s).
Рисунок адаптирован из работ M. Cosgrove & A. Patel [28] и R. Marschalek [29]

Онкогенные аберрации в локусе 11q23

Ген ***MLL*** (**m**yeloid/**l**ymphoid или **m**ixed **l**ineage **l**eukemia), расположенный в 11-й хромосоме (локус 11q23), участвует в огромном числе (более 60) реципрокных хромосомных транслокаций, в результате которых *MLL* образует химерные гены с разными генами-партнерами. Белок MLL является одним из ключевых факторов регулировки экспрессии большого числа генов, связанных с дифференцировкой клеток и контролем клеточного цикла. Важнейшими генами-мишенями MLL-регуляторных комплексов (которые относятся к Триторакс группе, см. лекцию №1, Приложение 4) являются гены, содержащие ДНК-последовательности так называемых «гомеобоксов» (**HOX**, **ho**meobo**x**). Гомеобоксы кодируют очень консервативные белковые ДНК-связывающиеся до-

мены (гомеодомены), присутствующие в группе факторов активации транскрипции (HOX-белках), которые регулируют эмбриональное развитие организма и дифференцировку стволовых клеток. То есть функционирование белка MLL напрямую связано с регуляцией этих важнейших клеточных процессов [25–27].

На рис. 3А представлена схема структурной организации MLL-белка, показывающая расположение основных функциональных доменов. Среди этих доменов есть ДНК-связывающие участки (A T, CxxC), домены, осуществляющие белок-белковые взаимодействия (PHD, T AD), домены с гистон-метилтрансферазной (SET) и ДНК-метилтрансферазной (домен в области CxxC мотивов) активностями. Крупный MLL-белок (состоит из почти 4 тыс. остатков аминокислот) содержит много функциональных доменов, что позволяет ему взаимодействовать с большим числом белков и выполнять функцию «платформы» (скэффолд белка), на которой собирается транскрипционный комплекс. Обладая гистон-метилтранс феразной (HMT) активностью, белок MLL играет важную роль в создании H3K4me3-меток (признак активного хроматина) в промоторных областях генов-мишеней, кроме того, он способен инициировать транскрипцию путем самостоятельного рекрутирования белков PIC комплекса [30] (см. лекцию № 1, Приложения 3 и 4).

Локус 11q23 (ген *MLL*) относится к так называемым «горячим точкам» рекомбинации ДНК. Кроме многочисленных хромосомных транслокаций, ген *MLL* или его участки могут претерпевать различные перестройки: делеции, инверсии, вставки фрагментов локуса 11q23 в другие хромосомы [29]. Несмотря на такую повышенную рекомбинационную активность, лишь очень небольшая часть образующихся производных *MLL*-генов (ΔMLL) обладает заметной онкогенной активностью. При острых лейкозах выявляются небольшие внутригенные аберрации, которые заключаются в дублировании нескольких первых экзонов гена *MLL* (рис. 3Б). Эта аномалия, которая получила название частичной тандемной дупликации (**PTD**, **p**artial **t**andem **d**uplication), не выявляется цитогенетическими методами и часто встречается при ОМЛ с нормальным кариотипом [31]. Такие дупликации в *MLL*-гене существенно крупнее (приблизительно в 100 раз) ITD-дупликаций в гене *FLT3* (см. главу II). Смысл таких отличий понятен — если в FL T3-рецепторе даже небольшое изменение в JM-домене приводит к дестабилизации ингибирующей конформации и онкогенному эффекту, то в случае MLL требуется масштабная «перекройка» белковой структуры, позволяющая существенно изменить свойства этого многофункционального белка. Такого рода пертурбации достигаются или путем добавления в структуру MLL-белка последовательностей, несущих дополнительный набор функциональных доменов (MLL-PTD), или путем удаления значительной (С-концевой) части белка и привнесения на ее место чужеродных последовательностей (хромосомные транслокации).

