

СОДЕРЖАНИЕ

том 3 • номер 2 • апрель–июнь 2010

Биология гемобластозов

- Козэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой.....**105
Шушанов С. С., Марьина Л. Г., Черных Ю. Б., Какпакова Е. С.

- Сравнительный анализ кариотипа у пожилых пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом.....**114
Грицаев С. В., Мартынкевич И. С., Мартыненко Л. С., Москаленко М. В., Иванова М. П., Аксенова В. Ю., Цыбакова Н. Ю., Тиранова С. А., Потихонова Н. А., Абдулкадыров К. М.

Диагностика, клиника и терапия гемобластозов

- Позитронно-эмиссионная томография: уточнение стадии болезни при злокачественных лимфомах**119
Асланиди И. П., Мухортова О. В., Шурупова И. В., Деревянко Е. П., Катунина Т. А., Пивник А. В., Строяковский Д. Л.

- Клиническая оценка значения позитронно-эмиссионной томографии всего тела с ¹⁸F-ФДГ при злокачественных лимфомах (обзор литературы)**130
Ильин Н. В., Тлостанова М. С., Ходжибекова М. М., Костеников Н. А., Тютин Л. А., Виноградова Ю. Н., Иванова Е. И., Иванова А. А., Крицкая А. В.

- Лейкоз/лимфома Беркитта: клинические особенности, диагностические критерии, терапевтическая тактика**138
Барях Е. А., Кравченко С. К., Кременецкая А. М., Звонков Е. Е., Магомедова А. У., Обухова Т. Н., Попова Ю. Ю., Финк О. С., Клясова Г. А., Шулутко Е. М., Галстян Г. М., Капланская И. Б., Воробьев И. А., Воробьев А. И.

- Результаты дифференциальной диагностики и терапии первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы**144
Капланов К. Д., Матвеева И. В., Клиточенко Т. Ю., Трегубова Л. С., Голубева О. Е., Левина О. В., Шипаева А. Л., Васильева В. А., Калашникова О. Б.

- Молекулярный мониторинг у пациентов с хроническим миелолейкозом: корреляция с цитогенетическим ответом, прогностическое значение, оценка ответа на терапию**151
Аксенова Е. В., Крутов А. А., Солдатова И. Н., Челышева Е. Ю., Туркина А. Г., Хорошко Н. Д., Мисюрин А. В.

- Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза**160
Аксенова Е. В., Крутов А. А., Солдатова И. Н., Ахлынина Т. В., Лапшина Н. А., Мисюрин А. В.

- Современные возможности Карельского регистра неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток по поиску неродственных доноров для российских гематологических трансплантационных центров**166
Иоффе Ю. Г.

Письмо в редакцию

Ответ на письмо в редакцию. Организация мониторинга в интенсивной гематологии и отбор больных для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.....	170
Абдусаламов С. Н., Мелкова К. Н., Горбунова Н. В., Чернявская Т. З., Афанасенков А. А.	

Вопросы медицинской статистики

Анализ выживаемости или событийный анализ: типовые ошибки ретроспективного метода ...	176
Куликов С. М., Паровичникова Е. Н., Савченко В. Г.	

Онкологический семинар

Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья	184
Егоров Е. Е.	

Рефераты

Съезды, конференции, симпозиумы

Симпозиум по хроническому миелолейкозу (апрель 2010 г., Санкт-Петербург).....	203
Круглый стол «Кэмпас в лечении хронического лимфолейкоза: современная практика» (май 2010 г., Санкт-Петербург)	209

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

фундаментальные исследования и клиническая практика

ИЗДАТЕЛЬСТВО

практическая медицина

Адрес для корреспонденции

ООО ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ
«ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»
115516, Москва, а/я 20
тел.: +7(495) 324-9329
e-mail: medprint@mail.ru
www.medprint.ru

Шеф-редактор

Д.Д. Проценко, канд. мед. наук

Технический редактор

Т.А. Львова

Выпускающий редактор

Т.Е. Белоусова

Директор по производству

Д.Р. Сысоев
e-mail: tezey@obook.su

Отпечатано в типографии ООО «Стрит принт»

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

М. А. Волкова, д-р мед. наук, профессор
e-mail: volkova@orc.ru

Зам. главного редактора

Д. Ш. Османов, д-р мед. наук, профессор

Редакционная коллегия

Е. А. Демина, д-р мед. наук

Е. В. Домрачева, д-р мед. наук, профессор

Н. В. Ильин, д-р мед. наук, профессор

Б. П. Копнин, д-р мед. наук, профессор

А. И. Павловская, канд. мед. наук

А. В. Попа, д-р мед. наук

Г. С. Тумян, д-р мед. наук

М. А. Френкель, д-р мед. наук, профессор

Ю. М. Кучма, канд. мед. наук

Ответственный секретарь

А. Д. Ширин, канд. мед. наук
e-mail: shirin-anton@mail.ru

Тираж 2000 экз.
ISSN 1997-6933

Журнал зарегистрирован в Федеральной
службе по надзору в сфере связи, инфор-
мационных технологий и массовых ком-
муникаций (Роскомнадзор)
ПИ №ФС77-40211 от 10.06.2010 г.

Журнал распространяется среди специалистов **бесплатно**.

Оформить подписку можно на интернет-сайте издательства

www.medprint.ru

Для библиотек, в том числе зарубежных, возможна подписка также
и на микрофильмовую копию (визуальная микрофиша)



Будьте в курсе

Начиная с 2007 года в России успешно издается русский вариант *Journal of Clinical Oncology* (под ред. профессора С.А.Тюляндина). Для онкологов всего мира это наиболее авторитетное издание, на страницах которого публикуются самые новые и важные исследования, выполненные во всех разделах онкологии, начиная с диагностики и кончая паллиативным лечением. Одновременно журнал публикует свежие обзоры по наиболее актуальным вопросам современной онкологической науки и последние рекомендации ASCO (Американское общество клинической онкологии) по диагностике и лечению различных онкологических заболеваний. Авторами журнала являются международно признанные специалисты в различных областях диагностики и лечения злокачественных опухолей.

Journal of Clinical Oncology на английском языке выходит 36 раз в год без учета приложений. Русский вариант журнала выходит 4 раза в год и включает наиболее интересные и актуальные для российского читателя материалы.

Основная задача издания — информировать российских онкологов о современных методах диагностики и лечения злокачественных опухолей, новых лекарственных препаратах. Среди специалистов журнал распространяется бесплатно.

Русское издание *Journal of Clinical Oncology* — ваш гид в постоянно меняющемся мире онкологии. Этот журнал должен стать обязательным атрибутом свежей и клинически важной информации для каждого российского онколога.



Для получения журнала
необходимо заполнить анкету на сайте издательства
«ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»:
www.medprint.ru.

Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой

С. С. Шушанов¹, Л. Г. Марьяна¹, Ю. Б. Черных², Е. С. Какпакова¹

IGF/insulin and MDR system gene co-expression in multiple myeloma patients

S. S. Shushanov¹, L. G. Maryina¹, U. B. Chernych², E. S. Kakpakova¹

SUMMARY

The expression of two mRNA isoforms of Insulin-Like Growth Factor type-1, *IGF-1A* and *IGF-1B*, and mRNA of their receptors *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B* was compared with the mRNA expression of genes responsible for multidrug resistance (MDR), namely *MDR1*, *LRP*, *MRP1*, *BCRP* in bone marrow aspirates of 19 patients with multiple myeloma. We have found that mRNA of MDR genes except for *LRP* is expressed in all of MM specimens. The incidence of mRNA expression of genes in IGF/insulin system has varied from 21 to 68% of specimens. Approximately 80% of samples obtained from the same MM patients have shown the co-expression of both *IGF-1A* and *IGF-1B* mRNA isoforms.

mRNA isoforms of *IGF-1* gene (*IGF-1A* and *IGF-1B*) have been expressed mainly in the specimens showing mRNA hyperexpression of *MDR1* and *LRP*; moreover, the co-expression between two mRNA isoforms of *IGF-1* and mRNA of *MDR1* was 90% and that between two mRNA isoforms of *IGF-1* and mRNA of *LRP* — 8,5%.

Keywords

multiple myeloma (MM), multidrug resistance (MDR), Insulin-Like Growth Factor type-1 (IGF-1), receptor.

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

² M. F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute

Контакты: sainHershy@yandex.ru

Принято в печать: 4 мая 2010 г.

РЕФЕРАТ

В аспиратах костного мозга, полученных у 19 больных множественной миеломой (ММ), была сопоставлена экспрессия двух изоформ мРНК гена инсулиноподобного фактора роста 1-го типа *IGF-1A* и *IGF-1B* и мРНК генов рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1-го типа *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B* с экспрессией мРНК генов, ответственных за множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) *MDR1*, *MRP1*, *LRP*, *BCRP*. мРНК генов МЛУ, за исключением *LRP*, экспрессировались у всех исследуемых больных ММ. Экспрессия мРНК генов системы IGF/инсулин различна и составила 21–68%. В 80% случаев у одних и тех же больных ММ наблюдается коэкспрессия изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*.

Изоформы мРНК гена *IGF-1* (*IGF-1A* и *IGF-1B*) в подавляющем большинстве случаев экспрессировались в тех же образцах, в которых гиперэкспрессировались мРНК *MDR1* и *LRP*, причем степень коэкспрессии изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1* составила 90%, а изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *LRP* — 8,5%.

Ключевые слова

множественная миелома (ММ), множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), инсулиноподобный фактор роста 1-го типа (IGF-1), рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) — это лимфопролиферативное заболевание, морфологическим субстратом которого служат плазматические клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин. Одним из злокачественных свойств клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге, где они пролиферируют и секретируют моноклональный иммуноглобулин (М-белок), а также активируют остеокласты, которые разрушают костную ткань [1, 2]. Длительность жизни больных в основном зависит от чувствительности к лечению противоопухолевыми препаратами, среди которых алкилирующие соединения (мелфалан, циклофосфамид, хлорбутин и др.), доксорубин,

бортезомиб (Велкейд) [3]. Со временем у многих больных ММ развивается устойчивость к самым разным химиопрепаратам, различающимся и по химической структуре, и по механизму действия. Иными словами, возникает множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) [4, 5]. Один из хорошо охарактеризованных на сегодняшний день молекулярных механизмов МЛУ опухолей человека — повышенная активность Р-гликопротеида (Pgp), кодируемого геном *MDR1*. Pgp, используя энергию АТФ, транспортирует группу различающихся по структуре веществ из цитозоля и/или из плазматической мембраны во внеклеточное пространство [4, 5]. Предварительные исследования показали, что у нелеченных больных ММ экспрессия Pgp обнаруживается только в 1–2% образ-

¹ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

² МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва

цов аспирата костного мозга, тогда как у леченных больных, у которых возник рецидив и они стали нечувствительными к химиопрепаратам, — в 40–80 % случаев [6].

Наряду с Pgp в МЛУ вовлечены и другие известные на сегодняшний день белки: АТФ-зависимые транспортеры MRP1, BCRP, а также белок LRP [4, 5, 7].

Несмотря на то что сегодня созданы различные классы ингибиторов, которые в основном являются конкурентами субстратов перечисленных выше белков-транспортеров, их действие в преодолении МЛУ пока недостаточно эффективно и в некоторых случаях такие ингибиторы вызывают серьезные побочные эффекты [7]. Поэтому наряду с дальнейшим совершенствованием уже имеющихся ингибиторов требуется поиск новых классов и типов ингибиторов МЛУ, которые были бы, с одной стороны, более эффективными, а с другой — универсальными для всех белков-транспортеров и не имели бы побочных эффектов. Вместе с тем необходимо параллельно проводить фундаментальные исследования молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активации самих белков МЛУ. Учитывая, что имеется несколько видов белков-транспортеров, не исключено, что они регулируются различным образом, и возможно, что в их регуляции участвуют межклеточные взаимодействия, различные факторы роста, их рецепторы и активируемые ими сигнальные пути, мишенями которых являются промоторные и другие регуляторные регионы генов, кодирующих белки-транспортеры, которые участвуют в возникновении МЛУ. Предварительные экспериментальные данные позволяют предположить, что лекарственная устойчивость клеток ММ может возникать при взаимодействии между В-клеточным опухолевым клоном и микроокружением костного мозга, которое состоит из внеклеточного матрикса, клеток стромы и других клеток. Показано, что взаимодействие клеток ММ с клетками стромы костного мозга активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и ростовых факторов, в т. ч. и инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF-1), который, как было установлено, не только усиливает рост, выживание и миграцию клеток ММ, но и имеет прямое отношение к возникновению резистентности к общепринятым химиопрепаратам [8, 9]. Также продемонстрировано, что клетки ММ, взаимодействуя с эндотелием кровеносных сосудов, окружающих костный мозг, экспрессируют на своей поверхности рецептор IGF-1 (IGF-1R), который является рецепторной тирозинкиназой [8]. В экспериментах *in vitro* выявлено, что IGF-1R-зависимая активация PI3K-сигнального пути стимулирует рост клеток ММ и защищает их от апоптоза, индуцированного бессывороточной средой и дексаметазоном [10, 11]. В недавней работе P. Maiso и соавт. также показали, что ингибирование тирозинкиназной активности IGF-1R усиливало действие леналидомида, дексаметазона, мелфалана и бортезомиба, а использование ингибитора тирозинкиназной активности IGF-1R совместно с дексаметазоном и бортезомибом заметно подавляло рост клеток ММ *in vitro* [12]. Кроме ингибирования апоптоза известно и другое важное защитное свойство IGF-1. Было показано, что в клетках рака толстой кишки линии MCLM и в Т-лимфобластных клетках линии человека CCRF-CEM IGF-1 индуцировал экспрессию гена *MDR1* и значительно ингибировал гибель клеток от цитостатиков [13, 14].

Роль IGF-1 и его рецепторов в регуляции экспрессии *MDR1* и других генов, ответственных за МЛУ при ММ, на сегодня не вполне ясна, поэтому в данной работе мы поставили перед собой цель: оценить степень корреляции между активностью генов, принадлежащих к двум важным защитным системам клетки — МЛУ и IGF, — у леченных больных ММ. В работе исследовалась экспрессия мРНК генов

системы IGF (двух изоформ *IGF-1A* и *IGF-1B* и рецепторов *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B*), а также мРНК генов, ответственных за МЛУ (*MDR1*, *MRP1*, *BCRP* и *LRP*) в аспиратах костного мозга, полученных у больных ММ после лечения, затем экспериментальные данные, полученные по двум указанным выше системам, были сопоставлены.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовалась группа из 19 больных (10 мужчин и 9 женщин), у всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Возраст пациентов составлял от 52 до 78 лет. Диагноз ММ устанавливался на основании плазмоклеточной инфильтрации костного мозга, иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенологических данных. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе B. G. M. Durie и S. E. Salmon [15].

Иммунохимическая характеристика PIg (патологический иммуноглобулин) установила, что у 4 пациентов секретирувался PIg G каппа (Gκ), у 3 — PIg G лямбда (Gλ), у 5 — PIg Bj каппа (Bjκ), у 1 — PIg Bj A лямбда (Bj/Al), у 5 — PIg A каппа (Aκ), у 1 пациента была определена секретируемая PIg M каппа (Mκ).

Выделение РНК из клеток костного мозга и электрофорез

Для исследования экспрессии генов от больных получали костномозговой пунктат (аспират), из которого в дальнейшем выделяли РНК. С этой целью клетки костного мозга насливали на 3 мл Ficoll и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 30 мин, после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Далее отобранные клетки переносили в пробирку с 8 мл раствора Эрла и переосаждали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин и отмывали в 2–3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, Sigma, США). Процедуру выделения РНК выполняли согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле при напряжении 100 В в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомной РНК. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (фирма «Литех», Россия), 2 ммоль смеси dNTP (MBI Fermentas), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (MBI Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция — 42 °C, 50 мин; денатурация — 94 °C, 5 с. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую 1 мкл раствора кДНК, 20 пкмоль каждого из праймеров, 2 ммоль смеси dNTP (MBI Fermentas), 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas), 25 ммоль MgCl₂, 1 ед. Taq-ДНК полимеразы, H₂O до конечного объема 25 мкл, 30 мкл минерального масла. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 1. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схе-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров к исследуемым генам, размер продукта, температура отжига праймеров и количество циклов, используемых в ПЦР

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, пары оснований	Температура отжига праймера, °C
MDR1	MDR1-F	5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'	167	60
	MDR1-R	5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'		
MRP1	MRP1-F	5'-ATCAAGACCGCTGTCATTGG-3'	180	60
	MRP1-R	5'-GAGCAAGGATGACTTGCAAG-3'		
BCRP	BCRP-F	5'-TGCCCAAGGACTCAATGCAACAG-3'	172	60
	BCRP-R	5'-ACAATTCAGGTAGGCAATTGTG-3'		
LRP	LRP-F	5'-CCCCATACCATTATATCCATGTG-3'	405	60
	LRP-R	5'-TCGAAAAGCCACTGATCTCCTG-3'		
IR-A	IR-A-F	5'-AAGACGTTTGAGGATTACCTG-3'	112	60
	IR-A-R	5'-CTGCCACCGTGGGCACGGCCA-3'		
IR-B	IR-B-F	5'-AAGACGTTTGAGGATTACCTG-3'	148	60
	IR-B-R	5'-CTGCCACCGTGGGCACGGCCA-3'		
IGF-1A	IGF-1A-F	5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'	284	60
	IGF-1A-R	5'-TCTACTTGCCTTCTTCAAAT-3'		
IGF-1B	IGF-1B-F	5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'	431	60
	IGF-1B-R	5'-TTTGCTCTGCATTGAGCAT-3'		
IGF-1R	IGF-1R-F	5'-ACAGAGAACCCCAAGACTGAGG-3'	247	67
	IGF-1R-R	5'-TGATGTTGTAGGTGTCTGCGGC-3'		
GAPDH	GAPDH-F	5'-CCCCTGGCCCAAGGTCATCCATGACAACCTTT-3'	513	60
	GAPDH-R	5'-GGCCATGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA-3'		

ме: денатурация — 94 °C, 10 с; аннилинг — T_m , 10 с; синтез — 72 °C, 20 с. Значения температуры T_m и количество циклов ПЦР для каждого из генов приведены в табл. 1. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию *GAPDH*. Продукты ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размер фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, а их интенсивность — денситометрированием с использованием компьютерной программы Scion Image. Числовые значения, соответствующие величине экспрессии мРНК каждого из исследуемых генов, представлены как соотношения числового значения экспрессии мРНК каждого гена к числовому значению экспрессии мРНК гена *GAPDH*, который был использован в качестве внутреннего контроля. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prism. Достоверность различий определялась с использованием непараметрического статистического *t*-критерия, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе была исследована экспрессия мРНК генов системы IGF (двух изоформ мРНК инсулиноподобного фактора роста 1-го типа *IGF-1A* и *IGF-1B*, мРНК рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1-го типа *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B*) и экспрессия мРНК генов, ответственных за МЛУ, — *MDR1*, *MRP*, *LRP*, *BCRP* в мононуклеарной фракции клеток аспиратов костного мозга 19 больных ММ (см. рис. 1 и 2). На основании полученных данных с целью сопоставить коэкспрессию мРНК генов двух указанных систем были определены группы образцов с высокой и низкой степенью экспрессии мРНК генов МЛУ и была оценена степень экспрессии генов системы IGF/инсулин в этих группах соответственно.

Общая характеристика экспрессии генов МЛУ

Экспрессия мРНК *MDR1* была выявлена у 19/19 (100 %) больных ММ. У 8/19 (42 %) больных уровень экспрессии мРНК *MDR1* был низким (рис. 1, А; см. табл. 2, группа А), у 11/19 (58 %) больных — повышен в 2 раза и более (см. рис. 1, А; табл. 2, группа В). На рис. 1, Б представлены средние значения экспрессии мРНК гена *MDR1* в группах А и В. Разница в экспрессии мРНК *MDR1* в этих группах статистически значимая ($p = 0,0355$). В литературе представлены исследования, в которых также оценивали экспрессию мРНК *MDR1* у больных ММ. Так, например, в работе Н. Schwarzenbach и соавт. была выявлена экспрессия мРНК *MDR1* у 24/40 (60 %) ранее не леченных больных и у 18/28 (64 %) больных, которые получили соответствующий курс химиотерапии [16]. Интересен тот факт, что уровень экспрессии мРНК гена *MDR1* у леченных и нелеченных больных не отличался. Кроме того, в этой же работе выявлено, что мРНК *MDR1* экспрессировалась в 70 % контрольных образцов костного мозга, полученных от лиц с немиеломными поражениями костного мозга, и, что важно, ее экспрессия существенно не отличалась от таковой в образцах костного мозга у больных ММ [16]. В другом исследовании установлено, что высокий уровень экспрессии мРНК *MDR1* в плазматических клетках костного мозга у больных ММ может прогнозировать плохую чувствительность к химиотерапии [17]. В нашей работе мы выявили экспрессию мРНК *MDR1* во всех 19 образцах костного мозга, и несмотря на то что все больные ММ получили лечение, ее экспрессия была гетерогенной и отличалась внутри этой группы в 2 раза и более (см. табл. 2).

мРНК гена *LRP* была выявлена у 16/19 (84 %) больных и также обнаруживала заметное различие в экспрессии: у 7/19 (34 %) больных уровень экспрессии мРНК *LRP* низкий, у 9/19 (47 %) — повышен в 2 раза и более (см. рис. 1, А и табл. 3, группы С и D соответственно). В 3 случаях мРНК гена *LRP* не определялась. Средние значения экспрессии мРНК гена *LRP* в группах С и D представлены на рис. 1, В. Отличие в экспрессии мРНК в этих группах статистически значимое ($p = 0,0004$). По данным литературы, этот ген экспрессирован приблизительно у 50 % больных ММ

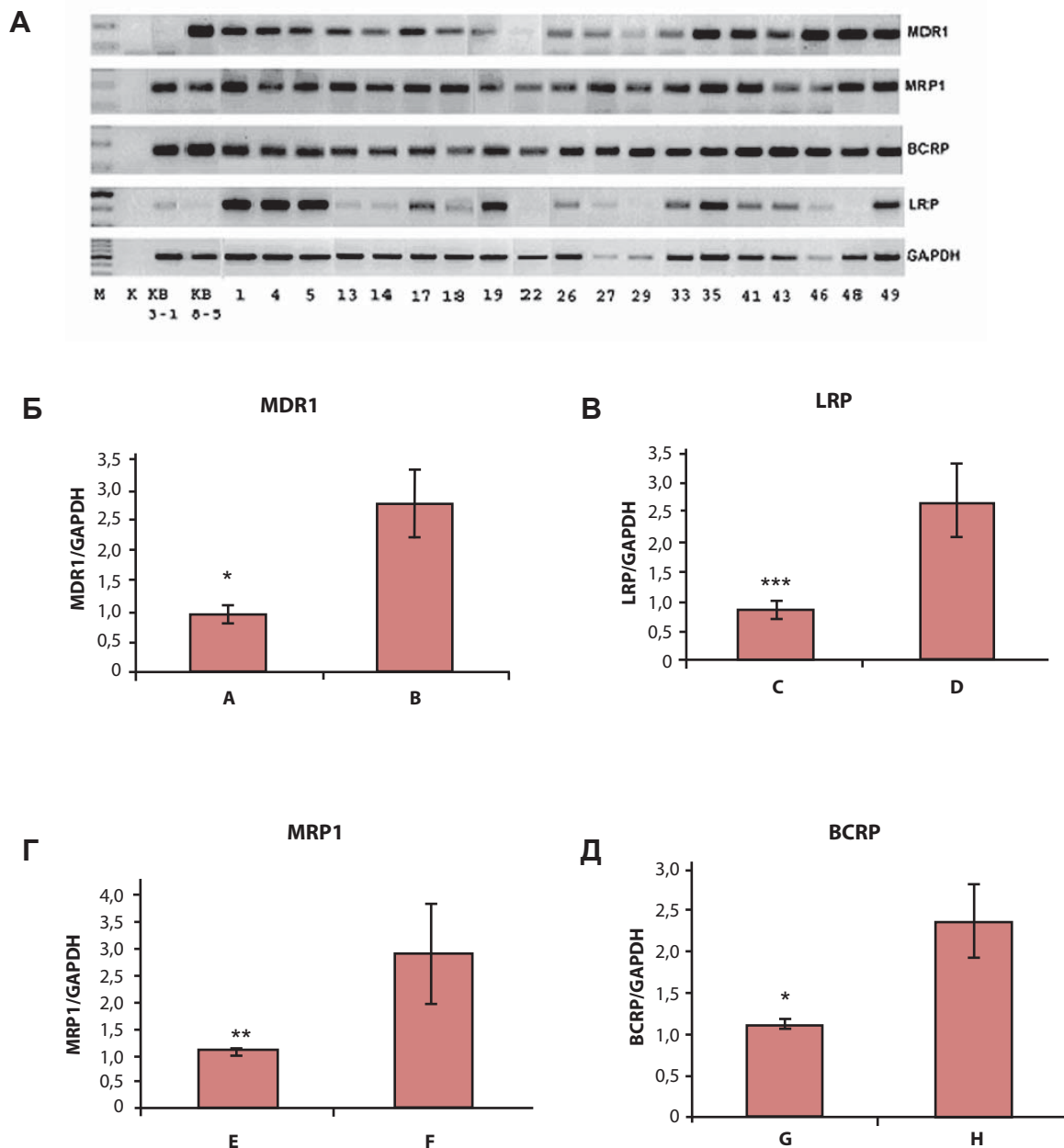


Рис. 1. (А) Гель-электрофорез, результаты ОТ-ПЦР. Экспрессия мРНК генов МЛУ (*MDR1*, *LRP*, *MRP1*, *BCRP*) в образцах костномозгового пунктата, полученных от леченных больных ММ. В качестве контроля были использованы клетки карциномы полости рта линии КВ 8-5, гиперэкспрессирующие мРНК гена *MDR1*, и клетки линии КВ 3-1, в которых мРНК гена *MDR1* не экспрессируется. (Б–Д) Среднее значение экспрессии мРНК генов *MDR1*, *LRP*, *MRP1*, *BCRP* в группах образцов костномозгового пунктата с низкой (А, С, Е, Г) и высокой (В, Д, F, H) степенью экспрессии мРНК указанных генов * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ — достоверность отличия между указанными группами.

и его экспрессия ассоциирована с плохим ответом на лечение больных мелфаланом и в целом более короткой продолжительностью жизни больных ММ [18]. Считается, что *LRP* может быть использован в качестве важного генетического маркера для предсказания слабого терапевтического ответа при ММ. Было показано, что *LRP* экспрессируется чаще у больных с делецией гена *p53* и при повышенной экспрессии *Pgp* [19]. Действительно, и в нашей работе показано, что в 11 исследованных образцах костного мозга, в которых в 2 раза и более повышена экспрессия мРНК *MDR1*, в 8 случаях также в 2 раза и более повышена экспрессия мРНК *LRP*. Предполагается, что *LRP* и *Pgp* имеют сходные опосредованные *p53* механизмы регуляции [19].

мРНК гена *MRP1* была выявлена у 19/19 (100 %) больных ММ. У 14/19 (74 %) больных уровень экспрессии мРНК *MRP1* был низким (см. рис. 1, А и табл. 4, группа Е), у 5/19 (26 %) — повышен в 2 раза и более (см. рис. 1, А и табл. 4, группа F). На рис. 1, Г представлены средние значения экспрессии мРНК гена *MRP1* в группах Е и F. Разница

в экспрессии мРНК в этих группах статистически значимая ($p = 0,0081$). Роль участия *MRP1* в возникновении МЛУ — факт установленный. *MRP1*, так же как и *Pgp*, является белком-транспортером и выбрасывает из клетки почти тот же круг субстратов, что и *Pgp*. Ранее было показано, что возникновение МЛУ у больных острым миелоидным лейкозом и хроническим лимфолейкозом наряду с гиперэкспрессией *Pgp* также связано с гиперэкспрессией *MRP1* [7]. В литературе представлены работы, в которых исследовалась экспрессия мРНК *MRP1* в образцах костного мозга больных ММ. В одной из работ было показано, что мРНК *MRP1* экспрессировалась у 15/58 (26 %) больных, причем у 10/31 (32 %) ранее не леченных пациентов и у 5/27 (18 %), которые получили соответствующий курс химиотерапии. Интересно, что уровень экспрессии мРНК гена *MRP1* у леченных и нелеченных больных не отличался. Кроме того, в этой же работе было выявлено, что мРНК *MRP1* экспрессировалась в 5/5 (100 %) контрольных образцов костного мозга, полученных у здоровых лиц, и, что важно, уровень ее экспрессии

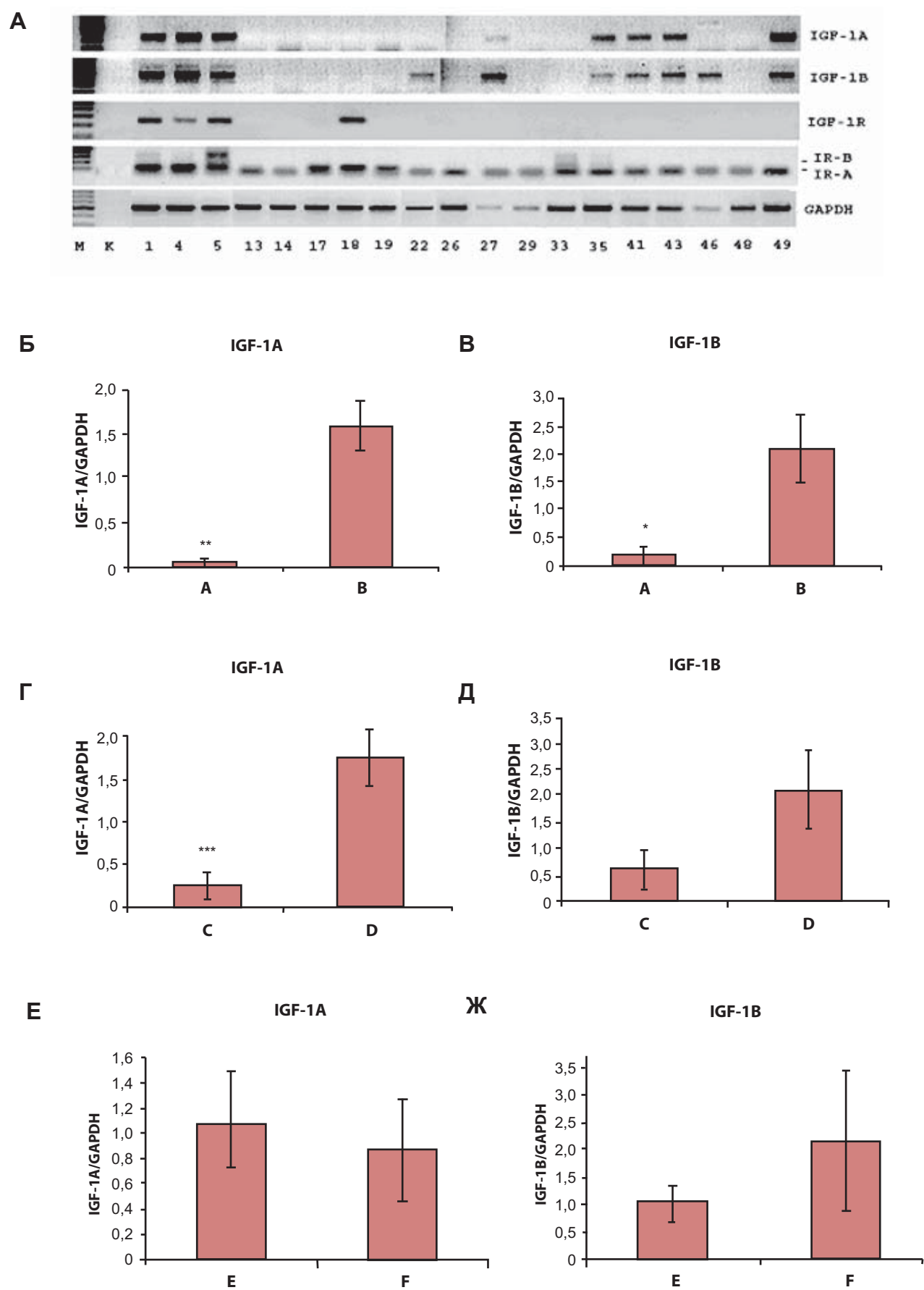


Рис. 2. (А) Гель-электрофорез, результаты ОТ-ПЦР. Экспрессия мРНК генов системы IGF/инсулин (*IGF-1A*, *IGF-1B*, *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B*) в образцах костномозгового пунктата, полученных у леченных больных ММ. (Б–Ж) Среднее значение экспрессии изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* в группах образцов костномозгового пунктата с низкой (А, С, Е, Г) и высокой (В, Д, F, H) степенью экспрессии мРНК указанных изоформ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ — достоверность отличия между указанными группами.

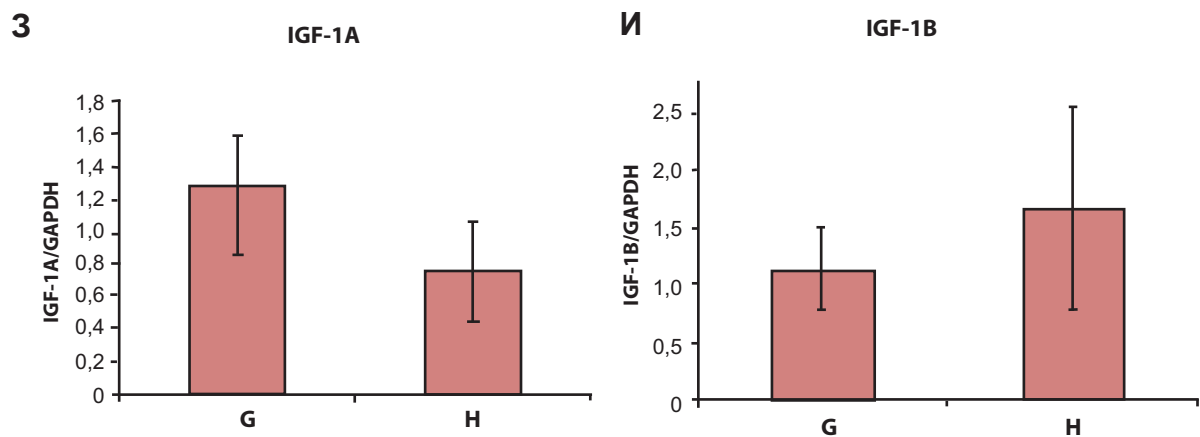


Рис. 2. Окончание

в некоторых случаях был даже выше, чем в образцах, полученных от больных ММ [16].

В работе К. Nooteг и соавт. выявили экспрессию мРНК *MRP1* у 12/12 (100 %) нелеченных и у 10/13 (77 %) леченных больных ММ [20]. Причем уровень ее экспрессии не превышал таковой в контрольных образцах, полученных от лиц с немиеломными поражениями костного мозга. Авторы объясняют это тем, что образцы, полученные от больных ММ, содержали небольшое количество злокачественных плазматических клеток, гиперэкспрессирующих на своей поверхности *MRP1*, и в таких образцах наряду со злокачественными клетками присутствовали и нормальные плазматические клетки, которые слабо экспрессировали *MRP1*. Вместе с тем возможно, что *MRP1* при ММ действительно не участвует в механизмах возникновения МЛУ, однако данные этих двух работ недостаточны, чтобы сделать окончательный вывод о роли *MRP1* в возникновении МЛУ при ММ. Поэтому исследования в этом направлении необходимо продолжить, как *in vitro* на линиях культур клеток ММ, так и *in vivo* с использованием новых, наиболее современных и точных методов, позволяющих сортировать и выделять чистую фракцию злокачествен-

ных плазматических клеток согласно их специфическим поверхностным маркерам. Что касается нашей работы, мы не ставили перед собой цели оценить взаимосвязь между той или иной схемой лечения и экспрессией мРНК гена *MRP1* у больных ММ. Несмотря на то что у всех пациентов была диагностирована ММ III стадии и все больные ММ получили лечение, тем не менее оказалось, что мРНК гена *MRP1* экспрессировалась гетерогенно. Нами были определены группы образцов с высокой (см. рис. 1 и табл. 4, группа F) и низкой (см. рис. 1 и табл. 4, группа E) степенью экспрессии мРНК гена *MRP1* и оценена степень коэкспрессии генов системы IGF/инсулин в этих группах.

мРНК гена *BCRP* была выявлена у 19/19 (100 %) больных ММ. У 11/19 (58 %) больных уровень экспрессии мРНК *BCRP* был низким (см. рис. 1, A и табл. 5, группа G), у 8/19 (42 %) — повышен в 2 раза и более (см. рис. 1, A и табл. 5, группа H). На рис. 1, D представлены средние значения экспрессии мРНК гена *BCRP* в группах G и H. Отличие в экспрессии мРНК в этих группах статистически значимое ($p = 0,0128$). В отношении гена *BCRP* литературные данные не дают точных цифр, однако известно, что его экс-

Таблица 2. Экспрессия мРНК IGF-1A и IGF-1B в группах образцов А и В				
Группы образцов	Образцы аспиратов костного мозга	MDR1	IGF-1A	IGF-1B
Группа В	MM27	++++	++	++++
	MM46	++++	+	+++
	MM48	+++	—	—
	MM4	++	+++	+++
	MM1	++	++	++
	MM5	++	++	++
	MM43	++	++	++
	MM49	++	++	+
	MM35	++	+	+
	MM41	++	+	+
	MM17	++	н/о	н/о
Группа А	MM18	+	—	—
	MM19	+	—	—
	MM26	+	—	—
	MM29	+	+/-	—
	MM33	+	—	—
	MM22	+/-	—	+
	MM13	+	н/о	н/о
	MM14	+	н/о	н/о

Примечание. А — группа образцов костномозгового пунктата со слабой экспрессией мРНК гена *MDR1*; В — группа образцов костномозгового пунктата с повышенной в 2 раза и более экспрессией мРНК гена *MDR1*. н/о — экспрессию изоформ не определяли.

Таблица 3. Экспрессия мРНК IGF-1A и IGF-1B в группах образцов С и D				
Группы образцов	Образцы аспиратов костного мозга	LRP	IGF-1A	IGF-1B
Группа D	MM4	++++	+++	+++
	MM1	++++	++	++
	MM5	++++	++	++
	MM19	+++	—	—
	MM27	++	++	++++
	MM43	++	++	++
	MM49	++	++	+
	MM35	++	+	+
	MM17	++	н/о	н/о
Группа С	MM46	+	+	+++
	MM41	+	+	+
	MM18	+	—	—
	MM26	+	—	—
	MM33	+	—	—
	MM22	—	—	+
	MM29	—	+/-	—
	MM48	—	—	—
	MM13	+/-	н/о	н/о
	MM14	+/-	н/о	н/о

Примечание. С — группа образцов костномозгового пунктата со слабой экспрессией мРНК гена *LRP*; D — группа образцов костномозгового пунктата с повышенной в 2 раза и более экспрессией мРНК гена *LRP*. н/о — экспрессию изоформ не определяли.

Таблица 4. Экспрессия мРНК IGF-1A и IGF-1B в группах образцов Е и F

Группы образцов	Образцы аспиратов костного мозга	MRP1	IGF-1A	IGF-1B
Группа F	MM27	++++	++	++++
	MM46	+++	+	+++
	MM48	++	—	—
	MM41	++	+	+
	MM29	++	+/-	—
Группа E	MM4	+	+++	+++
	MM1	+	++	++
	MM5	+	++	++
	MM43	+	++	++
	MM49	+	++	+
	MM35	+	+	+
	MM18	+	—	—
	MM19	+	—	—
	MM26	+	—	—
	MM33	+	—	—
	MM22	+	—	+
	MM13	+	н/о	н/о
	MM14	+	н/о	н/о
	MM17	+	н/о	н/о

Примечание. E — группа образцов костномозгового пунктата со слабой экспрессией мРНК гена *MRP1*; F — группа образцов костномозгового пунктата с повышенной в 2 раза и более экспрессией мРНК гена *MRP1*. н/о — экспрессию изоформ не определяли.

прессия обнаружена в клеточных линиях ММ, где он является функциональным, а также в образцах костного мозга, полученных от больных ММ. Предполагается, что *BCRP* может содействовать возникновению лекарственной устойчивости при ММ [21].

Таким образом, нами было показано, что в образцах костного мозга, полученных от больных ММ, мРНК генов *MDR1*, *MRP1* и *BCRP* экспрессируются в 100 % случаев, а мРНК гена *LRP* — в 84 %. Несмотря на то что в большинстве случаев больные ММ получали лечение и имели III стадию, тем не менее в исследованных образцах наблюдалась заметная гетерогенность в экспрессии мРНК генов МЛУ. Это позволило нам выделить группы образцов с низким и высоким уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ (в 2 раза и более) и определить в этих группах уровень экспрессии мРНК генов системы IGF с целью оценить возможную корреляцию между двумя защитными системами клетки МЛУ и IGF.

Козкспрессия мРНК генов систем IGF и МЛУ

Мы исследовали экспрессию мРНК генов системы IGF в группах образцов костного мозга с низкой и высокой (в 2 раза и более) экспрессией мРНК генов, ответственных за МЛУ (табл. 2–5). Для удобства и наглядности величины экспрессии мРНК исследуемых генов во всех таблицах представлены в виде знаков «+» и «–». При этом «–» означает, что экспрессия гена отсутствует; «+/-» — экспрессия гена очень слабая; «+» — слабая экспрессия гена (отчетливо видимая полоска в агарозном геле); «++», «+++», «++++» — экспрессия гена повышена (в 2, 3 и 4 раза соответственно).

Экспрессия мРНК *IGF-1R* была выявлена у 4/19 (21 %) больных ММ (рис. 2, А, образцы 1, 4, 5, 18), причем в 3/4 случаев (образцы 1, 4, 5) она совпадала с повышенной экспрессией мРНК генов *MDR1* и *LRP* (см. рис. 1, А и 2, А; табл. 2 и 3) и ни в 1 из 4 случаев не была связана с повышенной экспрессией мРНК генов *MRP* и *BCRP* (см. рис. 1, А и 2, А; табл. 4 и 5). Следует отметить, что в образцах 1, 4, 5 также повышена экспрессия мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*. Такая корреляция в экспрессии мРНК *IGF-1A*, *IGF-1B*, *IGF-1R*, *MDR1* и *LRP* могла бы свидетельствовать в пользу участия *IGF-*

Таблица 5. Экспрессия мРНК IGF-1A и IGF-1B в группах образцов G и H

Группы образцов	Образцы аспиратов костного мозга	BCRP	IGF-1A	IGF-1B
Группа H	MM27	++++	++	++++
	MM46	++++	+	+++
	MM29	+++	+/-	—
	MM43	++	++	++
	MM22	++	—	+
	MM19	++	—	—
	MM48	++	—	—
	MM41	++	+	+
Группа G	MM4	+	+++	+++
	MM1	+	++	++
	MM5	+	++	++
	MM49	+	++	+
	MM35	+	+	+
	MM18	+	—	—
	MM26	+	—	—
	MM33	+	—	—
	MM13	+	н/о	н/о
	MM14	+	н/о	н/о
	MM17	+	н/о	н/о

Примечание. G — группа образцов костномозгового пунктата со слабой экспрессией мРНК гена *BCRP*; H — группа образцов костномозгового пунктата с повышенной в 2 раза и более экспрессией мРНК гена *BCRP*. н/о — экспрессию изоформ не определяли.

1R-опосредуемого сигнального пути в регуляции экспрессии мРНК генов *MDR1* и *LRP* при ММ, однако, учитывая, что мРНК *IGF-1R* экспрессируется всего в 4 из 19 случаев (см. рис. 2, А), такое предположение недостаточно убедительно. В литературе на сегодня нет данных, подтверждающих или опровергающих взаимосвязь между экспрессией мРНК *IGF-1R*, *MDR1* и *LRP*, поэтому для получения исчерпывающего ответа мы планируем исследовать роль *IGF-1R*-сигнального пути в регуляции экспрессии генов *MDR1* и *LRP* *in vitro* в культуре клеток ММ.

В нашей работе мы не обнаружили корреляции в экспрессии мРНК генов *IGF-1R* и *MRP1*, напротив, ни в одном из образцов ММ, где гиперэкспрессировалась мРНК *MRP1* (см. табл. 4, образцы 27, 29, 41, 46, 48), не была выявлена экспрессия мРНК *IGF-1R*. Вместе с тем в недавней работе J. Ge и соавт. методом иммуногистохимии исследовали экспрессию *IGF-1R* и *MRP1* в образцах у больных раком желудка и обнаружили, что *IGF-1R* экспрессировался в 75,2 % случаев, а *MRP1* — в 69 %. Такая высокая степень корреляции в экспрессии этих генов ассоциировалась с плохим прогнозом у больных раком желудка [22]. Другие авторы в более ранней работе показали, что в клетках млекопитающих промоторы генов инсулина *IGF-1* и *MRP2* содержат сайты связывания с гепатоцитарными ядерными факторами HNF-1 α и HNF-1 β . Эти данные позволяют предположить, что экспрессия мРНК указанных генов может корегулироваться [23].

Экспрессия мРНК *IR-B* (В-изоформа рецептора инсулина) была выявлена у 6/19 (32 %) больных ММ (см. рис. 2, А, образцы 1, 4, 5, 17, 18, 19). Отметим тот факт, что именно в 4 из этих 6 образцов также экспрессируется мРНК *IGF-1R* (образцы 1, 4, 5, 18). Такая коэкспрессия мРНК *IGF-1R* и *IR-B* в одних и тех же образцах свидетельствует в пользу того, что при ММ может формироваться гетеродимерный рецептор *IGF-1/IR-B*, который активируется преимущественно *IGF-1*. Биологическая роль *IGF-1/IR-B*-активируемого сигнального пути в клетке на сегодня неясна, поэтому полученная информация интересна и значима, хотя бы на примере того, что именно при сочетании экспрессии мРНК рецепторов *IGF-1R*, *IR-B* и двух изоформ мРНК гена

ростового фактора *IGF-1A* и *IGF-1B* в исследуемых образцах (1, 4, 5) наблюдается очевидная гиперэкспрессия мРНК *MDR1* и *LRP* (см. табл. 2 и 3, образцы 1, 4, 5).