Перестройки в локусе 11q23 (ΔMLL+ лейкозы) выявляются в ~5% случаев ОЛЛ, в ~10% случаев ОМЛ и фактически во всех случаях лейкозов смешанного происхождения [25]. На рис. 3В показана диаграмма, иллюстрирующая частоту встречаемости различных вариантов хромосомных аберраций, затрагивающих *MLL*-ген, у больных ОЛЛ и ОМЛ [29]. Следует отметить, что количественное соотношение различных типов рекомбинаций в локусе 11q23 при ΔMLL+ лейкозах существенно отличается у детей и взрослых, с возрастом эти различия постепенно нивелируются [32–34]. Этот факт, вероятно, является причиной того, что данные по частоте встречаемости у детей различных вариантов геномных аберраций (причем, не только в локусе 11q23) могут различаться в зависимости от того, дети какого возраста превалировали в исследовании. Например, в большинстве случаев В-клеточный ОЛЛ у младенцев (возраст до 1 года) относится к ΔMLL+ лейкозам, где основным типом хромосомной транслокации является t(4;11)(q21;q23) с образованием химерного гена *MLL-AFF1 (MLL-AF4)*. При ΔMLL+ ОЛЛ у детей старшего возраста с этой аберрацией начинают серьезно «конкурировать» t(11;19)(q23;p13.3)/*MLL-MLLT1 (MLL-ENL1)* и t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3 (MLL-AF9)*. Интересно, что у взрослых пациентов с ΔMLL+ ОЛЛ доминирующей транслокацией опять становится t(4;11)(q21;q23) [25, 34]. Считается, что все острые лейкозы с аберрациями в локусе 11q23 имеют неблагоприятный прогноз. Различные варианты прогноза, от «промежуточного» к «плохому», и даже «очень плохому», ассоциированы с конкретными типами хромосомных аберраций. Однако некоторые транслокации, например, t(1;11)(q21;q23)/*MLL-MLLT11 (MLL-AF1q)*, связаны с благоприятным течением болезни и хорошим ответом на терапию [35]. Поэтому стратификация ΔMLL+ лейкозов на различные диагностические варианты является важным моментом в определении эффективной терапии этого заболевания. Единственная 11q23-аберрация, включенная в классификацию ВОЗ (см. таблицу), не имеет никаких исключительных особенностей (типа повышенной агрессивности или хорошего прогноза), кроме ее широкой распространенности при острых лейкозах.

Гены-партнеры *MLL* по транслокации кодируют различные белки, которые привносят в гибридный белок большое число разнообразных доменов, оказывающих влияние на онкогенный потенциал химерных генов. По локализации в клетке кодиру емых белков гены-партнеры *MLL* подразделяют на «цитоплазматические» и «ядерные». Цитоплазматические гены-партнеры кодируют белки с различными функциями: белки, участвующие в эндоцитозе (EPS15), белки-медиаторы сигнальной трансдукции (AF6) и даже проапоптозные белки митохондрий (AF1Q). Ядерные гены-партнеры кодируют белки цитоскелета ядра (SEPT6), гистон-ацетилтрансферазы (CBP/P300), но наиболее часто онкогенные гибридные MLL-белки содержат на С-конце фрагменты

белков, которые являются активаторами транскрипции или контролируют элонгацию (непрерывность синтеза мРНК) транскрипции (AF4, AF5, AF9, AF10, AF17, ELL и ENL) [26, 30, 36]. Учитывая такое разнообразие гибридных MLL-белков, можно предположить, что существует много механизмов, с помощью которых они реализуют свой онкогенный потенциал. Это могут быть механизмы, которые придают лейкозным клеткам свойства, характерные как для онкогенных мутаций класса II (блок дифференцировки и самоподдержание клеток), так и для мутаций класса I (увеличение пролиферативного потенциала и жизнеспособности клеток). Все эти механизмы так или иначе связаны с нарушением регуляции транскрипции генов-мишеней MLL-белка. Нарушения генной экспрессии могут быть опосредованы, например, изменениями модификации гистонов, такими как отсутствие или нестабильность специфичных «меток» активного хроматина (H3K4me), вносимых SET-доменом MLL-белка — доменом, который отсутствует во всех рекомбинантных MLL-белках (см. рис. 3Б). Подобные или отличные эпигенетические изменения в генах-мишенях могут провоцироваться гистон- или ДНК-модифицирующими доменами белков-партнеров MLL. N-концевая MLL-составляющая гибридных белков, которая содержит ДНК-связывающие участки (AT и CxxC), выполняет, вероятно, только одну важную функцию — нацеливает онкогенные белки на гены-мишени интактного MLL-белка.