Экспрессия мРНК *IR-A* (А-изоформы рецептора инсулина) была выявлена у 19/19 (100 %) больных (см. рис. 2, А). У 14/19 (74 %) больных уровень экспрессии мРНК *IR-A* был низким, у 5/19 (26 %) — повышен в 2 раза и более (см. рис. 2, А, образцы 27, 29, 43, 46, 49). Следует отметить, что в образцах, где были гиперэкспрессированы мРНК *MDR1*, *LRP*, *MRP1* и *BCRP*, повышенная экспрессия мРНК *IR-A* наблюдалась в 4/11 (45 %) случаев для *MDR1* (см. табл. 2, группа В, образцы 27, 43, 46, 49), в 3/9 (33 %) — для *LRP* (см. табл. 3, группа D, образцы 27, 43, 49), в 3/5 (60 %) — для *MRP1* (см. табл. 4, группа F, образцы 27, 29, 46) и в 4/8 (50 %) случаев для *BCRP* (см. табл. 5, группа H, образцы 27, 29, 43, 46). Из приведенных данных следует, что наиболее высокая степень коэкспрессии мРНК *IR-A* наблюдается в случае с *MRP1* (60 %) и *BCRP* (50 %). Эти данные позволяют предположить, что, возможно, в клетках ММ экспрессия генов *MRP1* и *BCRP* зависит от опосредуемого *IR-A* сигнального пути и отличается от регуляции экспрессии генов *MDR1* и *LRP*. Вместе с тем в недавней работе Н. Liu и соавт. показали, что в первичной культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов, полученных из головного мозга крысы, инсулин значительно повышал активность и экспрессию белка Pgp; при этом было установлено, что *IR*-опосредуемый сигнальный путь активировал сигнальный каскад PKC/NFκB и не воздействовал характерный для него основной путь передачи сигнала — PI3K/Akt-зависимый путь [24]. Что касается генов *LRP*, *MRP1* и *BCRP*, на сегодня в литературе нет данных, свидетельствующих в пользу взаимосвязи между *IR*-опосредуемым сигнальным путем и регуляцией экспрессии мРНК этих генов.

Экспрессия изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* выявлена у 10/16 (63 %) больных ММ, у 6/16 (37 %) пациентов мРНК этих изоформ не экспрессировались. При сравнении случаев, когда обе эти изоформы присутствовали или отсутствовали в одних и тех же образцах, оказалось, что у 8/10 (80 %) больных изоформы мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*, как правило, коэкспрессируются (см. рис. 2, А; табл. 2). Из публикаций известно, что изоформы мРНК *IGF-1* образуются в результате альтернативного сплайсинга, при этом обе изоформы сохраняют нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный пептид *IGF-1*, а С-концевые нуклеотидные последовательности этих двух изоформ кодируют два различных пептида: ЕА и ЕВ. Функциональные значения изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* до конца неизвестны и в настоящее время исследуются. Установлено, что про-IGF-1-пептид выделяется из клетки в межклеточное пространство, а про-IGF-1В-пептид является активной внутриклеточной изоформой и обнаруживается в ядре клетки, по-видимому выполняя регуляторную функцию [25]. Предполагается, что количественное соотношение этих изоформ может служить одним из факторов, определяющих программу клетки, т.е. в случае преобладания одной изоформы клетка будет пролиферировать, а другой — дифференцироваться [26]. В настоящей работе мы обнаружили, что при ММ экспрессируются обе изоформы мРНК (*IGF-1A* и *IGF-1B*) и уровень их экспрессии в большинстве случаев одинаковый. При сопоставлении с экспрессией генов МЛУ было обнаружено, что эти изоформы экспрессируются преимущественно в тех образцах, где гиперэкспрессированы мРНК гена *MDR1* (см. табл. 2, группа В; рис. 1, Б и 2, Б, В), и, напротив, практически не экспрессируются (за исключением единичных случаев) в образцах, где уровень экспрессии мРНК гена *MDR1* низкий

(см. табл. 2, группа А; рис. 1, Б и 2, Б, В). На рис. 2, Б, В представлены средние значения экспрессии мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* в группах А и В. Разница в экспрессии мРНК обеих изоформ *IGF-1* в группах А и В является статистически значимой ($p = 0,0011$ и $p = 0,0267$ соответственно). В группе В коэкспрессия мРНК гена *MDR1* и мРНК обеих изоформ *IGF-1* составляет 90 %.

Также было обнаружено, что обе изоформы мРНК (*IGF-1A* и *IGF-1B*) преимущественно экспрессируются в тех образцах, где гиперэкспрессированы мРНК гена *LRP* (см. табл. 3, группа D; рис. 1, В—Д), и, напротив, экспрессируются заметно реже в образцах, где уровень экспрессии мРНК гена *LRP* низкий (см. табл. 3, группа С; рис. 1, В и 2, Г, Д). На рис. 2, Г, Д представлены средние значения экспрессии мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* в группах С и D. В группах С и D разница в экспрессии мРНК *IGF-1A* является статистически значимой ($p = 0,0008$), а мРНК *IGF-1B* — нет ($p = 0,0817$). В группе D коэкспрессия мРНК гена *LRP* и мРНК двух изоформ *IGF-1* составляла 87,5 %.

Мы не обнаружили коэкспрессии между изоформами мРНК *IGF-1* и мРНК генов *MRP1* и *BCRP*. мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* были выявлены как в группах образцов с гиперэкспрессией мРНК *MRP1* и *BCRP* (группы F и H, см. табл. 4 и 5; рис. 1, Г, Д и 2, Е—И), так и в группах образцов, где мРНК *MRP1* и *BCRP* экспрессировались слабо (группы Е и G, см. табл. 4 и 5; рис. 1, Г, Д и 2, Е—И).

Таким образом, наши исследования показали, что при ММ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* в высокой степени коэкспрессируются с мРНК *MDR1* и *LRP* и не коэкспрессируются с мРНК *MRP1* и *BCRP*. Исходя из того, что в промоторном регионе генов *MDR1* и *LRP* практически не содержатся общие с геном *IGF-1* сайты связывания для транскрипционных факторов, наши данные свидетельствуют в пользу того, что система IGF/инсулин может участвовать в регуляции экспрессии генов *MDR1* и *LRP* при ММ. Более того, в промоторной области гена *MDR1* есть сайт связывания с транскрипционным фактором NFκB, экспрессия которого регулируется IGF-1. Что касается генов *MRP1* и *BCRP*, то в промоторном регионе они имеют явно отличающиеся от генов *MDR1* и *LRP* регуляторные мотивы, и поэтому, возможно, экспрессия генов *MRP1* и *BCRP* регулируется по другому, отличному от *MDR1* и *LRP* принципу.

В литературе не так много работ, подтверждающих роль генов системы IGF/инсулин в регуляции экспрессии генов МЛУ. Вместе с тем количество публикаций, связанных с этой темой, накапливается, что свидетельствует о ее важности в биологии и медицине. Так, например, было показано, что в клетках рака толстой кишки мыши линии MCLM и Т-лимфобластных клетках линии человека CCRF-CEM IGF-1 индуцировал экспрессию гена *MDR1* и значительно ингибировал гибель клеток от цитостатиков [13, 14]. Есть также несколько поздних работ, свидетельствующих в пользу важности системы IGF/инсулин в регулировании генов МЛУ, и о них мы упоминали выше [22–24, 27].

Таким образом, в данной работе мы изучали взаимосвязь между двумя важными защитными системами МЛУ и IGF/инсулин и обнаружили, что при ММ эти системы могут пересекаться. Значимость нашей работы заключается в том, что при исследовании экспрессии генов защитной системы IGF/инсулин и генов, ответственных за МЛУ в образцах, которые получены у леченных больных ММ, впервые была установлена корреляционная связь между экспрессией двух изоформ мРНК гена *IGF-1* и мРНК генов *MDR1* и *LRP*. Учитывая, что изучение молекулярных механизмов, участвующих в регуляции активации экспрессии генов МЛУ, актуально для экспериментальной онко-

логии, полученные нами данные позволяют предположить, что, возможно, фактор роста IGF-1 участвует в регуляции экспрессии генов *MDR1* и *LRP*. Наше предположение основано на корреляционных данных, поэтому дальнейшие исследования в этом направлении мы планируем выполнить *in vivo* на культурах клеток ММ. Нами будет изучаться роль системы IGF/инсулин в регуляции как экспрессии, так и функциональной активности генов, ответственных за МЛУ, и других известных на сегодня механизмов лекарственной устойчивости, отличных от МЛУ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью оценить корреляцию между активностью генов, принадлежащих двум важным защитным системам клетки (МЛУ и IGF/инсулин), при ММ в аспиратах костного мозга мы исследовали экспрессию мРНК этих генов. Несмотря на то что у всех пациентов была диагностирована ММ III стадии и все они получили лечение, тем не менее оказалось, что мРНК генов систем МЛУ и IGF/инсулин экспрессировались гетерогенно. Нами были определены группы образцов с высокой и низкой степенью экспрессии мРНК генов МЛУ и оценена степень коэкспрессии генов системы IGF/инсулин в этих группах. Такой анализ показал, что изоформы мРНК гена *IGF-1* (*IGF-1A* и *IGF-1B*) в большинстве случаев экспрессируются в образцах, в которых гиперэкспрессированы мРНК *MDR1* и *LRP*, причем степень коэкспрессии изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1* составила 90 %, а изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *LRP* — 87,5 %. Такая высокая степень коэкспрессии исследуемых генов дает основание предполагать, что, возможно, IGF-1 участвует в регуляции экспрессии генов *MDR1* и *LRP*, а учитывая, что в образцах, полученных от пациентов, *IR-A* является преобладающим типом рецепторов, не исключено, что такая регуляция генов МЛУ осуществляется через активацию сигнального пути IGF-1/IR-A. Что касается генов *MRP1* и *BCRP*, то в промоторном регионе они имеют явно отличающиеся от генов *MDR1* и *LRP* регуляторные мотивы и, возможно, экспрессия этих генов регулируется другим, IGF-1-независимым, образом. Конечно, наши предположения основаны на корреляционных данных, поэтому требуют подтверждения в экспериментах *in vitro* на моделях культур клеток ММ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dispenzieri A., Kyle R.A. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2005; 18: 553–68.
2. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома. В кн.: Клиническая онкогематология. Руководство для врачей, 2-е изд., перераб. и доп. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007; 42: 847–73.
3. Панищева Л.А., Какпакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние ингибитора протеасом бортезомиба на экспрессию и активность ABC транспортеров в опухолевых клетках. *Биол. мембраны* 2010; 27(2): 1–7.
4. Ставровская А.А. Опухолевая клетка в обороне. *Соровский образов. журн.* 2001; 7(7): 17–23.

5. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: некоторые новые факты и перспективы исследований. *Биол. мембраны* 2003; 20(3): 196–205.
6. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *J. Int. Med.* 2000; 247: 521–34.
7. Hatok J., Rauay P., Hudeuek J. et al. Genes of multidrug resistance in haematological malignancies. *Biologia (Bratislava)* 2006; 61(3): 247–56.
8. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Kung A.L. et al. The IGF/IGF-1R system is a major therapeutic target for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors. *Blood* 2002; 100: 70a.
9. Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. et al. Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications. *Blood* 2004; DOI 10.1182/blood-2004-01-0037. For personal use only.
10. Ge N.-L., Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 2000; 96: 2856–61.
11. Ogawa M., Nishiura T., Oritani K. et al. Cytokines Prevent Dexamethasone-induced Apoptosis via the Activation of Mitogenactivated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in a New Multiple Myeloma Cell Line. *Cancer Res.* 2000; 60: 4262–9.
12. Maiso P., Ocio E.M., Garayoa M. et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *BJH.* 2008; 141: 470–82.
13. Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W. et al. Insulin-like growth factor-1 promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J. Cell Physiol.* 1998; 175(2): 141–8.
14. Schwarze C.P., Neu S., Beck J. et al. Influence of IGF-I and Cell Density on MDR1 Expression in the T-Lymphoblastoid Cell Line CCRF-CEM. *Horm. Res.* 1999; 52: 192–9.
15. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975; 36: 842–54.
16. Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-Glycoprotein, the Multidrug Resistance Protein MRP, and the Lung-Resistance Protein LRP in Multiple Myeloma. *Med. Oncol.* 2002; 19(2): 87–104.
17. Linsenmeyer M.E. et al. Levels of expression of the *mdr1* gene and glutathione S-transferase genes 2 and 3 and response to chemotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Cancer.* 1992; 65: 471–5.
18. Lokhorst H.M., Izquierdo M.A.I., Raaijmakers M.G.P. et al. Lung resistance protein expression is a negative predictive factor for response to alkylating chemotherapy and survival in multiple myeloma. *Blood* 1996; 88: 640a (suppl).
19. Rimsza L.M., Campbell K., Dalton W.S. et al. The major vault protein (MVP), a new multidrug resistance associated protein, is frequently expressed in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 1999; 34: 315–24.
20. Nooter K., Burger H., Stoter G. Multidrug resistance-associated protein (MRP) in haematological malignancies. *Leuk. Lymphoma* 1996; 20: 381–7.
21. Turner J., Karlinski R., Marchion D. et al. Breast cancer resistance protein expression and function in multiple myeloma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004; 45: Abstract 518.
22. Ge J., Chen Z., Wu S. et al. Expression Levels of Insulin-Like Growth Factor-1 and Multidrug Resistance-Associated Protein-1 Indicate Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Digestion* 2009; 80: 48–158.
23. Kitanaka S., Sato U., Igarashi T. Regulation of human insulin, IGF-I, and multidrug resistance protein 2 promoter activity by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1b and HNF-1a and the abnormality of HNF-1b mutants. *J. Endocrinol.* 2007; 192: 141–7.
24. Liu H., Yang H., Wang D. et al. Insulin regulates P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells via an insulin receptor-mediated PKC/NF-κB pathway but not a PI3K/Akt pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 602: 277–82.
25. Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B. et al. Cooperative signals governing ARF mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 2517–28.
26. Barton E.R. The ABCs of IGF-1 isoforms: impact of muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2006; 31: 791–7.
27. Mitsiades C., Mitsiades N., McMullan C. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R/CD221): A target for monoclonal antibody-based therapy to overcome drug-resistance in multiple myeloma (MM), other hematologic malignancies and solid tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004; 45: Abstract 5331.

Сравнительный анализ кариотипа у пожилых пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом

С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Л.С. Мартыненко, М.В. Москаленко, М.П. Иванова, В.Ю. Аксенова, Н.Ю. Цыбакова, С.А. Тиранова, Н.А. Потихонова, К.М. Абдулкадыров

Comparison of karyotype of elderly patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia

S. V. Gricev, I. S. Martynkevich, L. S. Martynenko, M. V. Moskalenko, M. P. Ivanova, V. U. Aksenova, N. U. Tsybakova, S. A. Tiranova, N. A. Potihonova, K. M. Abdulkadyrov

SUMMARY

The aim of the study was to compare the karyotype of older patients with MDS and AML as there is the idea that these disorders in the older population are the different stages of the same disease. The karyotype of 244 de novo AML patients (median age 65 years) and 149 MDS patients (median age 73 years) was analyzed. Patients with each disease were grouped according to their age (≤ 60 vs ≥ 61 years) and karyotype (normal vs balanced vs imbalanced vs complex). In MDS patients older than 60 years the rate of normal karyotype decreased (28,7% vs 40,3%; $p = 0,141$) and the rate of imbalanced (43,7% vs 33,9%; $p = 0,229$) and complex karyotype (25,3% vs 19,4%; $p = 0,396$) increased as compared with the younger patients. In older AML patients the rate of complex karyotype was significantly higher than in patients younger than 60 years (33,9% vs 8,8%; $p = 0,000$). Irrespective of the morphological variant of the disease the main cytogenetic finding in older patients was the increasing rate of chromosomes 5 and 7 abnormalities. The abnormalities of chromosome 5 were determined in 14,5% of younger patients with MDS vs 29,9% patients older than 60 years ($p = 0,029$). In AML patients the rate of -5/5q- aberrations was 6,6% vs 27,4% in groups ≤ 60 vs ≥ 61 years ($p = 0,000$). The established data support the hypothesis that MDS and AML in some older patients are the manifestation of the same disease.

Keywords

myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, karyotype, age.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg

Контакты: genetics.spb@mail.ru

Принято в печать: 11 июня 2010 г.

РЕФЕРАТ

Целью данного исследования было изучить особенности формирования патологического кариотипа у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) пожилого возраста путем сравнительного анализа хромосомных aberrаций, обнаруживаемых у пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС) и ОМЛ. Были проанализированы данные 244 больных *de novo* ОМЛ (медиана возраста 65 лет) и 149 больных МДС (медиана возраста 73 года). Пациенты с каждым заболеванием были сгруппированы согласно их возрасту (≤ 60 или ≥ 61 года) и кариотипу (нормальный, сбалансированный, несбалансированный, комплексный). У больных МДС частота нормального кариотипа снижалась по мере увеличения возраста: 40,3% в группе младше 60 лет и 28,7% в группе старше 60 лет ($p = 0,141$). Напротив, число больных с несбалансированными и комплексными aberrациями было выше в старшей возрастной группе: 33,9 vs 43,7%; $p = 0,229$ и 19,4 vs 25,3%; $p = 0,396$. У пациентов пожилого возраста с ОМЛ частота комплексного кариотипа была достоверно выше, чем у пациентов моложе 60 лет (33,9 vs 8,8%; $p = 0,000$). Независимо от морфологического варианта заболевания цитогенетическая картина у пожилых больных ассоциировалась с более частым вовлечением в aberrации хромосом 5 и 7. Аномалии хромосомы 5 были обнаружены у 14,5% молодых пациентов с МДС, в то время как у пожилых больных она определялась в 29,9% случаев ($p = 0,029$). У больных ОМЛ частота aberrаций -5/5q- составила 6,6 и 27,4% в группах младше 60 и старше 61 года соответственно ($p = 0,000$). Полученные результаты подтверждают гипотезу, что МДС и ОМЛ у пожилых пациентов — это проявления одного и того же заболевания.

Ключевые слова

миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, кариотип, возраст.

ВВЕДЕНИЕ

Современное представление о миелодиспластическом синдроме (МДС) отражено в классификациях ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной ткани [1, 2]. Принципиальным отличием от предшествующей ФАВ-классификации [3] служит уменьшение количества бластных клеток, разграничивающих МДС и острый миелоидный лейкоз

(ОМЛ), с 30 до 20%. В связи с этим была упразднена такая морфологическая категория, как рефрактерная анемия с избытком бластов в трансформации, и предложен новый вариант: ОМЛ с мультилинейной дисплазией. Критериями диагностики данного варианта ОМЛ были диспластические изменения не менее чем в 50% клеток двух или более ростков миелопоэза независимо от того, было или нет указание

в анамнезе на МДС либо смешанное миелоидное заболевание в предшествующие 6 мес. [1].

В новой редакции классификации ВОЗ была выделена нозология «ОМЛ с МДС-подобными изменениями» [2]. Это было вызвано расширением спектра диагностических критериев, к которым наряду с анамнестическими указаниями и морфологическими изменениями были добавлены цитогенетические маркеры. Последние представлены комплексным кариотипом (3 независимые хромосомные аберрации и более), несбалансированными повреждениями в виде моносомии хромосом 5, 7 и 13, делеций их участков или других хромосом, а также отдельными транслокациями, такими как t(11;16), t(1;3), t(5;12).

Необходимо отметить, что обнаружение некоторых из этих хромосомных аберраций было предложено использовать в качестве одного из критериев диагностики МДС. Речь идет о случаях персистирующей цитопении неустановленного происхождения, когда количество клеток с признаками дисплазии в одном или более ростках миелопоэза составляет менее 10 %, т.е. при отсутствии или недостаточном объеме морфологического субстрата для диагностики МДС [2].

Таким образом, в отличие от прогностических шкал IPSS [4] и WPSS [5], в которых кариотип — один из маркеров риска, впервые в классификации ВОЗ цитогенетические повреждения приобрели статус самостоятельных диагностических критериев МДС.

Хромосомные аберрации принимают непосредственное участие в становлении и прогрессировании патологического клона МДС [6, 7]. Несмотря на включение ряда транслокаций в состав характерных для МДС цитогенетических повреждений, трансформация в ОМЛ связана преимущественно с потерей или приобретением генетического материала. Предполагается, что подобный сценарий характерен для лиц пожилого возраста, у которых накапливающиеся в течение жизни молекулярно-генетические повреждения создают условия для формирования комплексного кариотипа [7, 8].

Снижение частоты неслучайных транслокаций у пожилых больных ОМЛ одновременно с увеличением хромосомных аберраций, типичных для МДС [9], позволяют предположить, что МДС и ОМЛ у лиц старшей возрастной группы — проявления одной болезни, определяемой на разных стадиях своего развития [6–8].

Низкая эффективность лечения больных ОМЛ старших возрастных групп обусловлена рядом факторов, один из них — биологический фенотип лейкозных клеток, в формирование которого помимо генетических повреждений могут быть вовлечены эпигенетические механизмы и стромальное микроокружение [10, 11]. Это обуславливает целесообразность применения комбинации препаратов, действующих на разные биологические мишени [12]. Например, обнаружение характерных для МДС патобиологических феноменов у пожилых больных ОМЛ может послужить основанием для включения в арсенал лекарственных средств, применяемых в лечении больных МДС: гипометилирующих, иммуномодуляторов, блокаторов тирозинкиназ и ряда других.

Целью данного исследования было изучить особенности формирования кариотипа у больных ОМЛ пожилого возраста путем сравнительного анализа хромосомных аберраций, обнаруживаемых у больных МДС и ОМЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы результаты генетических и морфологических исследований у больных за период с 1990 г. по май 2009 г.

Диагнозы МДС и ОМЛ верифицировались по результатам комплексного обследования, включавшего морфологические, гистологические, цитохимические, иммунологические и цитогенетические методы. Для определения кариотипа у больных было исследовано не менее 20 метафаз.

Для разграничения ОМЛ и МДС использовались критерии классификации ВОЗ [1, 2]. Случаи с транслокациями t(15;17) и t(8;21), а также inv(16), независимо от количества бластов в пунктате костного мозга, были верифицированы как ОМЛ. Отдельные варианты ОМЛ по критериям классификации ВОЗ не выделялись.

Условиями включения больных в данное исследование были: 1) отсутствие в анамнезе предшествующего миелоидного заболевания или цитостатической терапии, 2) установленный кариотип до проведения индукционных курсов. Дополнительным критерием для больных МДС низкого риска было подтверждение диагноза при контрольном обследовании не ранее чем через 6 мес. Морфологические варианты с нейтропенией или тромбоцитопенией, сопровождавшиеся диспластическими признаками только в клетках нейтрофильного или мегакариоцитарного ростков и с нормальным кариотипом, в данное исследование не были включены, так же как и случаи неклассифицированного МДС.

Согласно критериям включения, анализу подверглись данные 244 больных *de novo* ОМЛ в возрасте от 16 до 84 лет (медиана 65 лет) и 149 больных *de novo* МДС в возрасте от 20 до 83 лет (медиана 73 года).

У 68 (45,6 %) больных МДС содержание бластов в костномозговом пунктате было менее 5 %. Из них у 7 (4,7 %) пациентов установлен синдром 5q-, у 18 (12,1 %) — рефрактерная анемия (РА), у 4 (2,7 %) — РА с кольцевыми сидеробластами (РАКС) и у 39 (26,2 %) — рефрактерная цитопения с или без кольцевых сидеробластов. Варианты рефрактерной анемии с избытком бластов (РАИБ) имели место у 81 (54,3 %) больного: 30 (20,1 %) — с РАИБ-1 и 51 (34,2 %) — с РАИБ-2.

Из больных МДС и ОМЛ сформированы две возрастные группы: ≤ 60 и ≥ 61 года. В соответствии с этим 62 (41,6 %) больных МДС с медианой возраста 49,5 года были распределены в 1-ю группу и 87 (58,3 %) с медианой возраста 73 года — во 2-ю. Больные ОМЛ распределились следующим образом: в 1-ю группу вошло 182 (74,6 %) пациента с медианой возраста 55 лет, во 2-ю — 62 (25,4 %) пациента с медианой возраста 68 лет (табл. 1).

Таблица 1. Распределение вариантов кариотипа среди больных МДС и ОМЛ разного возраста

Заболевание	Группа больных				Кариотип					
					Нормальный		Несбалансированный		Комплексный	
	<i>n</i>	Возраст, лет	Медиана, лет	Диапазон, лет	абс.	%	абс.	%	абс.	%
МДС, <i>n</i> = 149	62	≤ 60	49,5	17–60	25	40,3	21	33,9	12	19,4
	87	≥ 61	73,0	61–83	25	28,7	38	43,7*	22	25,3
ОМЛ, <i>n</i> = 244	62	≥ 61	68,0	61–84	20	32,3	17	27,4*	21	33,9**
	182	≤ 60	55,0	16–60	63	34,6	47	25,8	16	8,8**

* Несбалансированный кариотип, МДС, ≥ 61 года, ОМЛ, ≥ 61 года; p = 0,043.

** Комплексный кариотип, ОМЛ, ≤ 60 и ≥ 61 года; p = 0,000.

По результатам цитогенетического исследования больные МДС и ОМЛ были распределены на четыре группы. В группу с нормальным кариотипом были включены пациенты без хромосомных повреждений по результатам стандартного цитогенетического исследования или с потерей одной из половых хромосом. Группа со сбалансированными аберрациями представлена случаями с транслокациями $t(15;17)$, $t(8;21)$ и $inv(16)$ независимо от количества дополнительных хромосомных повреждений или другими вариантами одиночных транслокаций. Больные, у которых обнаруживались потеря или дополнительный хромосомный материал (делеции, моносомии, трисомии или др.) в количестве не более двух, вошли в группу с несбалансированным кариотипом. Группа с комплексным кариотипом сформирована из случаев с 3 независимыми хромосомными аберрациями в одном клоне и более.

Одиночные транслокации были выявлены у 4 (2,7 %) больных МДС. В связи с этим данный вариант кариотипа не был включен в анализ, несмотря на то что сбалансированные аберрации имели место у 60 (24,6 %) больных ОМЛ.

Для обнаружения различий между отдельными группами был использован скорректированный Chi-squared (V-square) метод.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди 62 больных МДС младше 60 лет частота морфологических вариантов с количеством костномозговых бластов менее 5 или 5 % и более была примерно одинаковой: 34 и 28, или 54,8 и 45,2 % ($p = 0,283$). Однако у 87 больных старше 60 лет преобладающими были случаи с избытком бластов: 34 и 53, или 39,1 и 60,9 % ($p = 0,004$).

Распределение больных МДС и ОМЛ по возрасту и вариантам кариотипа представлено в табл. 1 и на рис. 1.

У больных МДС частота нормального кариотипа снижалась по мере увеличения возраста: 40,3 % — в группе младше 60 лет и 28,7 % — в группе старше 60 лет ($p = 0,141$). Напротив, число больных с несбалансированными и комплексными аберрациями было выше в старшей возрастной группе: 33,9 vs 43,7 % ($p = 0,229$) и 19,4 vs 25,3 % ($p = 0,396$) соответственно.

Отличительной характеристикой кариотипа у больных ОМЛ было достоверно большее число случаев с множественными цитогенетическими аномалиями по мере увеличения возраста: 8,8 % — среди больных младше 60 лет и 33,9 % — среди больных старше 60 лет ($p = 0,000$). При этом частота нормального и несбалансированного кай-

риотипов была практически одинаковой: 34,6 vs 32,3 % ($p = 0,735$) и 25,8 vs 27,4 % ($p = 0,805$) соответственно.

При сравнении вариантов кариотипа у больных МДС и ОМЛ в возрасте старше 60 лет было выявлено, что несбалансированный кариотип — более частая находка у больных МДС: 43,7 и 27,4 % соответственно ($p = 0,043$). Это было сопряжено с увеличением случаев комплексного кариотипа у больных ОМЛ, однако различие недостоверно: 25,3 vs 33,9 % ($p = 0,256$).

Не было различий в количестве хромосомных аномалий, вовлеченных в формирование комплексного кариотипа. Так, у больных МДС младше и старше 60 лет медиана составила 4 (3–8) и 5 (3–10) и у больных ОМЛ — 4 (3–11) и 5 (3–10) соответственно.

Несмотря на это, у пациентов с любым нозологическим вариантом одновременно с увеличением возраста был установлен рост числа случаев с моносомией или делецией длинного плеча хромосомы 5 независимо от количества и вида сопутствующих аберраций, включая и поломки хромосомы 7. Так, если в группе МДС моложе 60 лет повреждения хромосомы 5 были обнаружены у 14,5 % больных, то в группе старше 60 лет — у 29,9 % ($p = 0,029$). Среди больных ОМЛ старшей возрастной группы количество случаев с аберрацией -5/5q- было достоверно выше, чем среди больных более молодого возраста: 27,4 и 6,6 % соответственно ($p = 0,000$) (табл. 2).

Необходимо отметить, что при МДС увеличение количества случаев с повреждениями хромосомы 5 имело место преимущественно среди больных с избыточным количеством бластных клеток в костном мозге. Так, если число больных в возрасте до 60 лет и с бластозом более 5 % составило 9,7 %, то в группе больных старше 60 лет и с бластозом более 5 % — 20,7 % ($p = 0,072$) (см. табл. 2).

Достоверное различие в количестве случаев с повреждениями хромосомы 7 (независимо от дополнительных хромосомных аномалий, в т. ч. и хромосомы 5) было установлено только среди больных ОМЛ. Число больных с -7/7q- было выше в старшей возрастной группе: 19,4 vs 6,6 % в группе моложе 60 лет ($p = 0,003$). Различий в частоте аберраций хромосомы 7 у больных МДС разного возраста выявлено не было: 16,1 vs 17,2 % ($p = 0,858$) (см. табл. 2).

В группе больных МДС аберрации -5/5q- и -7/7q- в виде единственной поломки или в комбинации с одним дополнительным повреждением были обнаружены соответственно у 26 (41,1 %) и 6 (10,2 %) из 59 больных с несбалансированным кариотипом. Из 34 пациентов с комплексным кариотипом повреждения хромосом 5 и 7 имели место в 20 (58,8 %) случаях.

Аберрации -5/5q- и -7/7q- в виде одиночных повреждений с дополнительными поломками или в составе комплексного кариотипа были выявлены у 13 (20,3 %), 8 (12,5 %) и 20 (54,1 %) больных ОМЛ соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одна из причин неудачи лечения пожилых больных ОМЛ — сопутствующие заболевания, и прежде всего поражения сердца, легких и печени. Отягощенный соматический статус, отражением которого является неблагоприятный индекс коморбидности [13, 14], и снижение резервов костномозгового кроветворения обуславливают высокую частоту тяжелых и длительных осложнений с высокой летальностью в постцитостатический период [8, 10, 12]. Это ограничивает объем и интенсивность химиотерапии и, как следствие, снижает эффективность лечения больных ОМЛ пожилого возраста.

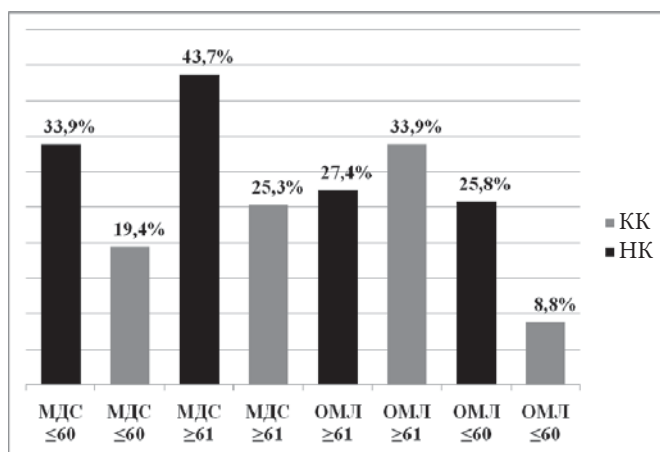


Рис. 1. Частота несбалансированного и комплексного кариотипов у больных МДС и ОМЛ разного возраста. КК — комплексный кариотип; НК — несбалансированный кариотип

Таблица 2. Частота aberrаций -5/5q- и -7/7q- среди больных ОМЛ и МДС разного возраста

Заболевание	Больные, лет (n)	-5/5q-				-7/7q-			
		n (%)	Медиана, лет	Вариант МДС		n (%)	Медиана, лет	Вариант МДС	
				< 5%, n (%)	> 5%, n (%)			< 5%, n (%)	> 5%, n (%)
МДС, n = 149	≤ 60 (62)	9 (14,5) ^a	51	3 (4,8)	6 (9,7) ^a	10 (16,1)	51,5	4 (6,5)	6 (9,7)
	≥ 61 (87)	26 (29,9) ^a	70	8 (9,2)	18 (20,7) ^a	15 (17,2)	67,0	4 (4,6)	11 (12,6)
ОМЛ, n = 244	≥ 61 (62)	17 (27,4) ^b	71	—	—	12 (19,4) ^c	66,5	—	—
	≤ 60 (182)	12 (6,6) ^b	51	—	—	12 (6,6) ^c	46,0	—	—

^a p = 0,029.
^b p = 0,000.
^c p = 0,072.
^d p = 0,003.

Наиболее привлекательным методом лечения этой категории больных представляется применение лекарственных средств таргетной терапии [15]. Несмотря на возможную роль генов *FLT3*, *NPM1*, *NRAS* и *WT1* [16–18], низкая частота их мутаций позволяет предположить участие других патобиологических механизмов в лейкозогенезе у пожилых больных ОМЛ. Основанием для этого служит снижение с возрастом числа случаев со сбалансированными aberrациями, включая транслокации t(8;21), t(15;17) и инверсию inv(16) [9].

Одним из способов, который может привести к оптимизации лекарственной терапии, является расшифровка отдельных механизмов формирования лейкозного клона путем сравнительного изучения кариотипа больных МДС и ОМЛ. Это обусловлено непосредственным участием цитогенетических aberrаций в становлении и развитии опухолевого клона.

Результаты проведенного анализа позволяют предположить, что *de novo* ОМЛ у части пожилых больных или является следствием генетической эволюции МДС, или имеет МДС-подобные механизмы лейкозогенеза:

- увеличение с возрастом частоты развернутых вариантов МДС, характеризующихся избыточным количеством бластных клеток в костном мозге, и случаев с несбалансированными хромосомными aberrациями преимущественно в виде делеций и/или моносомий хромосом 5 и 7;
- значительное повышение числа случаев ОМЛ, сопровождающихся множественными цитогенетическими повреждениями, среди больных пожилого возраста при отсутствии различия в частоте неслучайных aberrаций между группами больных младше и старше 60 лет;
- достоверное увеличение повреждений хромосом 5 и 7 у больных МДС и ОМЛ в возрасте старше 60 лет.

Результаты проведенного исследования соответствуют в целом данным литературы. Так, М. Врессия и соавт. [19] выявили, что если РА — более частая находка у больных моложе 50 лет, то морфологические варианты с избытком бластов характерны для лиц старше 50 лет (50,5 vs 39,0 % и 53 vs 36 % соответственно; p = 0,02).

Установлено также, что у пациентов с развернутыми вариантами МДС увеличивается частота повреждений кариотипа [20], которые представлены преимущественно aberrациями хромосом 5 и 7 или множественными цитогенетическими поломками [20–23]. Так, если клональные изменения имели место у 43 % больных РА и 34 % РАКС, то у больных РАИБ и РАИБ-Т их частота составила уже 59 и 70 % соответственно [23]. D. Naase и соавт. [21] при анализе кариотипа 2072 больных МДС обнаружили делецию длинного плеча хромосомы 5 в 312 (15,1 %) случаях. При этом aberrация 5q- в виде единственной цитогенетической поломки была у 146 (47 %) пациентов, в комбинации с дополнительным хромосомным повреждением — у 52 (17 %),

в составе комплексного кариотипа — у 114 (36 %). Повреждения хромосомы 7 в виде моносомии и/или делеции длинного плеча были выявлены у 230 (11,1 %) больных и распределялись следующим образом: 86 (37,5 %), 31 (13,5 %) и 113 (49 %) больных соответственно. Обнаружив множественные цитогенетические поломки у 181 (17,6 %) из 1029 пациентов с первичным МДС, О. Pozdnyakova и соавт. [22] установили их связь с развернутыми стадиями заболевания (63,5 % больных РАИБ vs 36,4 % с рефрактерными цитопениями) и aberrациями -5/5q- или -7/7q- (80,1 %).

Важно подчеркнуть, что риск лейкозной трансформации не только связан с увеличением количества бластных элементов в препаратах костного мозга, но и с aberrациями хромосомы 5, за исключением изолированной делеции длинного плеча хромосомы 5 (p = 0,02), и моносомией хромосомы 7 (p = 0,03) [23].

Отличительной чертой кариотипа у больных ОМЛ старше 60 лет служит частое повреждение хромосомы 5 (8–26 %), хромосомы 7 (9–15 %) и высокая частота случаев с множественными цитогенетическими поломками (15–24 %). При этом aberrации -5/5q- были обнаружены преимущественно в составе комплексного кариотипа [24–26]. Другая особенность — крайне низкая эффективность стандартных методов терапии [15, 24, 25]. Так, по данным S. Faraq [24], у больных с -7/7q-, -5/5q-, ≥ 3 и ≥ 5 независимыми хромосомными поломками полная ремиссия была достигнута у 38, 22, 25 и 23 % больных соответственно; рецидив ОМЛ развился у 81, 95, 90 и 95 % пациентов, а общая 5-летняя выживаемость составила 2, 0, 2 и 0 мес. соответственно.

Несмотря на различия в частоте отдельных хромосомных aberrаций в собственном исследовании и анализируемых сообщениях, что, вероятно, обусловлено количеством наблюдений, выбором классификационных систем, критериев включения и формирования отдельных групп, следует подчеркнуть однотипность обнаруженных биологических тенденций у пожилых больных МДС и ОМЛ.

Значительный интерес представляют данные G. Rossi и соавт. [27], которые, применив критерии FAB-классификации, распределили 182 больных в четыре группы: ранний МДС (РА, РАКС, ХММЛ), поздний МДС (РАИБ и РАИБ-Т), ОМЛ пожилых (≥ 65 лет) и молодых (≤ 65 лет) больных. Авторами обнаружено достоверное повышение числа случаев комплексного кариотипа у больных МДС с избытком бластов и пожилых больных ОМЛ по сравнению с молодыми ОМЛ моложе 65 лет: 37, 46 и 19 % соответственно (p < 0,02 и p < 0,01). Кроме того, было выявлено достоверное увеличение aberrаций -5/5q- и -7/7q- у больных ОМЛ старше 65 лет и с развернутыми стадиями МДС по сравнению с группой молодых больных ОМЛ: 27, 20, 2 % (p < 0,001) и 27, 31 и 9 % (p < 0,01) соответственно. Несмотря на использование разных критериев для формирования отдельных групп МДС и ОМЛ, следует признать соответствие между результатами, полученными G. Rossi и соавт., и данного исследования.

Анализ полученных данных в совокупности с приводимыми в литературе дают основание предположить, что у пожилых больных ОМЛ нередко является результатом дальнейшей эволюции предсуществующего патологического (МДС?) клона вследствие дополнительных молекулярно-генетических повреждений. Не исключено, что инициирующие процесс трансформации повреждения связаны с цитогенетическими поломками в виде потери генетического материала на хромосоме 5 и/или 7, которые, присоединяясь к имеющимся хромосомным aberrациям, формируют комплексный кариотип.

Обнаружение гиперметилирования генов в период или после прогрессирования МДС в ОМЛ свидетельствует о непосредственном участии эпигенетических механизмов в лейкозной трансформации [28–30]. Так, Y. Jiang и соавт. [30] было установлено неблагоприятное течение МДС в случае одновременного повреждения хромосомы 7 в локусе гена *FZD9* и aberrантного метилирования оставшейся части локуса *FZD9*. Эти данные, а также клиническая эффективность гипометилирующих препаратов у больных МДС высокого риска и ОМЛ с aberrациями хромосом 5 и 7 [31] позволяют считать целесообразным включение указанных лекарственных средств в арсенал терапевтических пособий для лечения больных ОМЛ старше 60 лет. При высокой частоте повреждений длинного плеча хромосомы 5 у пожилых пациентов с развернутыми стадиями МДС и ОМЛ может оказаться перспективной комбинация гипометилирующих и иммуномодулирующих препаратов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о схожести кариотипов у некоторых пациентов пожилого возраста с МДС и ОМЛ. Это позволяет предположить идентичность биологических механизмов формирования и развития патологического клона у больных МДС и ОМЛ старшего возраста и рассматривать ряд лекарственных препаратов, используемых для лечения больных МДС, в качестве перспективных средств для лечения больных ОМЛ пожилого возраста в случае невозможности или неэффективности проведения стандартной цитостатической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292–302.
2. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–51.
3. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1982; 51: 189–99.
4. Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M. et al. International scoring system for evaluation prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–88.
5. Malcovati L., Germing U., Kuendgen A. et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 3503–10.
6. Boehrer S. Pathogenesis and therapeutic targets in myelodysplastic syndromes. *Hematol. Educ.* (Education program for the annual congress of the European Hematology Association) 2008: 76–82.
7. Look A.T. Molecular pathogenesis of MDS. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 2005: 156–60.
8. Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1908–15.

9. Bacher U., Kern W., Schnittger S. et al. Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005; 90: 1502–10.
10. List A.F., Vardiman J., Issa J.P., DeWitte T.M. Myelodysplastic syndromes. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 2004: 297–317.
11. Keith T., Araki Y., Ohyagi M. et al. Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Br. J. Haematol.* 2007; 137: 206–15.
12. Sekeres M. Treatment of MDS: something old, something new, something borrowed. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 2009: 656–63.
13. Sorror M.L., Sandmaier B.M., Storer B.E. et al. Comorbidity and disease status-based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 4246–54.
14. Zipperer E., Pelz D., Nachtkamp K. et al. The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for the patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2009; 94: 729–32.
15. Erba H.P. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 2007: 420–8.
16. Fidler C., Watkins F., Bowen D. et al. NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica* 2004; 89: 865–6.
17. Bacher U., Haferlach T., Kern W. et al. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 744–52.
18. Georgiou G., Karali V., Zouvelou C. et al. Serial determination of FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome patients at diagnosis, follow-up or acute myeloid leukaemia transformation: incidence and their prognostic significance. *Br. J. Haematol.* 2006; 134: 302–6.
19. Breccia M., Mengarelli A., Mancini M. et al. Myelodysplastic syndromes in patients under 50 years old: a single institution experience. *Leuk. Res.* 2005; 29: 749–54.
20. Bernasconi P., Klersy C., Boni M. et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia* 2005; 19: 1424–31.
21. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2008; 87: 515–26.
22. Pozdnyakova O., Miron P.M., Tang G. et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1029 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2008; 113: 3331–40.
23. Sole F., Luno E., Sanzo C. et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 998 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90: 1168–78.
24. Farag S.S., Archer K.J., Mrozek K. et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 2006; 108: 63–73.
25. Frohling S., Schlenk R.F., Kayser S. et al. Cytogenetics and age are the major determinant of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from the AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* 2006; 108: 3280–8.
26. von Holt B., Breems D.A., Beverloo H.B. et al. Various distinctive abnormalities with acute myeloid leukemia aged 60 years and older express adverse prognostic value: results from a prospective clinical trial. *Br. J. Haematol.* 2006; 136: 96–105.
27. Rossi G., Plizzari A.M., Bellotti D. et al. Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients. *Leukemia* 2000; 14: 636–41.
28. Tien H.F., Tang J.L., Tsay W. et al. Methylation of the p17^{INK4B} gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 148–54.
29. Liu T.X., Becker M.W., Jelinek J. et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding a-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat. Med.* 2007; 13: 78–83.
30. Jiang Y., Dunbar A., Gondek L. et al. DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009; 113: 1315–25.
31. Ravandi F., Issa J.P., Garsia-Manero G. et al. Superior outcome with hypomethylating therapy in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome and chromosome 5 and 7 abnormalities. *Cancer* 2009; 115: 5746–51.

Позитронно-эмиссионная томография: уточнение стадии болезни при злокачественных лимфомах

И.П. Асланиди¹, О.В. Мухортова¹, И.В. Шурупова¹, Е.П. Деревянко¹,
Т.А. Катунина¹, А.В. Пивник², Д.Л. Строяковский³

Positron emission tomography for staging of patients with malignant lymphomas

I.P. Aslanidis¹, O.V. Mukhortova¹, I.V. Shurupova¹,
E.P. Derevyanko¹, T.A. Katunina¹, A.V. Pivnik²,
D.L. Stroyakovskiy³

SUMMARY

Recently positron emission tomography (PET) has been widely used in patients with malignant lymphomas. Metabolic information supplied by PET is crucial for accurate staging and appropriate treatment choice for some patients. 2-[¹⁸F] fluoro-2-deoxy-D-glucose (¹⁸F-FDG) mostly used for PET is not a tumor-seeking radiopharmaceutical. This fact could influence the accuracy of ¹⁸F-FDG PET results and should be taken into account in different clinical cases. **Purpose:** To evaluate PET results accuracy for staging in malignant lymphomas patients and impact of these data on patient management. **Materials and methods:** PET results of 226 patients with malignant lymphomas of different histological types were analyzed retrospectively. The patients were studied by standard whole-body PET protocol either at primarily diagnostic or at relapse. **Results:** Disease staging by PET and conventional diagnostic methods was identical in 72% patients, 28% showed discordant results. Definitive analysis of the latter revealed that 20% were correctly staged by PET (15% — upstaged, 5% — downstaged) and 8% were correctly staged by conventional methods. The accuracy in staging for PET was 92% compared to 80% for conventional methods. According to PET results treatment strategy was changed in 14% of patients: the treatment was intensified in 11%, reduced in 2% and canceled in 1%. **Conclusions:** The accuracy of PET for staging in malignant lymphomas patients is higher than the accuracy of conventional diagnostic methods. PET and conventional methods provide complementary data and should be used in conjunction. Based on PET results the stage of disease was defined more accurately in 24% of patients with aggressive lymphomas and Hodgkin's disease leading to change in treatment strategy for most of them. The influence of PET results on stage changing and following treatment for the patients with mature cell lymphomas was minimal.

Keywords

positron emission tomography, malignant lymphomas, staging.

¹ Bakoulev Center for Cardiovascular Surgery RAMS, Moscow

² Physicians Advanced Training Institute, Pirogov National Medical Surgery Center, Moscow

³ Moscow Oncology Hospital No. 62, Moscow area, Krasnogorskiy region

Контакты: petom@mail.ru

Принято в печать: 27 апреля 2010 г.

РЕФЕРАТ

В последние годы позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) стала широко применяться у пациентов со злокачественными лимфомами. У некоторых больных метаболическая информация, получаемая при ПЭТ, имеет определяющее значение для уточнения стадии заболевания и выбора лечения. Однако использование ¹⁸F-фтордезоксиглюкозы (¹⁸F-ФДГ), которая не является туморотропным препаратом, влияет на точность результатов ПЭТ и диктует необходимость учета особенностей интерпретации результатов ПЭТ в различных клинических ситуациях.

Цель. Оценка точности результатов ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ при определении распространенности заболевания у больных со злокачественными лимфомами и их влияния на последующее лечение.

Материал и методы. Ретроспективно проанализированы результаты ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ у 226 больных со злокачественными лимфомами различных гистологических типов, обследованных при первичной диагностике или при диагностике рецидива. ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ выполнялась по стандартному протоколу в режиме обследования всего тела.

Результаты. При оценке стадии заболевания у 72% больных получены идентичные результаты ПЭТ и других традиционно используемых методов диагностики (ТМД), у 28% больных — противоречивые данные. Окончательный анализ свидетельствовал, что у 20% больных стадия была корректно определена по данным ПЭТ (у 15% — повышена, у 5% — понижена), у 8% — по результатам ТМД. Точность ПЭТ в определении стадии заболевания составила 92%, точность комплекса ТМД — 80%. Изменение стадии в соответствии с данными ПЭТ повлияло на выбор лечения у 14% больных: у 11% — лечение было интенсифицировано, у 2% — редуцировано, у 1% — отменено.