Анализ индивидуальных гибридных MLL-белков показал, что в основе их онкогенной активности могут лежать как минимум 2 типа механизмов — изменение трансактивации и димеризация. Считается, что присутствие цитоплазматической составляющей в гибридных MLL-белках может приводить к принудительной димеризации N-концевых областей MLL-белка (своеобразный вариант MLL-PTD, см. рис. 3А), что вызывает модуляцию экспрессии генов-мишеней [36]. Учитывая, что среди ядерных белков-партнеров MLL много компонентов комплексов активации (репрессии) транскрипции, то это может приводить к сборке на генах-мишенях MLL-модифицированных транскрипционных комплексов, осуществляющих атипичную генную экспрессию [30, 36]. Наличие белков-партнеров, имеющих собственные ДНК-связывающие домены, позволяет предположить возможность участия в онкогенном процессе так называемых реципрокных белков, продуктов экспрессии с реципрокных химерных генов (см. Приложение). Для транслокации t(4;11)(q21;q23) было показано, что не только MLL-AFF1-белок, который синтезируется на 11q+-хромосоме, но и реципрокный AFF1-MLL-белок (4q–) обладают онкогенной активностью. Причем совместная экспрессия этих белков взаимно дополняет их онкогенный потенциал (эффект комплементарности, как у мутаций класса I и II), приводя к заметному увеличению пролиферации и выживаемости лейкозных клеток [29].

Сегодня предпринимаются первые попытки понять, как работают разнообразные гибридные MLL-белки, как в зависимости от природы белка-партнера изменяется работа сложных транскрипционных комплексов, собранных на их основе [26, 28–30, 36]. Эти механизмы необходимо понять, чтобы появилась возможность проектировать препараты, нацеленные на патогенные MLL-белки.

В следующей лекции будут рассмотрены молекулярные механизмы рекуррентных генетических аберраций, характерных для гематологических опухолей лимфоидного происхождения.

Литература

1. Vardiman J., Thiele J., Arber D. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009;114:937–51.
2. Tefferi A., Gilliland G. Oncogenes in myeloproliferative disorders. Cell Cycle 2007;6:550–66.
3. Noble M., Endicott J., Johnson L. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. Science 2004;303:1800–5.
4. Lemmon M., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2010;141:1117–34.
5. Toffalini F., Demoulin J.B. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. Blood 2010;116:2429–37.
6. Jura N., Zhang X., Endres N. et al. Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. Mol Cell 2011;42:9–22.
7. Taylor S., Kornev A. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. Trends Biochem Sci 2011;36:65–77.
8. Matsumura I., Mizuki M., Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. Cancer Sci 2008;99:479–85.
9. Griffith J., Black J., Faerman C. et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. Mol Cell 2004;13:169–78.
10. Hubbard S. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:464–71.
11. Reindl C., Spiekermann K. From kinases to cancer. Leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. Cell Cycle 2006;5:599–602.
12. Jatiani1 S., Baker S., Silverman L., Reddy P. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. Genes Cancer 2010;1:979–93.
13. Chalandon Y., Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. Haematologica 2005;90:949–68.
14. Krause D., van Etten R. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. New Engl J Med 2005;353:172–87.
15. Bain B. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1. Haematologica 2010;95:696–8.
16. Gotlib J., Cools J. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFRA: what we have learned about the fusion and other