Выводы. По точности ПЭТ превосходит ТМД в оценке распространенности заболевания у больных со злокачественными лимфомами. ПЭТ и ТМД имеют взаимодополняющее значение. В обследованной группе пациентов данные ПЭТ позволили уточнить стадию заболевания у 24% больных с агрессивными лимфомами и лимфомой Ходжкина, что привело к изменению лечения у большинства из них. У пациентов со зрелоклеточными лимфомами влияние результатов ПЭТ на изменение стадии заболевания и последующее лечение минимально.

Ключевые слова

позитронно-эмиссионная томография, злокачественные лимфомы, оценка распространенности.

¹ Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН, Москва

² Институт усовершенствования врачей Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова, Москва

³ Московская городская онкологическая больница №62, Московская обл., Красногорский р-н

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные лимфомы — гетерогенная группа злокачественных лимфопролиферативных опухолей, различающихся по морфологическому строению, биологическим свойствам, клиническим проявлениям, течению и прогнозу.

В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в лечении больных со злокачественными лимфомами. В зависимости от стадии заболевания 80–90 % больных с лимфомой Ходжкина (ЛХ) и 40–50 % больных с агрессивными лимфомами признаны потенциально курабельными [1, 2]. Использование интенсивных программ лечения привело к увеличению частоты заболеваний, индуцированных предшествующей терапией (вторичные опухоли, органная токсичность), что существенно влияло не только на качество, но и на продолжительность жизни больных [3, 4]. Задача создания малотоксичных программ терапии стала чрезвычайно актуальной. Эффективность использования подобных программ, возможность индивидуализации лечения и уменьшения вероятности развития тяжелых побочных эффектов зависят от точного определения исходных прогностических факторов у каждого больного [1, 2, 5]. Один из важных прогностических факторов для больных со злокачественными лимфомами — распространенность опухоли [6]. Точное первоначальное определение стадии заболевания позволяет оптимально скорректировать лечебный план.

В настоящее время при определении стадии заболевания у больных со злокачественными лимфомами помимо клинико-лабораторного обследования и трепанобиопсии костного мозга (ТБКМ) обязательной процедурой считается рентгеновская компьютерная томография (РКТ). Применяются также другие методы диагностической визуализации: рентгенография, сцинтиграфия с цитратом галлия-67, ультразвуковое сканирование (УЗИ), при необходимости — магнитно-резонансная томография (МРТ).

В последние годы этот диагностический комплекс дополнился позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ) — современным методом метаболической визуализации. Применение ПЭТ с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой (¹⁸F-ФДГ) для определения стадии лимфом имеет ряд преимуществ по сравнению с перечисленными выше диагностическими методами структурной визуализации. ПЭТ позволяет оценить метаболическую активность опухоли. Эта информация может иметь принципиальное значение, например, при выборе места для биопсии, при подозрении на трансформацию зрелоклеточной лимфомы в агрессивную, на рецидив заболевания в области резидуального очага [7]. Кроме того, при ПЭТ выполняется обследование всего тела, что особенно важно при оценке распространенности процесса. Однако диагностическая точность ПЭТ зависит от метаболической активности опухоли и существенно различается у больных с агрессивными и зрелоклеточными лимфомами [7]. Цель исследования — оценка диагностической точности ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ при определении распространенности заболевания у пациентов со злокачественными лимфомами и влияния результатов ПЭТ на последующее лечение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 226 больных со злокачественными лимфомами, обследованных в ПЭТ-центре НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева с 2002 по 2009 г. У всех больных диагноз был верифицирован гистологически, 84 пациента страдали ЛХ, у 95 больных определялись агрессивные лимфомы (диффузная В-крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома III цитологического типа, беркитто-

подобные лимфомы, лимфома зоны мантии) и у 47 больных — различные гистологические типы зрелоклеточных лимфом (фолликулярные лимфомы I–II типа, лимфома маргинальной зоны, лимфома из малых лимфоцитов). ПЭТ выполнялась для оценки распространенности заболевания при первичном определении стадии ($n = 138$) или при выявлении рецидива ($n = 88$). Характеристика больных представлена в табл. 1.

У всех больных стадию заболевания определяли с помощью комплекса традиционных методов диагностики (ТМД). В зависимости от локализации первичного патологического процесса данный комплекс включал различные процедуры: клинико-лабораторное исследование, рентгенография грудной клетки, РКТ грудной клетки, брюшной полости, забрюшинного пространства, таза, ТБКМ, УЗИ, сцинтиграфия с ⁶⁷Ga-цитратом, остеосцинтиграфия, консультация ЛОР-специалиста, гастроскопия, колоноскопия, МРТ и рентгенография отдельных анатомических областей.

У всех пациентов, включенных в исследование, выполнению ПЭТ предшествовала РКТ с внутривенным контрастированием. 58 (26 %) больным была проведена РКТ, включавшая исследование трех основных анатомических областей: грудная клетка, брюшная полость с забрюшинным пространством и таз. РКТ двух областей была выполнена 121 (53 %) больному: РКТ грудной клетки и брюшной полости — при первичной локализации процесса выше диафрагмы; при первичной локализации процесса ниже диафрагмы РКТ брюшной полости и таза сочеталась с рентгенографией грудной клетки. РКТ только одной из указанных анатомических областей была выполнена 47 (21 %) больным, однако всем этим больным проводилось УЗИ не исследованных при РКТ анатомических областей.

Из 226 больных 141 (62 %) выполнялось различного объема УЗИ. Комплексное обследование, включающее УЗИ периферических лимфоузлов, шеи, органов грудной клетки, брюшной полости, забрюшинного пространства и таза, было проведено у 62 (27 %) пациентов. УЗИ периферических лимфоузлов выполнено 23 (10 %) больным, брюшной полости и забрюшинного пространства — 47 (21 %), исследование прочих анатомических областей (молочных желез, яичек, мягких тканей) — 9 (4 %) больным.

Результаты методов структурной диагностики оценивались по общепринятым стандартным критериям, при нодаль-

Таблица 1. Характеристика больных ($n = 226$)

Показатель	Число больных
Мужчины/женщины	92/134
Возраст, годы	16–73
Средний	41
ЛХ*	84 (37 %)
Агрессивные лимфомы, в т. ч.	95 (42 %)
Диффузная В-крупноклеточная лимфома	39
Фолликулярная лимфома III типа	14
Беркиттоподобные лимфомы	7
Лимфома зоны мантии	4
Прочие	9
Зрелоклеточные лимфомы, в т. ч.	47 (21 %)
Фолликулярные лимфомы I–II типа	27
Лимфома маргинальной зоны	12
Лимфома из малых лимфоцитов	5
Прочие	3
Цель ПЭТ	
Первичное стадирование	138
Оценка распространенности при рецидиве	88

* Гистологические варианты ЛХ ($n = 84$): нодулярный склероз ($n = 57$), смешанноклеточный ($n = 15$), лимфоидное истощение ($n = 3$), лимфоидное преобладание ($n = 4$), не определен ($n = 5$).

ном поражении — по максимальному размеру лимфоузла по его короткой оси.

Сцинтиграфия с ⁶⁷Ga-цитратом выполнялась 38 (17 %) больным: 21 — с ЛХ и 17 — с неходжкинскими лимфомами.

ТБКМ проведена 175 (77 %) больным: 172 — из подвздошной кости, 3 — из очагов костного поражения иной локализации, 5 — билатеральное исследование.

Перечисленные выше исследования и ПЭТ проводились с интервалом 5–26 дней (в среднем 17 дней).

ПЭТ выполнялась по стандартному протоколу натощак или после 6-часового голодания и более при уровне глюкозы в крови, не превышающем 7 ммоль/л, приема 10 мг анаприлина внутрь, после гидратации (1 л воды внутрь) и дегидратации (1–2 мл лазикса в/в), через 60–90 мин после в/в введения 350–400 МБк ¹⁸F-ФДГ. Протокол исследования включал обследование от мочки уха до верхней трети бедра. Для сбора данных использовался позитронно-эмиссионный томограф ECAT EXACT 47 фирмы Siemens с пространственным разрешением на фантоме 5 мм, полем виденья 16,2 см. Запись изображения выполнялась в режиме 2D с продолжительностью эмиссионного скана 7 мин и 3-минутным трансмиссионным сканом. Реконструкция изображения проводилась по итерационному алгоритму с использованием фильтра Gaussian. Обработку данных осуществляли с применением пакета программного обеспечения Siemens ECAT 7.2.1.

Результаты ПЭТ оценивались визуально по виртуальному трехмерному изображению, а также по 5- и 7-мм срезам во фронтальной, сагиттальной и трансаксиальной плоскостях. Очаг повышенного накопления ¹⁸F-ФДГ расценивался как патологический, если он определялся в областях, не связанных с физиологическим накоплением (миокард, голосовые связки, тимус и т.д.) или выведением препарата (чашечно-лоханочная система почек, мочеточники, мочевой пузырь). Диффузное накопление ¹⁸F-ФДГ в селезенке или в скелете, превышающее по интенсивности таковое в паренхиме печени, расценивалось как патологическое (при отсутствии в анамнезе терапии стимуляторами кроветворения в течение 3 мес., предшествующих обследованию). Диффузное накопление ¹⁸F-ФДГ в печени, превышающее по интенсивности таковое в скелете, также расценивалось как патологическое.

Согласно исследованию V.J. Lowe и соавт., для дифференциальной диагностики доброкачественного и злокачественного процесса визуальная оценка ПЭТ изображения так же точна, как и полуколичественный анализ интенсивности накопления ¹⁸F-ФДГ в патологическом очаге с расчетом значения SUV (standardized uptake value — стандартизованное значение накопления) [8]. Однако у больных с подозрением на рецидив заболевания в зоне резидуальной массы помимо визуальной оценки при необходимости проводился полуколичественный анализ с определением SUV_{max}. Расчет SUV_{max} осуществлялся по трансаксиальным срезам тол-

щиной 7 мм с учетом времени и активности введенного радиофармпрепарата (РФП) с поправкой на радиоактивный распад, массы тела и роста пациента. Значение SUV_{max} в патологическом очаге гиперметаболической активности выше 2,5 расценивалось как более характерное для специфического поражения [9].

Стадия заболевания устанавливалась на основании изолированной оценки либо данных ПЭТ (ПЭТ-стадия), либо комплекса клинических данных и результатов указанных традиционных методов диагностики (ТМД-стадия).

Положительные данные ПЭТ в отношении поражения какой-либо области, совпадающие с клиническими данными и результатами других диагностических процедур, расценивались как истинно положительные результаты, свидетельствующие о специфическом поражении. Отрицательные данные ПЭТ в отношении состояния какой-либо области, совпадающие с клиническими данными и результатами других диагностических процедур, считались истинно отрицательными и свидетельствовали об отсутствии специфического поражения.

При несовпадении результатов ПЭТ и других методов диагностики для окончательного суждения о вовлечении определенной области в специфический процесс и определения стадии заболевания проводился их пересмотр, сопоставление их с клиническими данными. Кроме того, верификация первоначальных результатов осуществлялась в процессе динамического наблюдения за больными при сопоставлении первичных с данными повторных исследований (ПЭТ, РКТ, УЗИ), выполненных на этапах лечения. Из областей с противоречивыми данными в анализ были включены только те, оценка состояния которых могла изменить стадию заболевания. Пациентам, у которых сомнительные результаты могли повлиять на лечебный план, проводили дополнительные исследования (РКТ, УЗИ, МРТ и рентгенография отдельных анатомических областей), 2 больным была выполнена пункционная биопсия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентичные результаты ПЭТ и ТМД в установлении стадии заболевания были получены у 163 (72 %) из 226 больных. В 63 (28 %) случаях были противоречивые результаты ПЭТ и ТМД, влияющие на определение стадии: у 20 пациентов ТМД свидетельствовали о более высокой по сравнению с ПЭТ стадии процесса, у 43 пациентов более высокая стадия заболевания определялась по результатам ПЭТ.

Окончательное определение стадии заболевания показало, что у 46 из 63 больных с противоречивыми результатами (20 % общего числа больных) стадия была корректно определена по данным ПЭТ: у 35 (15 %) больных она была изменена в сторону повышения, у 11 (5 %) — в сторону понижения (табл. 2). У остальных 17 пациентов

Таблица 2. Результаты окончательного стадирования и изменения лечения больных в соответствии с данными ПЭТ (n = 226)

	Всего 63/226 (28%)	ЛХ 25/84 (30%)	АЛ 30/95 (32%)	ЗЛ 8/47 (17%)
Изменение стадии	46/226 (20%)	20/84 (24%)	23/95 (24%)	3/47 (6%)
Повышение	35 (15%)	14 (17%)	19 (20%)	2 (4%)
Понижение	11 (5%)	6 (7%)	4 (4%)	1 (2%)
Изменение лечения	32/226 (14%)	17/84 (20%)	14/95 (15%)	1/47 (2%)
Интенсификация	25 (11%)	14 (17%)	11 (12%)	—
Редукция	4 (2%)	2 (2%)	2 (2%)	—
Отмена	3 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (2%)
Ложноотрицательные результаты ПЭТ	9/226 (4%)	3 (4%)	3 (3%)	3 (6%)
Ложноположительные результаты ПЭТ	8/226 (3%)	2 (2%)	4 (4%)	2 (4%)

Сокращение: АЛ — агрессивная лимфома; ЗЛ — зрелоклеточная лимфома.

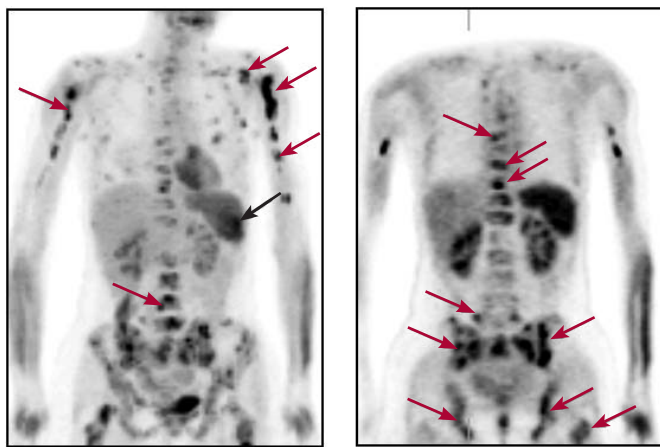


Рис. 1. Больной П., 36 лет. Диффузная В-крупноклеточная лимфома. По данным УЗИ заподозрен рецидив заболевания в селезенке (одна из областей первичного поражения). При ПЭТ помимо поражения селезенки (черная стрелка) выявлены множественные специфические изменения в скелете (красные стрелки). Полифокальный тип поражения позволяет заподозрить поражение костного мозга

с противоречивыми результатами ПЭТ и ТМД (7 % общего числа больных) окончательное стадирование показало, что данные ПЭТ оказались ложноотрицательными у 9 больных (стадия была занижена) и ложноположительными — у 8 (стадия была завышена), что дало основание в этих 17 случаях установить окончательную стадию заболевания соответственно ее первоначальной оценке по результатам ТМД.

Изменение стадии в соответствии с результатами ПЭТ повлияло на последующее лечение у 32 из 46 больных, что составило 14 % от числа пациентов, включенных в исследование: у 25 (11 %) — лечение было интенсифицировано, у 4 (2 %) — редуцировано, у 3 (1 %) больных результаты ПЭТ позволили исключить заподозренный на основании данных ТМД рецидив заболевания и отменить первоначально запланированное лечение.

Среди 17 пациентов с ложноположительными и ложноотрицательными результатами ПЭТ некорректное стадирование могло бы повлиять на лечение у 8 больных, что составило 3 % от общего числа пациентов: в 6 случаях лечение было бы интенсифицировано, в 1 — редуцировано, в 1 — отменено.

На рис. 1 продемонстрированы возможности ПЭТ в диагностике поражения скелета и костного мозга, на рис. 2 — преимущества ПЭТ перед другими методами диагностики, связанные с одномоментным обследованием всего тела.

Было проанализировано влияние результатов ПЭТ на окончательное определение стадии заболевания и последующее лечение в группах больных с различными гистологическими типами лимфом: ЛХ, агрессивными и зрелоклеточными лимфомами.

Группа пациентов с лимфомой Ходжкина (n = 84)

В группе больных ЛХ у 59 (70 %) из 84 больных результаты ПЭТ и ТМД в определении стадии заболевания совпали, у 25 (30 %) — были противоречивыми. Окончательное стадирование показало, что у 20 из 25 пациентов корректными в определении стадии были результаты ПЭТ, что составило 24 % от общего числа больных ЛХ. У 5 пациентов (6 % от общего числа больных ЛХ) корректными в определении стадии были результаты ТМД. В соответствии с результатами ПЭТ стадия заболевания была повышена в 14 (17 %) из 20 случаев и понижена — в 6 (7 %). В соответствии с результатами ТМД у 3 (4 %) из 5 пациентов стадия заболевания была повышена (ложноотрицательные результаты ПЭТ)

и у 2 (2 %) — понижена (ложноположительные результаты ПЭТ) (см. табл. 2).

Таким образом, в группе из 84 больных ЛХ точность¹ ПЭТ в определении стадии заболевания составила 94 %, точность комплекса ТМД — 76 %.

Изменение стадии по результатам ПЭТ привело к изменению первоначально запланированного лечения у 17 из 20 больных, что составило 20 % от общего числа больных ЛХ: у 14 (17 %) — лечение было интенсифицировано, у 2 (2 %) — редуцировано, у 1 (1 %) — исключен рецидив заболевания и вместо планируемого лечения было продолжено наблюдение.

Некорректная интерпретация стадии заболевания в соответствии с ложноположительными и ложноотрицательными результатами ПЭТ могла бы привести к изменению лечения у 2 из 5 больных (у обоих в сторону интенсификации), что составило 2 % от общего числа больных ЛХ. Рис. 3 демонстрирует возможности ПЭТ для выявления дополнительных очагов поражения.

Группа пациентов с агрессивными лимфомами (n = 95)

В группе с агрессивными лимфомами у 60 (68 %) из 95 пациентов результаты ПЭТ и ТМД в определении стадии заболевания совпадали, у 30 (32 %) — получены противоречивые результаты ПЭТ и ТМД. Окончательное стадирование показало, что у 23 из 30 больных корректными в определении стадии были результаты ПЭТ, что составило 24 % от общего числа пациентов с агрессивными лимфомами. У 7 больных (7 % от общего числа больных в группе) корректными в определении стадии были результаты ТМД.

Из 23 пациентов с корректным по данным ПЭТ определением объема поражения у 19 (20 % от числа пациентов с агрессивными лимфомами) стадия заболевания была повышена, а у 4 (4 % от числа пациентов с агрессивными лимфомами) — понижена. В соответствии с результатами ТМД у 3 из 7 больных стадия заболевания была повышена (т.е. ложноотрицательные результаты ПЭТ составили 3 %) и у

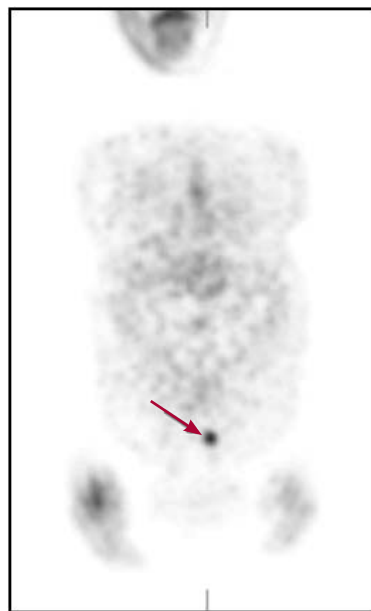
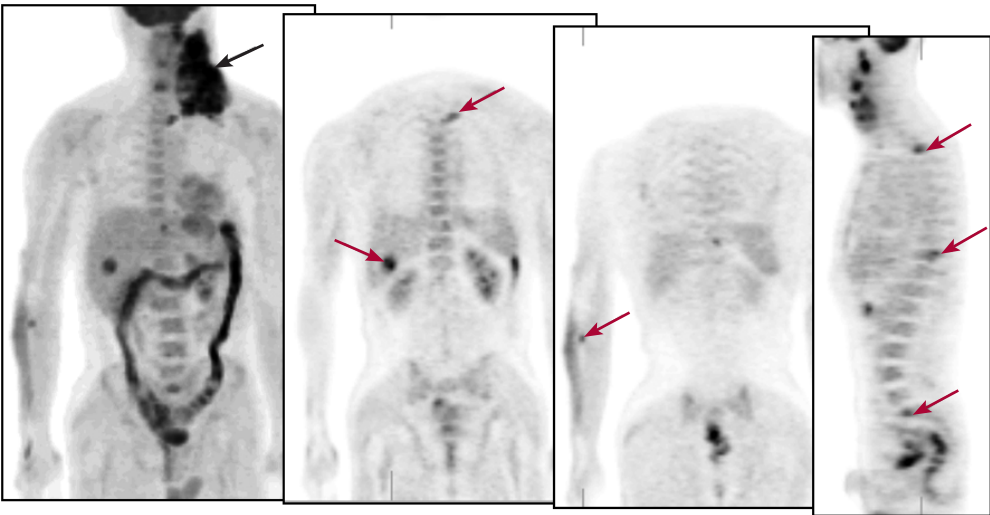


Рис. 2. Больной Б., 48 лет. Т-клеточная лимфома. Через 3 мес. после завершения лечения появился кожный зуд. По данным РКТ грудной клетки, брюшной полости и таза признаков рецидива заболевания не было. При ПЭТ выявлен очаг активной специфической ткани (впоследствии верифицированный морфологически) в передней брюшной стенке

¹ Диагностическая точность метода — доля правильных результатов (сумма истинно положительных и истинно отрицательных результатов), выявленных анализируемым методом, среди всех результатов.

Рис. 3. Больной З., 31 год. Лимфома Ходжкина, нодулярный склероз I типа (NSI), IIA стадия с поражением левых шейных, над- и подключичных лимфоузлов. При РКТ брюшной полости выявлен солитарный очаг в печени неясного генеза. ПЭТ выполнялась до начала лечения с целью уточнить стадию заболевания: помимо известных изменений в левых шейной, над- и подключичной областях (черная стрелка) подтвержден специфический характер изменений в печени, выявлены множественные очаги специфической ткани в скелете (красные стрелки). Стадия заболевания изменена на IVA, лечение интенсифицировано



4 — понижена (ложноположительные результаты ПЭТ составили 4 %) (см. табл. 2).

Таким образом, в группе из 95 пациентов с агрессивными лимфомами точность ПЭТ в определении стадии заболевания составила 93 %, точность комплекса ТМД — 76 %.

Изменение стадии в соответствии с результатами ПЭТ привело к изменению первоначально запланированного лечения у 14 из 23 больных, что составило 15 % от общего числа пациентов с агрессивными лимфомами: у 11 (12 %) — лечение было интенсифицировано, у 2 (2 %) — редуцировано, у 1 (1 %) — отменено.

Изменение стадии заболевания в соответствии с ложноположительными и ложноотрицательными результатами ПЭТ могло бы привести к изменению лечения у 4 из 7 больных с агрессивными лимфомами, что составило 4 % от общего числа пациентов в группе: у 1 — в сторону сокращения интенсивности, у 2 — в сторону интенсификации, у 1 больного с рецидивом заболевания, который не был подтвержден при ПЭТ, лечение было отменено.

Группа пациентов со зрелоклеточными лимфомами (n = 47)

В группе больных со зрелоклеточными лимфомами у 39 (83 %) из 47 результаты ПЭТ и ТМД в определении стадии заболевания совпадали, у 8 больных (17 % от числа пациентов в группе со зрелоклеточными лимфомами) были получены противоречивые результаты ПЭТ и ТМД. Окончательное стадирование показало, что в 3 из 8 случаев корректными в определении стадии были результаты ПЭТ, что составило 6 % от числа больных в группе. У 5 пациентов (10 % от числа пациентов в группе) корректными в определении стадии были результаты ТМД.