molecularly defined eosinophilias. Leukemia 2008;22:1999–2010.
17. Schwartz R. A molecular star in the wars against cancer. New Engl J Med 2002;347:462–3.
18. Curtis C., Grand F., Musto P. et al. Two novel imatinib-responsive PDGFRA fusion genes in chronic eosinophilic leukaemia. Brit J Haematology 2007;138:77–81.
19. Eswaran J., Knapp S. Insights into protein kinase regulation and inhibition by large scale structural comparison. Biochim Biophys Acta 2010;1804:429–32.
20. Sugimoto Y., Muramatsu H., Makishima H. et al. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. Brit J Haematol 2010;150:83–7.
21. Chan R., Feng G.S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. Blood 2007;109:862–7.
22. Matozaki T., Murata Y., Saito Y. et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a protooncogene product that promotes Ras activation. Cancer Sci 2009;100:1786–93.
23. Ostman A., Hellberg C., Bohmer F. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:307–20.
24. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. Brit J Cancer 2006;94:179–83.
25. Krivtsov A., Armstrong S. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nat Rev Cancer 2007;7:823–33.
26. Slany R. The molecular biology of mixed lineage leukemia. Haematologica 2009;94:984–93.
27. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. FEBS J 2010;277:1822–31.
28. Cosgrove M., Patel A. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. FEBS J 2010;277:1832–42.
29. Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. Brit J Haematology 2011;152:141–54.
30. Mohan M., Lin C., Guest E., Shilatifard A. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. Nat Rev Cancer 2010;10:721–8.
31. Basecke J., Whelan J., Griesinger F., Bertrand F. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. Brit J Haematology 2006;135:438–49.
32. Greaves M. Childhood leukaemia. Molecular genetics provide exciting new insights into the pathogenesis of childhood leukaemia. Brit Med J 2002;324:283–7.
33. Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms and epidemiology. J Natl Cancer Inst Monographs 2008;39:87–90.
34. Meyer C., Kowarz E., Hofman J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia 2009;23:1490–9.
35. Balgobind B., Raimondi S., Harbott J. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. Blood 2009;114:2489–96.
36. Liu H., Cheng E., Hsieh J. MLL fusions. Pathways to leukemia. Cancer Biol & Therapy 2009;8:1204–11.
37. Frohling S., Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. New Engl J Med 2008;359:722–34

Информационное сообщение о проведении VII Российского симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» и II межрегионального совещания Национального общества детских гематологов и онкологов (НОДГО)

Д.Ю. Качанов
Российский государственный медицинский университет, Москва

VII Russian Symposium "Biological basis for the therapy of oncological and hematological diseases" and II Interregional Meeting of the National Society of Pediatric Hematology and Oncology

D.Yu. Kachanov
Russian State Medical University, Moscow

С 1 по 4 июня 2011 г . в Москве были проведены II межрегиональное совещание Национального общества детских гематологов и онкологов (НОДГО) России и VII Российский симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний». Кроме того, в рамках конференции состоялись мероприятия, посвященные 20-летию открытия Федерального на учно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России (ФГУ ФНКЦ ДГОИ).

НОДГО является профессиональным сообществом, объединяющим специалистов, работающих в сфере детской онкологии/гематологии. Общество было создано в 2010 г. В мае 2010 г. в Москве состоялось I межрегиональное совещание НОДГО, в котором приняли участие гематологи и онкологи из 62 регионов России, стран СНГ и дальнего зарубежья. В рамках II совещания были награждены победители совместной премии Н ОДГО и благотворительного фонда «Подари жизнь» З А ВЕРНОСТЬ ПРОФЕССИИ. В 2011 г . лауреатами премии стали: профессор М.Б. Белогурова (Санкт-Петербург), Л.М. Минкина (Владивосток), Н.Б. Юдина (Воронеж). Их кандидатуры были выдвинуты членами НОДГО и по их единодушному мнению награждены именно эти специалисты. В разных у словиях, на разных должностях, работая с различными контингентами больных, лауреаты трудились эффективно, беззаветно и преданно.

Симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» был проведен уже в 7-й раз. Программа симпозиума традиционно включала доклады, посвященные как фундаментальным исследованиям в области онкологии и гематологии, так и клиническим исследованиям.

Следует отметить, что настоящая конференция была уникальной с нескольких точек зрения. Впервые в истории детской гематологии и онкологии в России в работе конференции помимо специалистов из России и стран СНГ приняли участие более 40 ведущих мировых экспертов, руководителей национальных и международных исследовательских групп, работающих в области детской гематологии и онкологии, из Германии, США, Японии, Нидерландов, Италии, Австрии и Израиля.

Научная программа конференции включала в себя как научные, так и образовательные сессии, при этом основной акцент был сделан на образовательную программу. Открыл конференцию научный симпозиум, посвященный контролю инфекций в детской онко логии и гематологии. В докладах были представлены современные принципы терапии грибковых и бактериальных инфекций (B. de Paw, Нидерланды; А.А. Масчан, Россия; Г.А. Клясова, Россия), рассмотрены особенности терапии грибковых инфекций у детей (A. Gross, Германия), методы визуализации инвазивных грибковых инфекций (М.М. Дубровин, Россия).