В соответствии с результатами ПЭТ стадия заболевания была повышена у 2 больных (4 % от числа пациентов в груп-

пе) и понижена — у 1 (2 % от числа пациентов в группе). В соответствии с результатами ТМД у 3 (6 % от числа пациентов в группе) из 5 больных стадия заболевания была повышена (ложноотрицательные результаты ПЭТ) и у 2 (4 % от числа пациентов в группе) — понижена (ложноположительные результаты ПЭТ) (см. табл. 2).

Таким образом, в группе из 47 больных со зрелоклеточными лимфомами точность ПЭТ в определении стадии заболевания составила 89 %, точность комплекса ТМД — 94 %.

Изменение стадии в соответствии с результатами ПЭТ привело к изменению первоначально запланированного лечения у 1 из 3 пациентов, что составило 2 % от общего числа пациентов со зрелоклеточными лимфомами: результаты ПЭТ у больной с фолликулярной лимфомой II цитологического типа позволили исключить рецидив заболевания в Th_{xi} позвонке, заподозренный по результатам МРТ, и отменить запланированное лечение.

Изменение стадии заболевания в соответствии с ложноотрицательными результатами ПЭТ могло бы привести к изменению лечения у 2 больных со зрелоклеточными лимфомами (у обоих в сторону интенсификации), что составило 4 % от общего числа пациентов в группе.

Анализ ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЭТ и ТМД

Из 63 пациентов с противоречивыми результатами ТМД и ПЭТ окончательная оценка показала, что в 46 (73 %) случаях корректными в отношении определения стадии заболевания оказались данные ПЭТ, а в 17 (27 %) — данные ТМД.

Таким образом, в общей группе из 226 больных точность ПЭТ в определении стадии заболевания составила 92 %, точность комплекса ТМД — 80 %. Полученные данные свидетельствуют, что в группах пациентов с ЛХ и агрессивными

Таблица 3. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты ПЭТ и ТМД у больных с дискордантными данными (n = 63)

Локализация	Результаты ПЭТ		Результаты ТМД		Итого
	Ложноотрицательные	Ложноположительные	Ложноотрицательные	Ложноположительные	
Лимфоузлы	2	4	12	8	26
Периферические	2	2	1	2	7
Медиастинальные	—	2	3	1	6
Забрюшинные	—	—	3	5	8
Ворот печени и селезенки	—	—	5	—	5
Экстранодальное поражение	7	4	23	3	37
Селезенка, печень	1	-	8	2	11
Костный мозг/скелет	3	1	12	1	17
Прочие	3	3	3	—	9
Всего	9	8	35	11	63

лимфомами точность результатов ПЭТ превышает таковую ТМД в определении стадии заболевания (93 и 94 % для ПЭТ vs 76 % для ТМД). У пациентов со зрелоклеточными лимфомами результаты ПЭТ имеют меньшее значение, т. к. их точность уступает данным ТМД (89 и 94 % соответственно).

Данные о ложноположительных и ложноотрицательных результатах ПЭТ и ТМД представлены в табл. 3. Среди 17 больных с некорректными результатами ПЭТ ложноотрицательные данные были получены в 9 (53 %) случаях, ложноположительные — в 8 (47 %). У 6 (35 %) из 17 пациентов некорректно было интерпретировано поражение лимфатических узлов (подмышечные, паховые и медиастинальные лимфоузлы), у 11 (65 %) — очаги экстранодального поражения. При экстранодальном поражении ложноотрицательные результаты ПЭТ были получены у больных при вовлечении в процесс костного мозга, легких, почки, кишечника и селезенки. Ложноположительные результаты ПЭТ при экстранодальном поражении определялись в надпочечнике, небной миндалине, кишечнике. У одного больного определялся очаг накопления РФП в шейном позвонке, что было интерпретировано как солитарное поражение скелета, однако результаты МРТ свидетельствовали о наличии выраженных обменно-дегенеративных изменений в указанной области.

В подгруппе с некорректными данными ТМД ($n = 46$) преобладали больные с ложноотрицательными результатами ($n = 35$, 76 %), ложноположительные данные были получены в 11 (24 %) случаях. Поражение лимфоузлов было некорректно интерпретировано у 20 (43 %) пациентов, экстранодальное поражение — у 26 (57 %). При поражении лимфоузлов по данным ТМД ложные результаты получены у 8 больных в оценке состояния забрюшинных лимфоузлов, у 5 — в оценке состояния лимфоузлов ворот печени и селезенки, у 4 — лимфоузлов средостения, у 3 — лимфоузлов периферической локализации. Как видно из представленных данных, при использовании комплекса ТМД наибольшие сложности возникают в оценке состояния лимфоузлов брюшной полости и забрюшинного пространства (13 из 20 больных с ошибочной трактовкой состояния лимфоузлов). Применение ПЭТ позволяет идентифицировать поражение указанных групп лимфоузлов. Ложные результаты при оценке экстранодальных очагов получены при поражении костного мозга и скелета у 13 пациентов, печени и селезенки (как диффузного, так и очагового характера) — у 10, а также по одному больному при поражении мягких тканей, яичка, молочной железы.

В анализируемой подгруппе больных с дискордантными результатами ПЭТ и ТМД, влияющими на определение стадии или рестадирование, 65 % составили первичные больные (41 из 63). Среди 22 пациентов с рецидивами заболевания у 3 был заподозрен локальный рецидив в зоне первичного поражения. Окончательная оценка показала, что у 2 больных с локальными рецидивами в области резидуальной опухоли средостения и забрюшинного пространства корректными были результаты ПЭТ, у 1 больного с локальным рецидивом в кишечнике — данные ТМД. У остальных 19 пациентов с рецидивами заболевания были выявлены новые очаги специфической ткани вне зоны первичного поражения, поэтому точная оценка состояния этой области не влияла на результаты рестадирования (см. рис. 1).

Сопоставление результатов ПЭТ и скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом

Учитывая, что среди пациентов, включенных в исследование, значительному числу в комплексе ТМД проводилась скинтиграфия с ^{67}Ga -цитратом, мы сопоставили результа-

ты данной диагностической процедуры и ПЭТ. Скинтиграфия с ^{67}Ga -цитратом выполнялась 38 больным: 21 — с ЛХ, 12 — с агрессивными лимфомами и 5 — со зрелоклеточными лимфомами.

Ни у одного больного при скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом не было выявлено дополнительных очагов специфического поражения, не диагностированных при ПЭТ или при использовании других методов (РКТ, УЗИ).

При анализе информативности скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом в зависимости от локализации процесса оказалось, что из 22 пациентов с локализацией процесса выше диафрагмы у троих при скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом не были распознаны подмышечные и шейные лимфоузлы, идентифицированные как специфическое поражение по результатам других методов диагностики, включая ПЭТ. Среди остальных 16 больных с локализацией процесса по обе стороны диафрагмы при скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом процесс ниже диафрагмы был корректно идентифицирован только в 7 случаях. Нераспознанным осталось поражение забрюшинных, паховых лимфоузлов, печени и скелета.

У 3 из 38 больных анализируемой подгруппы были получены дискордантные результаты ПЭТ и ТМД (ПЭТ-положительное поражение скелета, забрюшинных лимфоузлов и РКТ-положительное поражение паховых лимфоузлов). Результаты скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом у этих 3 больных были отрицательными и при окончательном определении стадии заболевания трактовались как ложноотрицательные во всех 3 случаях.

При анализе информативности скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом в зависимости от гистологического типа лимфом результаты оценки распространенности процесса оказались некорректными у 4 из 5 больных со зрелоклеточными лимфомами, у 5 — с ЛХ и у 3 — с агрессивными лимфомами.

Таким образом, из 38 больных данной подгруппы только у 26 (68 %) результаты скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом позволили корректно оценить распространенность заболевания.

Точная оценка распространенности патологического процесса — принципиальный вопрос при всех заболеваниях. У больных ЛХ стадия заболевания определяет последующее лечение и прогноз [1]. У больных НХЛ важное значение при выборе лечения имеет наличие или отсутствие экстранодальных очагов поражения [5].

В настоящее время «золотым стандартом» при определении стадии заболевания у пациентов со злокачественными лимфомами признана РКТ. Метод широкодоступен, надежен, процедура неинвазивна, легко и быстро выполняема. РКТ-сканеры имеют высокое пространственное разрешение. Однако возможность получения только структурной информации и использование в качестве критерия вовлечения в патологический процесс анатомических размеров органа является основным и существенным недостатком применения РКТ у больных со злокачественными лимфомами [10, 11]. Результаты ряда исследований свидетельствуют, что до 71 % лимфоузлов нормального размера могут быть вовлечены в метастатический процесс [12, 13]. Поэтому выявление пораженных лимфоузлов, имеющих нормальный размер, остается неразрешимой задачей при использовании РКТ. С другой стороны, по данным РКТ дифференциальная диагностика между реактивной гиперплазией и специфическим поражением при выявлении одиночных увеличенных лимфоузлов чрезвычайно сложна. Использование внутривенного контрастирования в подобных случаях малоинформативно [14]. Перечисленные выше причины значительно влияют на точность результатов РКТ в диагностике поражения лимфоузлов у больных со злокачественными лимфомами.

ПЭТ — метод метаболической визуализации. Интенсивность накопления ^{18}F -ФДГ в органе или ткани отражает метаболические процессы, а не морфологические данные, поэтому наличие или отсутствие структурных изменений не определяют точность результатов ПЭТ. Исследования последних лет свидетельствуют, что, несмотря на высокую разрешающую способность методов структурной диагностики, существенно превышающую таковую ПЭТ, важность и точность метаболической информации, получаемой при ПЭТ, имеют большее клиническое значение, чем данные методов структурной диагностики [15–18].

Результаты серии исследований доказывают, что данные ПЭТ позволяют более точно по сравнению с другими диагностическими методами оценить распространенность заболевания у больных со злокачественными лимфомами. В работе F. Moog и соавт. у 8 % пациентов была повышена стадия заболевания на основании данных ПЭТ (группа из 60 пациентов: 27 — с ЛХ, 33 — с НХЛ) [16]. В ретроспективном исследовании H. Scholder и соавт. в соответствии с результатами ПЭТ стадия была изменена у 21 % больных [19]. В одном из последних исследований R. Naumann и соавт. сравнивали данные ПЭТ и методов структурной диагностики в группе из 88 больных ЛХ, в результате у 20 % из них по данным ПЭТ была изменена стадия заболевания [20].

Результаты нескольких исследований свидетельствуют, что в отличие от РКТ использование ПЭТ позволяет оценить состояние лимфоузлов нормального размера и выявить дополнительные очаги распространения заболевания, меняя стадию в сторону увеличения [7, 21]. В упомянутом выше исследовании F. Moog и соавт. на группе из 60 пациентов со злокачественными лимфомами показано, что результаты ПЭТ позволяют более точно по сравнению с РКТ диагностировать поражение лимфоузлов [16]. Из 25 дополнительных очагов поражения лимфоузлов, выявленных при ПЭТ, только 2 были ложноположительными. В следующем исследовании этих авторов сравнивались результаты ПЭТ и РКТ у 81 больного: 43 — с НХЛ, 38 — с ЛХ [22]. По данным ПЭТ дополнительно было выявлено 24 очага заболевания, причем 93 % из них были истинно положительными, только один из дополнительных очагов, идентифицированных при РКТ, был расценен как истинно положительный. В исследовании M. Bangerter и соавт. результаты ПЭТ полностью совпадали с данными других методов диагностики у 38 из 44 (86 %) больных, в 5 (11 %) случаях обнаружены дополнительные очаги распространения заболевания. В целом при ПЭТ точно идентифицированы все 128 очагов заболевания, выявленных другими методами диагностики, и 11 не диагностированных ранее оккультных очагов [23]. В следующем исследовании этой группы авторов, охватившем большее количество пациентов ($n = 89$), чувствительность¹ ПЭТ в определении стадии у больных со злокачественными лимфомами составила 98 %, специфичность² — 94 %, точность — 94 % [24]. Аналогичные результаты получены B. Hueltenschmidt и соавт.: в группе из 81 больного ЛХ точность ПЭТ в определении стадии составила 96 vs 56 % для традиционных методов диагностики [17].

Результаты настоящего исследования соответствуют приведенным выше данным литературы. При ПЭТ было выявлено больше очагов специфического поражения, чем при

использовании комплекса ТМД (145 и 37 дополнительных очагов соответственно). У 50 % пациентов результаты ПЭТ и других методов диагностики полностью совпадали. В 22 % случаев были выявлены дополнительные очаги распространения заболевания (большинство дополнительных очагов (17 % пациентов) было идентифицировано при ПЭТ), однако их диагностика не влияла на определение стадии. У остальных 28 % больных несоответствие патологических очагов, обнаруженных при ПЭТ и при использовании ТМД, вызвало противоречия в оценке стадии процесса. В этой подгруппе также преобладали больные с дополнительными патологическими очагами, диагностированными при ПЭТ: у 20 % пациентов стадия заболевания была корректно определена по результатам ПЭТ, у 8 % — по данным ТМД. Важно отметить, что при окончательном установлении стадии заболевания у многих пациентов пересмотр результатов используемых ранее методов диагностики позволял выявить очаги специфического поражения, определяемые при ПЭТ.

В настоящем исследовании сравнение точности ПЭТ и ТМД в выявлении поражения лимфоузлов свидетельствует, что у 6 больных получены некорректные результаты ПЭТ, тогда как результаты ТМД оказались некорректными у 20 больных. Ложноотрицательные и ложноположительные результаты ТМД получены преимущественно при оценке состояния забрюшинных лимфоузлов, лимфоузлов ворот печени и селезенки, а также медиастинальных лимфоузлов. Таким образом, результаты настоящего исследования соответствуют литературным данным. Частота ложноотрицательных и ложноположительных результатов ТМД, выявленная в настоящем исследовании, подтверждает низкую (около 50 %) чувствительность УЗИ в диагностике поражения забрюшинных и тазовых лимфатических узлов [25], сложность РКТ-диагностики поражения лимфоузлов ворот печени и селезенки [26].

Два ложноотрицательных результата ПЭТ при поражении лимфоузлов, полученных в настоящем исследовании, были обусловлены небольшим размером пораженных лимфоузлов (меньше разрешающей способности сканера), 4 ложноположительных результата — воспалительными изменениями в лимфоузлах.

Сравнение точности ПЭТ и ТМД в диагностике очагов экстранодального поражения показало, что у 11 больных получены некорректные результаты ПЭТ, у 26 — данные ТМД (преобладали ложноотрицательные результаты в оценке состояния селезенки, костного мозга и скелета).

Диагностика экстранодального поражения при злокачественных лимфомах у большинства пациентов влияет на выбор лечения. Частота поражения печени и селезенки у больных ЛХ составляет 3 и 23 %, у больных НХЛ — 15 и 22 % соответственно [27]. Инфильтрация печени и селезенки у пациентов со злокачественными лимфомами часто имеет диффузный тип. Увеличение органов может быть связано с портальной гипертензией и не свидетельствует о специфическом поражении паренхимы. Результаты ранних исследований показали, что при ЛХ только у $1/3$ больных с поражением селезенки размер органа увеличивался, у остальных — оставался нормальным или увеличивался незначительно [28]. Эти причины определяют низкую чувствительность всех методов структурной диагностики при оценке специфического поражения селезенки и печени. Так, чувствительность РКТ в диагностике поражения селезенки колеблется от 15 до 37 %, в диагностике поражения печени — от 19 до 33 % [25, 26], чувствительность МРТ в диагностике очагового поражения селезенки у первичных нелеченных больных не превышает 60 % и значительно ниже при диффузном типе поражения [29]. Метаболическая визуализация при ПЭТ существенно

¹ Чувствительность диагностического метода — процент истинно положительных результатов, выявленных анализируемым методом, среди всех положительных результатов.

² Специфичность диагностического метода — процент истинно отрицательных результатов, выявленных анализируемым методом, среди всех отрицательных результатов.

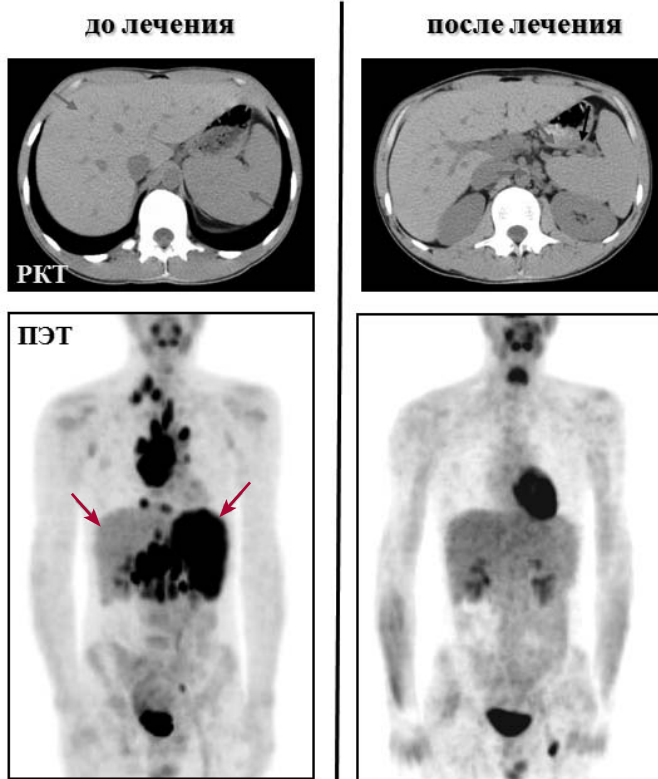


Рис. 4. Больной К., 29 лет. Лимфома Ходжкина, смешанно-клеточный вариант, IIIВ стадия, рецидив с массивным поражением шейно-надключичных, медиастинальных и забрюшинных лимфоузлов. По данным РКТ выявлена гепатоспленомегалия неясного генеза. При ПЭТ диффузно высокое накопление РФП в селезенке указывает на ее тотальное специфическое поражение, нормальный уровень накопления РФП в паренхиме печени позволяет исключить специфическое поражение и свидетельствует, что гепатомегалия обусловлена портальной гипертензией. После лечения определяется исчезновение активности специфической ткани по всем ранее выявленным очагам и нормализация накопления РФП в селезенке, что подтверждает первоначальное суждение о специфическом поражении селезенки

превосходит по точности данные структурных методов диагностики в оценке состояния печени и селезенки. Диффузное увеличение накопления РФП в паренхиме печени и селезенке при ПЭТ свидетельствует о специфическом характере поражения [30]. В настоящем исследовании у 10 больных результаты ПЭТ позволили уточнить состояние печени и селезенки при ложноположительных и ложноотрицательных результатах ТМД, причем у всех 10 больных эти данные влияли на определение стадии заболевания. На рис. 4 продемонстрированы возможности ПЭТ в диагностике диффузного поражения печени и селезенки.

Выявление поражения костного мозга у больных со злокачественными лимфомами свидетельствует о IV стадии заболевания и плохом прогнозе [31]. Для диагностики поражения костного мозга используется ТБКМ из крыла подвздошной кости. Главным недостатком ТБКМ является высокий процент ложноотрицательных результатов, особенно при очаговом поражении костного мозга [32]. МРТ — наиболее чувствительный метод диагностики поражения костного мозга, однако отсутствие возможности одновременного исследования всех отделов скелета снижает ее клиническое значение у пациентов со злокачественными лимфомами. РКТ для диагностики поражения костного мозга низкоинформативна и поэтому не применяется. [26].

ПЭТ позволяет выявить поражение скелета и костного мозга у больных со злокачественными лимфомами и отрицательными результатами ТБКМ, что подтверждается данными последующей прицельной биопсии или прицельной МРТ [33]. Тем не менее последние исследования показывают, что изолированное использование ПЭТ для диагностики

поражения костного мозга не является надежным у больных с инфильтрацией менее 10–20 % [34]. Более того, информативность ПЭТ в диагностике поражения костного мозга различна у больных с разными гистологическими типами злокачественных лимфом. Результаты ряда исследований свидетельствуют о наличии ложноотрицательных результатов ПЭТ в диагностике поражения костного мозга у больных со зрелоклеточными лимфомами [30, 35].

В настоящем исследовании результаты ПЭТ в оценке состояния костного мозга оказались некорректными у 3 больных (2 из 3 больных страдали зрелоклеточными лимфомами), тогда как данные ТМД были ложноотрицательными в 13 случаях, что согласуется с приведенными выше данными других исследований.

Анализ причин других ложноположительных и ложноотрицательных данных в настоящем исследовании свидетельствует, что полученные ошибочные результаты ПЭТ были обусловлены активным физиологическим накоплением РФП в отдельных органах (почке, кишечнике, надпочечнике), которое не позволило выявить их специфическое поражение, а также воспалительными изменениями (в лимфоузлах корней легких, миндалинах). Однако по данным ПЭТ были корректно диагностированы очаги специфического поражения редкой локализации, не выявленные ТМД (в молочной железе, яичке, мягких тканях передней брюшной стенки; см. рис. 2).

Большинство ложноположительных результатов ПЭТ с ^{18}F -ФДГ объясняется активным накоплением РФП во всех клетках с высоким уровнем гликолиза. Помимо злокачественных опухолей высокий уровень гликолиза определяется в очагах воспаления, инфекции, при гранулематозных процессах, саркоидозе, в буром жире [36, 37]. Увеличение активности тимуса, селезенки, костного мозга у больных со злокачественными лимфомами, индуцированное предшествующей гемостимулирующей терапией, также сопровождается повышением накопления ^{18}F -ФДГ [38, 39].

Для уменьшения количества ложноположительных результатов рекомендуется соблюдать определенные сроки выполнения ПЭТ у больных со злокачественными лимфомами после лечения: 3 нед. после завершения полихимиотерапии и 8–12 нед. после завершения лучевой терапии [40, 41]. Однако клиническое применение ПЭТ в ряде случаев диктует необходимость выполнения исследования в более короткие сроки после завершения лечения.

Основной причиной ложноотрицательных результатов ПЭТ служит предел разрешающей способности сканера, который для большинства используемых в клинических целях аппаратов составляет 10 мм. Однако необходимо помнить, что неправильная подготовка больного к исследованию (несоблюдение 6-часового периода голодания перед введением ^{18}F -ФДГ), нарушения протокола исследования (сокращение или увеличение периода накопления РФП, сокращение времени сбора данных, изменение параметров реконструкции и т.д.), качество ^{18}F -ФДГ и состояние сканера влияют на точность результатов ПЭТ [42]. Важное значение для получения качественного ПЭТ-изображения имеет время накопления РФП в организме больного. Укорочение интервала между введением РФП и началом сбора данных может стать причиной ложноотрицательных результатов, особенно при небольших очагах, близких по размеру к пределу разрешающей способности сканера. К. Kubota и соавт. показали, что выполнение ПЭТ через 2 ч после введения ^{18}F -ФДГ улучшало визуализацию опухолей различных гистологических типов, включая злокачественные лимфомы [43]. Другой причиной ложноотрицательных результатов ПЭТ может быть активное физиологическое накопление РФП в различ-

ных органах (желудке, кишечнике, почках, мочевом пузыре, головном мозге, миокарде, функционально активных яичниках и яичках, щитовидной железе), которое не позволяет выявить их специфическое поражение. Физиологическое накопление РФП может быть как диффузным, так и очаговым, различным по интенсивности [42]. Указанные факторы существенно влияют на точность данных ПЭТ у больных со злокачественными лимфомами с поражением указанных органов — результаты настоящего исследования подтверждают вышесказанное. Гипергликемия также бывает важной причиной ложноотрицательных результатов ПЭТ, т.к. ведет к появлению высокого уровня тканевого фона и снижению интенсивности накопления ^{18}F -ФДГ в опухоли [44]. Поэтому у больных, страдающих сахарным диабетом или с метаболическими нарушениями, следует ожидать снижение точности результатов ПЭТ с ^{18}F -ФДГ.

У больных со злокачественными лимфомами количество ложноотрицательных результатов зависит от гистологического типа опухоли. В исследовании R. Elstrom и соавт. чувствительность ПЭТ у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой составила 100 %, с ЛХ и фолликулярной лимфомой — 98 %, с лимфомой маргинальной зоны — 67 %, с периферической Т-клеточной лимфомой — 40 % [45]. В работе G. Jerusalem и соавт. у больных с мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой при ПЭТ было выявлено только 58 % зон поражения лимфоузлов, обнаруженных при РКТ. Однако у пациентов с фолликулярной лимфомой при ПЭТ зарегистрировано на 40 % больше зон нодулярного лимфатического поражения, чем при РКТ [35]. Результаты наблюдения М. Нойтманн и соавт. свидетельствуют о ложноотрицательных данных ПЭТ у 10 больных с экстранодальной лимфомой маргинальной зоны и корректных результатах ПЭТ у больных с лимфомой маргинальной зоны при поражении лимфоузлов [46, 47]. В ретроспективном исследовании K. P. Veal и соавт. у 42 больных с экстранодальными лимфомами маргинальной зоны при использовании очень низкого порогового значения SUV 1,4 результаты ПЭТ позволили выявить только 81 % очагов поражения [48]. Полученные данные позволяют говорить о различной гликолитической активности опухолей в пределах одного гистологического типа. Этот факт, вероятно, отражает известную вариабельность клинических проявлений и течения заболевания у пациентов с одинаковыми гистологическими типами злокачественных лимфом (например, при лимфомах маргинальной зоны с локальным экстранодальным и диссеминированным типами поражения).

Все исследователи сталкиваются с проблемой верификации данных ПЭТ, т.к. метаболически активные (ПЭТ-положительные) очаги могут не визуализироваться при использовании методов структурной диагностики. Очевидно, что невозможно выполнить биопсию всех ПЭТ-положительных очагов, так же как нельзя подвергнуть биопсии все патологические очаги, выявленные методами структурной диагностики, но не накапливающие РФП при ПЭТ. Наблюдение за больными может также оказаться малоинформативным; например, у больных со зрелоклеточными лимфомами локальный статус достаточно длительное время остается без каких-либо изменений. В исследовании C. S. Young и соавт., включавшем 45 пациентов, была предпринята попытка гистологической верификации полученных данных: у 11 пациентов все очаги, выявленные при ПЭТ и РКТ, подвергли гистологическому исследованию. Результаты ПЭТ позволили изменить стадию заболевания у 59 % больных [18].

Отсутствие возможности верификации всех очагов, выявленных при ПЭТ или применении комплекса ТМД в на-

стоящем исследовании, также не позволило определить показатели чувствительности и специфичности ПЭТ и ТМД в диагностике очагов специфического поражения. Определение очагов, характеризующих стадию процесса, свидетельствует, что точность ПЭТ в оценке стадии у больных со злокачественными лимфомами составила 92 %, точность комплекса ТМД — 80 %. При анализе данных в зависимости от гистологического типа опухоли получена одинаковая точность результатов ПЭТ в подгруппах пациентов с ЛХ и агрессивными лимфомами — 94 и 93 % соответственно, точность ТМД — 76 %. В подгруппе больных со зрелоклеточными лимфомами точность результатов ПЭТ была несколько ниже — 89 %, тогда как точность ТМД составила 94 %. Большой разброс точности результатов ПЭТ в подгруппе пациентов со зрелоклеточными лимфомами, полученный в настоящем и в приведенных выше исследованиях других авторов, вероятно, объясняется разнообразием клинических проявлений заболевания у пациентов данной подгруппы. Преобладание больных с определенной локализацией патологического процесса существенно влияет на точность результатов ПЭТ и других методов диагностики в подгруппе в целом.

Как свидетельствуют данные литературы, изменение стадии на основании результатов ПЭТ влияет на выбор лечения у больных со злокачественными лимфомами. В исследовании H. Schoder и соавт. в результате опроса клиницистов выявлено, что в соответствии с результатами ПЭТ изменение стадии заболевания у 44 % больных вызвало изменение вида терапии в 42 % случаев и у 10 % больных повлияло на интенсивность терапии [19]. Эти данные контрастируют с результатами исследования A. Wirth и соавт., в котором на основании результатов ПЭТ лечение было изменено у 18 % больных [49]. В исследовании F. Montravers и соавт. анализировалась группа детей с лимфомами. Результаты ПЭТ повлияли на лечение и дальнейшее наблюдение в 42 % случаев [50]. Большинство авторов полагают, что особо важное значение результаты ПЭТ имеют у пациентов с впервые диагностированными злокачественными лимфомами с клинически установленной I или II стадией заболевания, а также в группе пациентов, у которых предполагается проведение лучевой терапии [51]. Именно в этих группах больных выявление дополнительных очагов распространения заболевания может повлиять на последующее лечение — интенсивность химиотерапии, объем лучевой терапии [40, 41]. Особенно важна диагностика поражения лимфоузлов нормального размера, а также других скрытых очагов поражения, т.к. у больных с локальными стадиями злокачественных лимфом правильный выбор полей облучения определяет эффективность лучевой терапии и влияет на общую выживаемость [21].

В настоящем исследовании результаты ПЭТ повлияли на последующее лечение у 14 % (32 из 226) больных. В подгруппе ЛХ лечение было изменено в 17 случаях, что составило 20 % от числа пациентов в подгруппе, в подгруппе агрессивных лимфом — в 14 случаях (15 % от числа пациентов в подгруппе) и в подгруппе зрелоклеточных лимфом — в 1 случае (2 % от числа пациентов в подгруппе).

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты ПЭТ могли повлиять на выбор лечения у 8 больных, что составило 3,5 % от числа пациентов, включенных в исследование.

В рамках настоящего исследования дополнительно проанализированы результаты сцинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом, выполнение которой у 38 больных предшествовало проведению ПЭТ. Сцинтиграфия с ^{67}Ga -цитратом — один из методов ядерной диагностики, который много лет применяется у больных со злокачественными лимфомами. При внутри-

венном введении ^{67}Ga -цитрат связывается с трансферрином крови и накапливается в опухолевых клетках, имеющих трансферринсвязывающие рецепторы. Однако результаты еще более ранних исследований показали, что информативность метода в оценке процесса ниже диафрагмы существенно ограничена за счет активного физиологического накопления РФП в печени и его экскреции через кишечник [52]. Тем не менее до появления ПЭТ метод широко использовался для оценки жизнеспособности резидуальной опухоли у больных с лимфомами, улучшая специфичность РКТ в оценке эффективности лечения [53]. Результаты более поздних исследований показали, что чувствительность и специфичность ПЭТ для оценки распространенности заболевания у больных с лимфомами (вне зависимости от локализации процесса) существенно превосходили аналогичные показатели скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом. Это обусловлено, с одной стороны, принципиальными различиями в фармакокинетике используемых РФП, с другой — техническими аспектами используемой диагностической аппаратуры. ПЭТ-сканеры имеют более высокое пространственное разрешение по сравнению с гамма-камерами, на которых выполняется скинтиграфия, и это обеспечивает возможность четкой визуализации мелких патологических очагов [49, 54]. Кроме того, лучевая нагрузка на пациента при ПЭТ-исследовании существенно ниже, чем при скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом. Полученные нами данные подтверждают результаты указанных выше исследований о низкой информативности скинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом в оценке процесса ниже диафрагмы (у 9 из 16 больных с локализацией очагов заболевания ниже диафрагмы получены ложноотрицательные результаты), что обусловлено фармакокинетикой используемого РФП, и у больных со зрелоклеточными лимфомами, для которых характерно наличие сравнительно мелких очагов поражения (у 4 из 5 больных со зрелоклеточными лимфомами получены ложноотрицательные данные).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не вызывает сомнений, что применение ПЭТ не может заменить использование ТМД в оценке распространенности процесса у больных со злокачественными лимфомами. Результаты ПЭТ и ТМД имеют важное взаимодополняющее значение. Выполнение ПЭТ для определения стадии заболевания и рестадирования у пациентов с ЛХ, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, фолликулярными лимфомами настоятельно рекомендуется ведущими мировыми научными сообществами [40, 41]. Тем не менее ПЭТ до настоящего времени не считается стандартной диагностической процедурой у больных со злокачественными лимфомами. Вероятно, это обусловлено меньшей доступностью ПЭТ по сравнению с другими методами диагностики и сложностями интерпретации данных. Результаты настоящего исследования и приведенные данные литературы подчеркивают, что метаболическое изображение при ПЭТ не может оцениваться с позиций методов структурной визуализации, а трактовка полученных результатов должна осуществляться при тесном сотрудничестве с клиницистами.

Суммируя, можно сделать вывод, что при оценке распространенности заболевания у больных со злокачественными лимфомами на этапе первичной диагностики и при выявлении рецидива точность ПЭТ превосходит таковую ТМД. Наличие ложноположительных и ложноотрицательных результатов свидетельствует, что данные ПЭТ и ТМД имеют взаимодополняющее значение. ПЭТ позволяет уточнить стадию заболевания у 25 % пациентов с агрессивными лимфомами и ЛХ, что приводит к изменению лечения у боль-

шинства из них. У больных со зрелоклеточными лимфомами влияние результатов ПЭТ на изменение стадии заболевания и последующее лечение минимально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Е.А. Современная терапия первичных больных лимфомой Ходжкина. Автореф. ... д-ра мед. наук. М., 2006.
2. Поддубная И.В. Неходжкинские лимфомы. В кн.: Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007: 724–731.
3. Шахтарина С.В., Даниленко А.А., Павлов В.В. Злокачественные новообразования у больных лимфомой Ходжкина после лучевой терапии по радикальной программе и комбинированной химиолучевой терапии. Клини. онкогематол. 2008; 3(1): 246–51.
4. Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н. Поздние осложнения терапии больных лимфомой Ходжкина. Прак. онкол. 2007; 8(2): 96–101.
5. Поддубная И.В. Обоснование лечебной тактики при неходжкинских лимфомах. Современ. онкол. 2002; 1: 37.
6. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: the International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N. Engl. J. Med. 1993; 329: 987–94.
7. Collins C.D. PET in lymphoma. Cancer Imaging 2006; 6: S63–S70.
8. Lowe V.J., Hoffman J.M., De Long D.M. et al. Semiquantitative and visual analysis of FDG-PET images in pulmonary abnormalities. J. Nucl. Med. 1994; 35: 1771–6.
9. Juweid M.E., Cheson B.D. Positron Emission Tomography and Assessment of Cancer Therapy. N. Eng. J. Med. 2006; 354(5): 496–507.
10. Dorfman R.E., Alpern M.B., Gross B.H. et al. Upper abdominal lymph nodes: criteria for normal size determined with CT. Radiology 1991; 180: 319–22.
11. Vinnicombe S., Norman A., Husband J.E. et al. Normal pelvic lymph nodes: documentation by CT scanning after bipedal lymphangiography. Radiology 1995; 194: 349–55.
12. Arita T., Kuramitsu T., Kawamura M. et al. Bronchogenic carcinoma: incidence of metastases to normal sized lymph nodes. Thorax 1995; 50: 1267–9.
13. Gross B.H., Glatzer G.M., Orringer M.B. et al. Bronchogenic carcinoma metastatic to normal-sized nodes: frequency and significance. Radiology 1988; 166: 71–4.
14. Pombo F., Rodriguez E., Caruncho M.V. et al. CT attenuation values and enhancing characteristics of thoracoabdominal lymphomatous adenopathies. J. Comput. Assist. Tomogr. 1994; 18: 59–62.
15. Stumpe K.D., Urbinelli M., Steinert H.C. et al. Whole-body positron emission tomography using fluorodeoxyglucose for staging of lymphoma: effectiveness and comparison with computed tomography. Eur. J. Nucl. Med. 1998; 25: 721–8.
16. Moog F., Bangerter M., Diederichs C.G. et al. Lymphoma: role of whole-body 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose (FDG) PET in nodal staging. Radiology 1997; 203: 795–800.
17. Hueltenschmidt B., Sautter-Bühl M.L., Lang O. et al. Whole body positron emission tomography in the treatment of Hodgkin disease. Cancer 2001; 91: 302–10.
18. Young C.S., Young B.L., Smith S.M. Staging Hodgkin's disease with 18-FDG PET. Comparison with CT and surgery. Clin. Positron Imaging 1998; 1: 161–4.
19. Schoder H., Meta J., Yap C. et al. Effect of whole-body 18F-FDG PET imaging on clinical staging and management of patients with malignant lymphoma. J. Nucl. Med. 2001; 42: 1139–43.
20. Naumann R., Beuthien-Baumann B., Reiss A. et al. Substantial impact of FDG PET imaging on the therapy decision in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. Br. J. Cancer 2004; 90: 620–5.
21. Duhmke E., Diehl V., Loeffler M. et al. Randomized trial with early-stage Hodgkin's disease testing 30 Gy vs. 40 Gy extended field radiotherapy alone. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1996; 36: 305–10.
22. Moog F., Bangerter M., Diederichs C.G. et al. Extranodal malignant lymphoma: detection with FDG PET versus CT. Radiology 1998; 206: 475–81.
23. Bangerter M., Moog F., Buchmann I. et al. Whole body 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) for accurate staging of Hodgkin's disease. Ann. Oncol. 1998; 9: 1117–22.
24. Bangerter M., Kotzerke J., Griesshammer M. et al. Positron emission tomography with 18-fluorodeoxyglucose in the staging and follow up of lymphoma in the chest. Acta Oncol. 1999; 38: 799–804.
25. Munker R., Stengel A., Stabler A. et al. Diagnostic accuracy of ultrasound and computed tomography in the staging of Hodgkin's disease. Cancer 1995; 76: 1460–6.
26. Vinnicombe S.J., Reznek R.H. Computerised tomography in the staging of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2003; 30(Suppl. 1): S42–S55.
27. Fishman E.K., Kuhlman J.E., Jones R.J. CT of lymphoma: spectrum of disease. Radiographics 1991; 11: 647–69.
28. Castellino R.A., Marglin S., Blank N. Hodgkin's disease, the non-Hodgkin's lymphomas and the leukaemias in the retroperitoneum. Semin. Roentgenol. 1980; 15: 288–301.

29. Tesoro-Tess J.D., Balzarini L., Ceglia E. et al. Magnetic resonance imaging in the initial staging of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Radiol.* 1991; 12: 81–90.
30. Buchmann I., Reinhardt M., Elsner K. et al. 2-(Fluorine-18)Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography in the Detection and Staging of Malignant Lymphoma. A Bicerter Trial. *Cancer* 2001; 91: 889–99.
31. Shipp M.A. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has «high-risk» disease? *Blood* 1994; 83(5): 1165–73.
32. Wang J., Weiss L.M., Chang K.L. et al. Diagnostic utility of bilateral bone marrow examination: significance of morphologic and ancillary technique study in malignancy. *Cancer* 2002; 94: 1522–31.
33. Pakos E.E., Fotopoulos A.D., Ioannidis J.P. 18F-FDG PET for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma: a meta-analysis. *J. Nucl. Med.* 2005; 46: 958–63.
34. Paone G., Itti E., Haioun C. et al. Bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: correlation between FDG-PET uptake and type of cellular infiltrate. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2009; 36: 745–50.
35. Jerusalem G., Beguin Y., Najjar F. et al. Positron emission tomography (PET) with 18Ffluorodeoxyglucose (18F-FDG) for the staging of low-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Ann. Oncol.* 2001; 12: 825–30.
36. Hollister D. Jr., Lee M.S., Eisen R.N. et al. Variable problems in lymphomas: case 2, sarcoidosis mimicking progressive lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 8113–6.
37. Yeung H.W., Grewal R.K., Gonen M. et al. Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J. Nucl. Med.* 2003; 44: 1789–96.
38. Castellucci P., Nanni C., Farsad M. et al. Potential pitfalls of 18F-FDG PET in a large series of patients treated for malignant lymphoma: prevalence and scan interpretation. *Nucl. Med. Comm.* 2005; 26: 689–94.
39. Brink I., Reinhardt M.J., Hoegerle S. et al. Increased metabolic activity in the thymus gland studied with 18F-FDG PET: age dependency and frequency after chemotherapy. *J. Nucl. Med.* 2001; 42: 591–5.
40. Juweid M.E., Stroobants S., Hoekstra O.S. et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 571–8.
41. Cheson B.D., Pfistner B., Juweid M.E. et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 579–86.
42. Мухортова О.В., Асланиди И.П., Ашрафян Л.А. и др. Позитронно-эмиссионная томография с 18F-ФДГ у онкологических больных: методика обследования всего тела. Опухоли женской репродуктивной системы 2009; 3–4: 70–7.
43. Kubota K., Itoh M., Ozaki K. et al. Advantage of delayed whole-body FDG-PET imaging for tumour detection. *Eur. J. Nucl. Med.* 2001; 28: 696–703.
44. Diederichs C.G., Staib L., Glatting G. et al. FDG PET: Elevated plasma glucose reduces both uptake and detection rate of pancreatic malignancies. *J. Nucl. Med.* 1998; 39: 1030–3.
45. Elstrom R., Guan L., Baker G. et al. Utility of FDGPET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101: 3875–6.
46. Hoffmann M., Kletter K., Diemling M. et al. Positron emission tomography with fluorine-18-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F18-FDG) does not visualize extranodal B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 1185–9.
47. Hoffmann M., Kletter K., Becherer A. et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission spectroscopy (18F-FDG-PET) for staging and follow-up of marginal zone B-cell lymphoma. *Oncology* 2003; 64: 336–40.
48. Beal K.P., Yeung H.W., Yahalom J. FDG-PET scanning for detection and staging of extranodal marginal zone lymphomas of the MALT type: a report of 42 cases. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 473–80.
49. Wirth A., Seymour J.F., Hicks R.J. et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography, gallium-67 scintigraphy, and conventional staging for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Med.* 2002; 112: 262–8.
50. Montravers F., McNamara D., Landman-Parker J. et al. [(18)F]FDG in childhood lymphoma: clinical utility and impact on management. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2002; 29: 1155–65.
51. Seam P., Juweid M.E., Cheson B.D. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood* 2007; 110: 3507–16.
52. Larson S.M., Grunbaum Z., Rasey J.S. The role of transferrins in gallium uptake. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 1981; 8: 257–66.
53. Anderson K.C., Leonard R.C., Canellos G.P. et al. High-dose gallium imaging in lymphoma. *Am. J. Med.* 1983; 75: 327–31.
54. Kostakoglu L., Leonard J.P., Kuji I. et al. Comparison of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and Ga-67 scintigraphy in evaluation of lymphoma. *Cancer* 2002; 94: 879–88.



Клиническая оценка значения позитронно-эмиссионной томографии всего тела с ^{18}F -ФДГ при злокачественных лимфомах (обзор литературы)

Н.В. Ильин, М.С. Тлостанова, М.М. Ходжибекова, Н.А. Костеников, Л.А. Тютин, Ю.Н. Виноградова, Е.И. Иванова, А.А. Иванова, А.В. Крицкая

The clinical value of all body positron emission tomography with ^{18}F -FDG in malignant lymphomas

N. V. Ilyin, M. S. Tlostanova, M. M. Chodgibekova, N. A. Kostenikov, L. A. Tyutin, J. N. Vinogradova, E. I. Ivanova, A. A. Ivanova, A. V. Kritskaya

SUMMARY

The use of positron emission tomography (PET) with ^{18}F -FDG in the staging planning of radiotherapy, evaluation of tumor response, relapses, prognosis is today considered part of the management of lymphoma patients. ^{18}F -FDG-PET has been shown to be significantly more sensitive, than detection lymphoma involvement with gallium scintigraphy, but it requires to correlate PET results with standard diagnostic procedures, immunohistochemistry, clinical signs to decrease of false-positive results. Several studies in lymphomas showed that an early ^{18}F -FDG-PET scan after 1–3 cycles of chemotherapy is a stronger predictor of treatment failure. It will show whether treatment modification based on the result of an early interim PET scan, such as treatment reduction in PET negative patients and treatment intensification in PET positive patients, can improve outcome with respect to improved progression-free survival in patients with a poor prognosis and equivalent progression-free survival with less treatment in patients with a good prognosis. Combination PET-CT is the best mode of metabolic and anatomic visualization and it can be particularly useful for planning radiotherapy.

Keywordslymphoma, positron-emission tomography, ^{18}F -FDG-PET.

The Russian Research Center Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg

Контакты: ilyin_prof@mail.ru

Принято в печать: 3 июня 2010 г.

РЕФЕРАТ

При различных вариантах злокачественных лимфом позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) используется для стадирования, планирования лучевой терапии, оценки остаточных опухолевых масс, обнаружения рецидивов, в некоторых случаях — для дальнейшего наблюдения, а также оценки прогноза. Нодальные и экстранодальные поражения визуализируются с помощью ПЭТ с большей чувствительностью, чем при скintiграфии с ^{67}Ga -цитратом. ПЭТ играет определенную роль в оценке клинического течения заболевания, однако всегда необходимо связывать последующие данные ПЭТ с предварительными, результатами иммуногистохимического исследования, клиническими и рентгенологическими данными обследования, чтобы уменьшить риск ложноположительных результатов. Имеются многообещающие сведения о прогностической роли ПЭТ после 1–3 циклов полихимиотерапии (промежуточная ПЭТ), что может улучшить ведение пациентов, определяя тех, кто может быть излечен терапией минимального объема, а равно и тех, у кого традиционное лечение приведет к неудаче и у кого должна использоваться более интенсивная терапия. Комбинация ПЭТ и рентгеновской компьютерной томографии является наилучшим вариантом для метаболической и анатомической визуализации и может обеспечить оптимальную оценку заболевания и быть полезной для планирования лучевой терапии.

Ключевые словалимфомы, позитронно-эмиссионная томография, ^{18}F -ФДГ.**ЗНАЧЕНИЕ ИСХОДНОГО ПЭТ-ИССЛЕДОВАНИЯ В СТАДИРОВАНИИ**

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) — неинвазивный количественный метод визуализации биохимических, физиологических и биологических процессов *in vivo*. На сегодняшний день это наиболее специфичный и чувствительный метод молекулярной визуализации [1]. Первое исследование, сообщающее об использовании ПЭТ при лимфоме, опубликовано R. Paul в 1987 г. [2]. Эта и последующие работы продемонстрировали активный захват глюкозы при большинстве лимфом. Опухоли имеют

ускоренный гликолиз, ^{18}F -ФДГ задерживается в тканях с повышенной метаболической активностью по сравнению с нормальными тканями. Сканирование всего тела с ^{18}F -ФДГ дает уникальную возможность качественно оценить метаболический процесс *in vivo*. Полученные данные конвертируются в томографические образы, при этом обнаруживаются поражения с диаметром от 4–5 мм, которые качественно или количественно интерпретируются, по специальной программе вычисляется стандартизованный показатель захвата глюкозы (Standardized Uptake Value, SUV_{max}) [3, 4].

По современной классификации опухолей гематополитической и лимфоидной тканей ВОЗ (2008), основными часто встречающимися лимфомами являются лимфома Ходжкина (ЛХ) и следующие неходжкинские лимфомы (НХЛ): диффузная В-клеточная крупноклеточная, фолликулярная, MALT-НХЛ, лимфома зоны мантии, лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфолейкоз, периферическая Т-клеточная НХЛ.