В рамках научного симпозиума, посвященного актуальным вопросам детской гематологии и онкологии, были рассмотрены вопросы использования внутривенных иммуноглобулинов при онкологических и гематологических заболеваниях (А.И. Карачунский, Россия). Интересен доклад Н.С. Сметаниной (Россия), в котором обсуждены подходы к хелаторной терапии у пациентов с различными гематологическими и онкологическими заболеваниями. В докладе С.Р. Варфоломеевой (Россия) была подчеркнута важная роль нутритивной поддержки онкологических больных, особый акцент был сделан на энтеральном питании на всех этапах терапии.

Образовательная программа конференции была разделена на разделы, посвященные солидным опухолям и онкогематологическим заболеваниям.

В рамках образовательной программы «Солидные опухоли» директор Немецкого детского канцер-регистра P. Kaatsch (Германия) представил данные об эпидемиологии злокачественных новообразований (ЗН) у детей и подростков. На примере Немецкого детского канцер-регистра было показано, что канцер-регистры занимают центральное место в координации любых противораковых мероприятий и являются неотъемлемой частью программ популяционного контроля ЗН. S. Rutkowski и R. Kortmann (Германия) в своих докладах осветили современные принципы терапии одной из наиболее проблемных с точки зрения диагностики и лечения групп ЗН у детей — опухолей центральной нервной системы. Особое место было отведено роли хирургии в лечении ЗН у детей. K. Lohse (Германия) в своем выступлении подчерк нула, что успешное лечение солидных опухолей возможно только при реализации междисциплинарного подхода в терапии с включением в процесс детского онколога, хирурга, рентгенолога, радиолога, пато морфолога. Руководитель немецкой группы по изучению нейробластомы F. Berthold (Германия) остановился в своем докладе на хирургическом лечении, под черкнув важность радикальных хирургических вмешательств у детей с опухолями, имеющими ампли фикацию гена *MYCN*. Один из ведущих экспертов в области изучения нейробластомы в мире, директор онкологического центра г. Чиба (Япония) A. Nakagawara показал последние данные, позволяющие приоткрыть завесу тайны одного из интереснейших феноменов детской онкологии — спонтанной регрессии нейрогенных опухолей. Успехи молекулярной биологии позволили выделить несколько ключевых регуляторных генов, ответственных за реализацию спонтанной регрессии. Молекулярно-генетическим изменениям при ЗН детского возраста было посвящено и выступление R. Ribeiro (США). Обсуждая роль гена *p53* в канцерогенезе, автор подчеркнул важность генетического консультирования при ряде солидных опухолей детского возраста.

Особое место было отведено обсуждению принципов таргетной терапии онкологических заболеваний у детей. C. Rodriguez-Galindo (США) осветил основные направления использования моноклональных антител в терапии солидных опухолей. S. Burdach (Г ермания) в своем выступлении остановился на принципах адоптивной иммунотерапии пациентов с диссеминированной формой саркомы Юинга. M. Minkov (Австрия) представил современные принципы терапии гистиоцитозов и дизайн нового международного протокола лечения гистиоцитоза из клеток Лангерганса у детей.

Образовательная сессия «Лечение лейкозов» включала доклады ведущих экспертов в области педиатрической лейкозологии. M. Schrappe (Г ермания), являющийся руководителем немецкой группы Berlin—Frankfurt—Münster (BFM) по лечению острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей, представил современную стратегию терапии ОЛЛ. G. Henze (Германия) обобщил 20-летний российский опыт лечения детей с ОЛЛ по протоколам Москва–Берлин (МВ). R. Ribeiro (США) и U. Creutzig (Германия) в своих выступлениях представили новейшие тенденции в лечении острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) у детей, основанные на опыте госпиталя Св. Иуды (Мемфис, США) и немецкой группы BFM. Особое внимание было уделено терапевтическим подходам у больных с рефрактерными лейкозами (A. von Stackelberg, Германия) и роли трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в улучшении резуль татов терапии у детей с различными видами лейкозов (T. Klingebiel, Германия).

В рамках образовательной сессии «Фармакология и молекулярная гематология» были освещены механизмы внутриклеточной передачи сигнала в клетках (Е.В. Владимирская, Израиль), рассмотрена роль гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в гемопоэзе (K. Welte, Германия). J. Boos (Германия) в своем докладе представил опыт группы BFM по изучению фармакокинетики и фаркакодинамики препарата L-аспарагиназа у больных с ОЛЛ. Президент Американского общества детских гематологов/онкологов J. Lipton (США) в своем выступлении рассказал о патогенезе анемии Блекфена–Даймонда и риске развития ЗН при данном заболевании.

Отдельное заседание было посвящено празднованию 20-летия создания ФГУ ФНКЦ ДГ ОИ. Торжественное заседание открыл директор Центра А.Г. Румянцев. В своем выступлении он подчеркнул, что одним из главных итогов работы Центра стало внедрение в практику детской онкологии и гематологии идеологии мультицентровых исследований и кооперативной работы. С поздравительной речью выступили Президент Германского общества детских онкологов и гематологов T . Klingebiel, президент Международного общества детских онкологов в Азии A. Nakagawara, директор отдела лейкозов/лимфом в госпитале Св. Иуды (Мемфис, США) R. Ribeiro, профессор G. Henze (Германия) и президент Германского благотворительного общества помощи детям, больным раком, F. Pleitgen.

Отдельные сессии были посвящены новым технологиям в диагностике и лечении онкологических заболеваний. В сессии «Биотехнологии в онкологии» были представлены современные возможности использования нанотехнологий в онкологии (В.П. Чехонин) и методов клеточной и генной терапии в регуляции ангиогенеза (В.А. Ткачук).

В сессии «Ядерная медицина» докладчики рассказали о принципах и подходах к молекулярной неинвазивной визуализации ЗН (М.М. Дубровин, Россия), значении позитронно-эмиссионной томографии и компьютерной томографии для проведения виртуальной бронхоскопии и колоноскопии (A. Nikanoro v, США), применении ген-репортерных систем как основе молекулярной визуализации (Ю.Н. Ликарь, Россия)

Большой интерес со стороны аудитории вызвали образовательные сессии, проходившие в 3-й день конференции. В сессии «Солидные опухоли» руководители международных протоколов по лечению ЗН у детей представили современные подходы к терапии нефробластомы (N. Graf, Германия), первичных злокачественных опухолей костей (S. Bielack, Германия), саркомы мягких тканей (E. Konscielniak, Германия), ретинобластомы (C. Rodriguez-Galindo) и герминогенных опухолей (U. Gobel, Германия). D. Harms (Германия) на основании опыта Кильского регистра опухолей у детей озвучил проблему дифференциальной диагностики опухолей мягких тканей детского возраста. H. Pape (Германия) в своем докладе продемонстрировала современные методики проведения лучевой терапии у детей.

В образовательной сессии «ТГСК и клеточная терапия» R. Handgretinger (Германия) посвятил свое выступление проблеме гаплоидентичной ТГСК. Была показана эффективность данного вида ТГСК при различных видах онкогематологических заболеваний. Кроме того, автор представил результаты исследования применения гаплоидентичной ТГКС у больных с солидными опухолями. I. Resnick (Израиль) представил опыт применения мезенхимальных стволовых клеток в различных клинических ситуациях. E. Dubrovina (США) подробно остановилась на исследованиях адоптивной иммунотерапии в контроле вирусных инфекций у реципиентов ТГСК, в частности при развитии инфекций, вызванных вирусом Эпштейна–Барр.

Отдельный симпозиум был посвящен проблемам гемостаза и коагулопатий при ЗН и гематологических заболеваниях. Ведущие российские и зарубежные эксперты детально осветили различные аспекты нарушений гемостаза, включая лечение тромбозов (В.В. Птушкин), ДВС-синдрома (А.П. Момот), ингибиторной формы гемофилии (П.В. Свирин).

В ходе симпозиумов «Молекулярные основы диагностики и лечения гематологических/онкологических заболеваний» и «Клеточная терапия» были представлены работы российских исследователей, посвященные различным аспектам указанных проблем. Так, А.Е. Друй в своем докладе продемонстрировал эффективность использования молекулярных маркеров для оценки поражения костного мозга у больных с опухолями семейства саркомы Юинга. В нескольких выступлениях были отражены современные взгляды на свойства стволовых клеток человека и их применение в клинической практике.

На симпозиуме «Новые технологии в гематологии/онкологии» были рассмотрены различные технологии диагностики и лечения ЗН. Г.А. Цаур (Россия) на основании данных протокола MLL-Baby показал прогностическую значимость определения минимальной остаточной болезни путем выявления химерных транскриптов у детей первого года жизни с ОЛЛ. В докладе Г.Я. Цейтлина были показаны особенности метаболизма у детей с онкологическими заболеваниями, обосновывающие необходимость постоянного мониторинга энергопотребности детей в процессе лечения.

Четвертый день конференции был всецело отведен под рабочее совещание НОДГО. Одной из основных задач НОДГО как профессионального сообщества врачей является выработка единых стандартов диагностики и лечения онкологических и гематологических заболеваний у детей, соответствующих современным мировым тенденциям. В рамках состоявшейся конференции были рассмотрены вопросы стандартизации диагностики лейкозов у детей и нарушений гемостаза.

Одним из ключевых моментов встречи врачей стало совместное заседание НОДГО и Германского общества детской гематологии и онкологии. Вопросы, обсуждавшиеся на совещании, касались регламента работы детских онкологов, сформулирована позиция общества по вопросам профессиональной подготовки специалистов, работающих в области детской гематологии/онкологии. Не было оставлено без внимания и современное состояние нормативно-правовой базы, регламентирующей работу специалистов в области детской гематологии/онкологии. Общее мнение было выражено в письме к министру здравоохранения и социального развития России Т.А. Голиковой.

Таким образом, прошедшая конференция объединила врачей разных специальностей как из России и стран СНГ, так и из ведущих зарубежных стран, работающих в области детской гематологии и онкологии, еще раз продемонстрировав важность и необходимость обмена опытом и совместной работы с целью улучшения качества оказания медицинской помощи детям, страдающим тяжелыми заболеваниями. Организаторам и участникам конференции удалось сделать еще один шаг в направлении реализации девиза НОДГО «Общие усилия во благо детей!».

Одобренный в настоящее время в качестве препарата первой линии для лечения хронического миелоидного лейкоза в хронической фазе

СПРАЙСЕЛ®: дает высокую частоту подтвержденного полного цитогенетического ответа в ранние сроки с легко управляемым профилем безопасности*(1)

Обеспечивает более высокую эффективность по сравнению с иматинибом в дозе 400 мг 1 раз в сутки

EUSP-40003 12/10 729HQ109M167

* По сравнению с иматинибом в дозе 400 мг 1 раз в сутки.
(1) Kantarjian H. et al. N Engl J Med. 2010;362(24):2260–2270.
(2) СПРАЙСЕЛ® Инструкция по медицинскому применению препарата, Росздравнадзор, февраль 2011.

Спрайсел® показан для лечения взрослых больных с:(2)

- впервые выявленным хроническим миелолейкозом в хронической фазе;
- хроническим миелолейкозом в хронической фазе, фазе акселерации или фазе миелоидного или лимфоидного бластного криза при резистентности или непереносимости предыдущей терапии, включая иматиниб;
- острым лимфобластным лейкозом с положительной филадельфийской хромосомой при резистентности или непереносимости предыдущей терапии.

Bristol-Myers Squibb

SPRYCEL®
дазатиниб 20, 50, 70 мг таблетки

ТЕРАПИЯ ВЫСОКИХ ДОСТИЖЕНИЙ

Показания. *Неходжкинская лимфома:* Рецидивирующая или химиорезистентная 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. Рецидивирующая или иммунотолерантная хронический лимфолейкоз в комбинации с химиотерапией. *Ревматоидный артрит* (активная форма) у взрослых в комбинации с метотрексатом при недостаточности или неадекватном ответе на текущие режимы терапии, включающие один или более ингибиторов фактора некроза опухолей (ФНО-α). Безопасность и эффективность препарата у детей не установлены. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к ритуксимабу, любому компоненту препарата или к белкам мышей, 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 МабТера 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 (внутрь), через отдельный катетер. Нельзя вводить в/в болюсно или в виде в/в инъекции. **Дополнительная информация и инструкция 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