R. Elstrom и соавт. сопоставили иммуногистохимические данные 172 больных с лимфомами с исходными до лечения результатами ПЭТ. В целом по группе у 94 % больных ПЭТ-исследование было положительным по крайней мере в одной области [5]. ПЭТ выявила заболевание в 100 % случаев при диффузной В-клеточной крупноклеточной (51 больной) и мантийно-клеточной НХЛ (7 больных), в 98 % — при ЛХ (47 больных) и фолликулярной НХЛ (42 больных), однако только у 67 % (12 больных) при НХЛ маргинальной зоны и 40 % (5 больных) с периферической Т-клеточной НХЛ. Тот факт, что при фолликулярной НХЛ показано высокое поглощение ^{18}F -ФДГ, свидетельствует, что степень злокачественности не всегда предсказывает уровень поглощения.

По данным разных авторов, роль ПЭТ-исследования при НХЛ разной степени злокачественности противоречива. M. Lapeda и соавт. считают, что поглощение ^{18}F -ФДГ при более агрессивном варианте выше [6], но J. Newman и соавт. не выявили различий SUV_{max} при НХЛ низкой и высокой степени злокачественности [7]. Отмечена прямая связь между накоплением ^{18}F -ФДГ, пролиферативной активностью по данным Ki-67 и прогнозом [8, 9]. По данным H. Schoder и соавт., среди 97 больных НХЛ SUV_{max} был меньше при индолентных лимфомах (< 10), чем при агрессивных (> 13) [10]. Эта информация может быть полезной при расхождении клинических и иммуногистохимических данных. Однако в разных участках тела уровень SUV_{max} может варьировать весьма значительно.

Значение ПЭТ при первичном стадировании больных с лимфомами велико. В пределах одного исследования становится возможной оценка лимфоидных органов всех регионов тела и экстралимфатических органов, при этом размер лимфоузла не имеет принципиального значения. Однако ряд патологических очагов остается без гистологической верификации, и в этом случае будет иметь значение динамическое наблюдение за больным в процессе терапии. Высокая точность при стадировании лимфом была показана при нодальных и экстранодальных поражениях, в т.ч. костного мозга. ПЭТ иногда обнаруживает дополнительное вовлечение лимфоузлов, не выявленное другими методами [11–13], а также экстранодальные поражения [14]. При вовлечении селезенки ПЭТ-исследование является более точным, чем рентгеновская компьютерная томография (РКТ) [15]. Данные, касающиеся костного мозга, противоречивы [16]. Ложноположительное заключение ПЭТ о диффузном поражении костного мозга при ЛХ может быть связано с реактивной миелоидной гиперплазией, особенно после полихимиотерапии (ПХТ) и использования гранулоцитарных колониестимулирующих факторов; в то же время значительное накопление ^{18}F -ФДГ может быть и при истинном поражении костного мозга при лимфомах [17, 18], что, конечно, не исключает проведения диагностической трепанобиопсии костного мозга, но может заменить его скинтиграфию при первичном стадировании лимфом [19]. ПЭТ-исследование эффективно дополняет результаты фиброгастроскопии при агрессивной НХЛ желудка [20], но не при MALT-НХЛ [21]. Активное накопление ^{18}F -ФДГ происходит как при первичной лимфоме ЦНС, так и при анапластических глиомах [22], поэтому только гистологическая верификация опухоли способна установить истину [23].

S. Partridge и соавт. показали преимущество ПЭТ перед РКТ при экстранодальных поражениях и повышение стадии у 48 % больных ЛХ [24]. Точность ПЭТ-исследования в различных областях тела неодинакова. ПЭТ может определить вовлечение костного мозга так же точно, как его трепанобиопсия, однако результаты последней могут быть и ложноотрицательными в связи с не диффузной, а локальной инфильтрацией. E. Rakos и соавт. провели метаанализ 13 опубликованных работ по сравнительной оценке ПЭТ и биопсии костного мозга в диагностике его поражения [25]. Чувствительность и специфичность ПЭТ-исследования для костного мозга в целом составили 51 и 91 % соответственно; при ЛХ чувствительность была 76 %, при НХЛ — 43 %, при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме — 76 %, фолликулярной НХЛ, НХЛ из малых лимфоцитов и MALT-НХЛ — 30 %. Чувствительность ПЭТ была выше, чем при трепанобиопсии (86 vs 57 %).

Отечественные ученые И. П. Асланиди и соавт. на основании сравнения результатов ПЭТ-исследования и трепанобиопсии костного мозга у 212 больных ЛХ и НХЛ пришли к выводу, что данные обоих методов совпадали у 83 % больных (положительные — у 14 %, отрицательные — у 69 %). У 17 % пациентов результаты не совпадали [26]. В этой подгруппе результаты трепанобиопсии позволили уточнить стадию заболевания дополнительно у 11 больных, а результаты ПЭТ — еще у 25 пациентов с поражением костного мозга. Данные этих диагностических методов помогли идентифицировать больных с различным типом поражения костного мозга: при трепанобиопсии — преимущественно с диффузным типом поражения, при ПЭТ — с очаговым.

По данным I. Buchta и соавт., чувствительность ПЭТ при поддиафрагмальном поражении лимфоузлов ниже, чем при наддиафрагмальном их вовлечении [27]; при поражении лимфоузлов средостения чувствительность составила 91 %, абдоминальных и тазовых лимфоузлов — 75 %, периферических — 83 %, а разница чувствительности метода между различными областями тела была больше у ПЭТ, чем у РКТ [28].

По данным разных авторов, исходная чувствительность ПЭТ при диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ может достигать 100 %, ЛХ и фолликулярной лимфоме — 98 %, лимфоме зоны мантии — 67 %, периферической Т-клеточной лимфоме — 40 %. При MALT-лимфомах ЖКТ данный показатель, как правило, не превышает 57–64 % [5, 27–31]. По мнению C. Schiepers, большой разброс значений показателя чувствительности в диагностике различных иммуноморфологических типов лимфом может быть обусловлен степенью злокачественности опухолевых клеток [32]. При промежуточной ПЭТ в процессе лечения снижение SUV_{max} весьма значительное при агрессивных НХЛ [33]. Отмечен высокий уровень захвата ^{18}F -ФДГ опухолевыми клетками при фолликулярной лимфоме, которая в большинстве случаев характеризуется относительно доброкачественным течением [34–36]. Ложноотрицательные результаты отражают как биологию опухоли, так и ее малый размер или и то и другое.

По нашим данным, у пациентов с ЛХ и диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ при первичном стадировании средний уровень SUV_{max} при НХЛ был выше такового у больных ЛХ при обследовании надключичных лимфоузлов и ниже — подвздошных лимфоузлов, в остальных участках тела SUV_{max} был сопоставим. Диагностическая точность ПЭТ-исследования в выявлении злокачественного поражения ряда анатомических областей превышала таковую при УЗИ, РКТ и лимфосцинтиграфии с ^{67}Ga -цитратом; однако при оценке периферических лимфоузлов точность УЗИ

соответствовала таковой при ПЭТ-исследовании, такая же ситуация была при исходной оценке средостения с помощью РКТ. Преимущество ПЭТ перед РКТ отмечено при вовлечении костей, печени, селезенки. Таким образом, очевидно, что исходные данные ПЭТ для изменения стадии следует интерпретировать с учетом их диагностической чувствительности и точности по областям тела [37–45].

Данные ПЭТ-исследования до лечения (специфичность, чувствительность, диагностическая точность) значительно превышают результаты РКТ, составляя 85–98 % как при ЛХ, так и при диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ. При этом изменение стадии заболевания колеблется при разных видах лимфом в широких пределах (10–60 %), чаще в сторону повышения, что может менять план лечения. При ЛХ изменение стадии выявлено у 10–30 % больных, но только у меньшинства из них повлекло серьезную коррекцию терапии [46].

При диффузной В-крупноклеточной НХЛ ПЭТ-исследование показало большую чувствительность, чем клинические методы и РКТ при вовлечении лимфоузлов различных регионов [47]. Данные о значении ПЭТ-исследования при фолликулярной НХЛ немногочисленны. В крупном исследовании бельгийских ученых при фолликулярной НХЛ показано дополнительное преимущество ПЭТ-исследования при поражении костного мозга, периферических лимфоузлов, средостения, но не парааортальных и тазовых лимфоузлов, плевральных или легочных поражениях [13]. У 10 (27 %) из 37 больных с фолликулярной НХЛ после ПЭТ была изменена стадия заболевания [36].

Клиническое значение ПЭТ при НХЛ низкой степени злокачественности варьирует в зависимости от данных гистологии и вида пораженных тканей. У больных с фолликулярной НХЛ ПЭТ идентифицирует больше патологических лимфоузлов, чем РКТ. Наоборот, при хроническом лимфолейкозе ПЭТ менее информативна, чем РКТ; при MALT-НХЛ с помощью ПЭТ хуже определяются пораженные органы по сравнению с лимфоузлами. Результаты исходного ПЭТ-исследования могут способствовать отбору до лечения группы больных ЛХ с низким риском прогрессирования для минимизации их терапии [48].

РОЛЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЭТ-ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ И ПОСЛЕ ЕГО ОКОНЧАНИЯ

Ранняя оценка поглощения ^{18}F -ФДГ после одного или нескольких циклов ПХТ или в середине лечения может предсказать отдаленные результаты. В целом промежуточная ПЭТ имеет чувствительность 79 %, специфичность 92 %, положительную и отрицательную прогностическую значимость 90 и 81 % соответственно. L. Kostakoglu и соавт. у 30 больных ЛХ и НХЛ заключили, что промежуточные данные ПЭТ-исследования коррелируют с отдаленными результатами лучше, чем таковые, полученные после окончания курсов ПХТ [16]; при этом было больше ложноположительных результатов ПЭТ после окончания терапии (35 %), чем при промежуточной оценке (15 %). N. Mikhaeel и соавт. выполнили промежуточное ПЭТ-исследование у 121 больного с агрессивными НХЛ; 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 89 % при отрицательной ПЭТ и 16 % при положительных данных, что отражалось и на общей выживаемости [49]. Ранние данные ПЭТ могут, таким образом, быть независимым фактором прогноза и определять группы пациентов, требующих менее интенсивного лечения, а также тех, кому показана высокодозная химиотерапия. J. Radford и соавт. указывают на отсутствие необходимости проведения консолиди-

рующей лучевой терапии у больных ЛХ I–IIA стадии после 3 циклов ABVD при отрицательных промежуточных результатах ПЭТ [50]. Данные промежуточной ПЭТ после 2 циклов R-CHOP оказались прогностически значимыми у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ. После 2 циклов R-CHOP 63 % пациентов были ПЭТ-отрицательны, 37 % — ПЭТ-положительны. Среди больных с ПЭТ-положительными данными в дальнейшем прогрессирование заболевания отмечено у 52 %, а с ПЭТ-отрицательными — только у 14 % [51].

При ЛХ доказано значительное прогностическое значение ПЭТ после 1–2 циклов ПХТ для определения дальнейшей тактики терапии [52]. При этом, с одной стороны, выделяется группа пациентов, которым достаточно минимального объема лечения, а с другой — те пациенты, кому показана интенсивная терапия с самого начала. В то же время ПЭТ-исследование не является диагностической панацеей и может давать существенное количество ложноположительных результатов, в частности, при бактериальных инфекциях, лекарственной токсичности, после лучевой терапии в первые 2–3 мес., после терапии колониестимулирующими факторами. Кроме того, активное накопление ^{18}F -ФДГ выявлено при туберкулезе, грибковых инфекциях, саркоидозе. Низкое накопление ^{18}F -ФДГ отмечено при слабо пролиферирующих опухолях, активное — при плохо дифференцированных быстрорастущих новообразованиях. Поражение ЦНС может остаться незамеченным из-за активного накопления ^{18}F -ФДГ в нормальную мозговую ткань, для выявления опухоли мозга требуются специальные технические условия.

К положительным результатам ПЭТ-исследования в процессе и после лечения лимфом следует относиться с осторожностью и всегда учитывать другие методы клинической, лучевой и лабораторной диагностики [53]. Тем не менее критерии Cheson по оценке результатов терапии лимфом включают ПЭТ-исследование в обязательном порядке, его данные очень важны при принятии решения о клиническом состоянии больного. Сочетание положительного результата ПЭТ-исследования и данных о поражении, выявленном другими методами, четко указывает на вовлечение ткани в опухолевый процесс. Отрицательная ПЭТ и отсутствие поражения по данным других методов диагностики свидетельствуют о ремиссии. В случае расхождения результатов различных методов диагностики критериями оценки будут ответ на лечение и наблюдение за больным [54].

Оценка результатов ПЭТ после полного курса лечения, включая лучевую терапию, важна и часто необходима в связи с наличием больных в неопределенной полной ремиссии с остаточными опухолевыми массами, устанавливаемыми традиционными методами диагностики. По данным разных авторов, чувствительность ПЭТ при этом варьировала в пределах 71–100 %, специфичность — 69–100 %, положительная прогностическая ценность метода была на уровне 80–100 %, отрицательная — 93 % [24, 55]. Многие авторы заключают, что прогностическая роль ПЭТ после лечения выше, чем роль РКТ. Ее значение велико при определении чувствительных к ПХТ пациентов с лимфомами, оценке остаточных опухолевых масс. Однако важно помнить, что отрицательные результаты ПЭТ не исключают резидуальной болезни, а положительные — не всегда указывают на активное заболевание. ПЭТ-исследование следует проводить через 3–4 нед. после ПХТ и через 3 мес. после окончания лучевой терапии [56]. При НХЛ промежуточное ПЭТ-исследование после 2 циклов ПХТ более информативно, чем сцинтиграфия с ^{67}Ga -цитратом [57]. По обобщенным данным, положительная прогностическая ценность промежуточной ПЭТ при ЛХ и НХЛ суммарно составляет 91 %, что

а после окончания ПХТ — 85 %; отрицательная прогностическая ценность — 79 и 90 % соответственно [56].

Одна из значительных диагностических проблем при лимфомах — оценка неполной регрессии опухолевых масс, чаще встречается при агрессивных НХЛ при крупных очаговых поражениях (например, средостения, забрюшинных лимфоузлов) и нодулярном варианте ЛХ. Методом диагностического выбора наряду со сцинтиграфией ^{67}Ga -цитратом ПЭТ-исследование становится после окончания лечения. Положительные данные ПЭТ могут быть связаны с остаточным поражением. С другой стороны, и отрицательные результаты ПЭТ не могут исключить наличия резидуальных опухолевых масс, которые могут вести к рецидиву заболевания. В смешанной популяции 200 больных ЛХ и НХЛ при оценке ПЭТ после окончания лечения положительная и отрицательная прогностическая ценность исследования составила 81 и 91 % соответственно [56]. Однако есть данные и о низкой (30 %) положительной прогностической ценности метода у больных с лимфомами [58]. Различия в результатах можно объяснить маленькими группами пациентов с очень гетерогенной морфологией — ЛХ и НХЛ низкой и высокой степени злокачественности.

ПЭТ-исследование очень важно, если клинически и другими методами рецидив не определяется. При проведении ПЭТ ранее чем через 2 нед. после ПХТ больше ложноотрицательных результатов, а ранее 3 мес. после лучевой терапии — больше ложноположительных результатов, связанных с лучевой реакцией облученных тканей. С клинической точки зрения чувствительность, возможно, более важна, чем точность, а для того чтобы повысить специфичность, следует сопоставлять данные ПЭТ с клинической информацией и результатами других методов исследования.

Очевидно, что больные с высоким риском рецидива должны активно наблюдаться. Практически отсутствуют сведения о результатах и роли ПЭТ-исследования при рутинном наблюдении больных НХЛ, но при ЛХ предварительные данные получены. Так, при наблюдении 36 первичных больных каждые 4–6 мес. в течение 2–3 лет все 5 пациентов с возможным рецидивом были выявлены в течение 9 мес. до гистологического подтверждения рецидива [35]. Тем не менее у 6 больных сначала были ложноположительные результаты ПЭТ, не подтвержденные другими методами и ставшие отрицательными через месяц без всякого лечения.

Таким образом, ^{18}F -ФДГ ПЭТ-исследование может эффективно использоваться при стадировании, в процессе и после лечения больных ЛХ и НХЛ. Однако положительные результаты ПЭТ необязательно свидетельствуют о наличии заболевания и требуют подтверждения другими методами или наблюдением в процессе лечения. Со временем ложноположительные данные ПЭТ-исследования могут становиться отрицательными. Очевидно, что совместное использование ПЭТ и РКТ увеличивает диагностическую специфичность, хотя по отдельности их специфичность сопоставима, но чувствительность ПЭТ выше.

У значительного числа больных показана эффективность ПЭТ-исследования при выявлении остаточного заболевания: при ЛХ (350 пациентов) чувствительность и специфичность составили 84 и 90 %, а при НХЛ (408 пациентов) — 72 и 100 % соответственно [47]. При ЛХ отрицательная ПЭТ после лечения четко была связана с хорошим прогнозом, а положительная ПЭТ при НХЛ предполагает высокую вероятность рецидива в дальнейшем. Высокая прогностическая ценность ПЭТ стала основой для новых критериев оценки терапии лимфом [54, 59]. Проведение крупных рандомизированных исследований по интенсификации терапии у больных ЛХ с положительными результатами ПЭТ по-

сле 2–4 циклов ПХТ затруднительно, т. к. число таких пациентов невелико — 10–20 %.

Германская группа по изучению ЛХ доложила на 7-й Международной конференции по ЛХ результаты оценки ПЭТ с ^{18}F -ФДГ после завершения циклов ПХТ по протоколу HD-15 у больных с ПВ–IV стадией. После этого этапа лечения оценивали больных с остаточными опухолевыми массами. У 9 (4,2 %) из 216 ПЭТ-отрицательных пациентов и у 9 (16,1 %) из 59 ПЭТ-положительных выявлены рецидивы заболевания [60]. У больных с ПЭТ-отрицательными остаточными опухолевыми массами лучевая терапия не проводилась, а ПЭТ-положительные пациенты лучевую терапию получали. У ПЭТ-отрицательных пациентов с частичной ремиссией прогноз был таким же, как и у пациентов с полной ремиссией. Доля больных по протоколу HD-15, получавших лучевую терапию, составила всего лишь 12 %. Авторы полагают, что высокая отрицательная прогностическая ценность ПЭТ после 6–8 циклов ПХТ BEACOPP у больных с распространенной ЛХ позволяет значительно ограничить применение лучевой терапии у этих пациентов.

По данным итальянской группы, 260 первичных больных ЛХ III–IV стадии получали 6 циклов ABVD и консолидирующую лучевую терапию на крупные и остаточные очаги заболевания [52]. ПЭТ-исследование проводили до и после 2 циклов ABVD. Независимо от результатов ПЭТ лечение не корректировали. После медианы наблюдения 2,2 года у 205 больных диагностирована полная ремиссия, у 2 — частичная; у 43 пациентов наблюдалось прогрессирование в течение ПХТ, у 10 — рецидивы. У 50 больных после лечения результаты по данным ПЭТ были положительными, у 210 — отрицательными. Из 50 больных с ПЭТ-положительными результатами у 43 (86 %) затем отмечались прогрессирование или рецидив и только у 7 была достигнута ремиссия. Из 210 пациентов с ПЭТ-отрицательными результатами у 200 (95 %) была достигнута ремиссия (у 199 — полная), в то время как 10 пациентов в дальнейшем имели прогрессирование заболевания. Таким образом, при промежуточном отрицательном ПЭТ-исследовании можно продолжить стандартную ABVD-терапию.

В этой же работе показано, что результаты ПЭТ-исследования нивелируют роль известных прогностических факторов и являются важными для планирования риска-адаптированной терапии больных с распространенными стадиями ЛХ. В продолжении работы этой группы установлено, что при распространенной ЛХ положительная и отрицательная прогностическая ценность промежуточной ПЭТ после 2 циклов ABVD составили 37,5 и 93,5 %; после интенсификации с помощью курсов BEACOPP-эскалированный выживаемость без прогрессирования в течение 2 лет у ПЭТ-положительных пациентов может быть увеличена с 12 до 56 % [61]. По данным британской группы, лучевую терапию при распространенных стадиях ЛХ следует проводить лишь у больных с остаточными опухолевыми массами при положительных результатах ПЭТ после окончания ПХТ [62]. Данные обеих указанных групп о прогностической роли промежуточной ПЭТ после 2–3 циклов ABVD и важности лучевой терапии ПЭТ-положительных зон подтвердили исследователи из Аргентины [63].

При фолликулярной НХЛ испанские исследователи проводили ПЭТ-исследование у 22 больных с остаточными опухолевыми массами, выявленными РКТ, через 1 мес. после ПХТ [64]. Из 10 пациентов с ПЭТ-положительными данными (SUV_{max} в среднем 5,6; диапазон 1,4–28) у 7 делали биопсию, которая у 6 из них подтвердила наличие опухоли, а у 1 — нет. У 3 больных, отказавшихся от биопсии, в дальнейшем выявлено прогрессирование. Отрицательные резуль-

таты ПЭТ отмечены в 12 случаях. При последующей оценке с медианой наблюдения 15 мес. после ПЭТ-исследования у 11 из них рецидива не было, у 1 больного отмечено прогрессирование заболевания. В этом исследовании чувствительность ПЭТ составила 90 %, специфичность — 91,7 %; положительная и отрицательная прогностическая ценность — 90 и 91,7 % соответственно.

В исследовании германской группы по изучению ЛХ 69 первичных больных с IIВ–IV стадией ЛХ получали лечение по протоколу HD-15: 6–8 циклов ПХТ ВЕАСОРР-базовый и облучение пораженных зон у ПЭТ-положительных после ПХТ пациентов с остаточными опухолевыми массами. Всем больным проводили ПЭТ-исследование после 4-го цикла ПХТ (ранняя ПЭТ) и после окончания ПХТ (поздняя ПЭТ). 68 больных закончили полный курс ПХТ, а 1 больной умер на 8-м курсе ПХТ от блеомицин-индуцированного пульмонита. У 18 больных получена ранняя положительная ПЭТ, у 51 (74 %) из 69 — ранняя отрицательная. Позднее ПЭТ-исследование дало положительные результаты у 9 (13 %) из 68 пациентов, отрицательные — у 59 (87 %) из 68 [65]. У больных, получавших только ПХТ, ценность отрицательных результатов для ранней и поздней ПЭТ была высокой — 96 и 95 % соответственно. Положительная прогностическая ценность у больных ЛХ, получавших только ПХТ или комбинированное лечение, составила как при ранней, так и поздней ПЭТ всего 22 %. У 4 из 5 больных с последующими рецидивами результаты ПЭТ были положительными на раннем этапе, у 1 пациента — при позднем ПЭТ-исследовании.

У 82 первичных больных с диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ, получивших 4–8 циклов R-СНОР, за которыми следовала высокодозная ПХТ с аутологичной трансплантацией стволовых клеток, проводили ПЭТ-исследование до лечения, после 2–4 курсов иммунохимиотерапии (ПЭТ-2) и после окончания лечения (ПЭТ-3). В конце лечения 73 (89 %) пациента достигли полной ремиссии и 9 (11 %) — не ответили на лечение. По данным ПЭТ-2 положительными оказалось 33 % больных, отрицательными — 67 %; при ПЭТ-3 — 16 и 84 % соответственно. Корреляции между результатами ПЭТ-2 и выживаемостью, свободной от прогрессии в течение 2 лет, не отмечено. Напротив, соответствие между клинической ремиссией и отрицательной ПЭТ-3 было в 98,6 % случаев; у 1 больного с ремиссией зарегистрированы ПЭТ-положительные данные, что было связано с возникшим раком околоушной железы. Авторы указывают, что результаты ПЭТ-2 неважны для прогноза при диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ. Напротив, результаты ПЭТ-3 тесно коррелируют с последующим клиническим течением заболевания [66].

Получены данные, касающиеся промежуточного ПЭТ-исследования после 2 курсов ВЕАСОРР-14 у 9 больных ЛХ III–IV стадии [67]. После 2 циклов ПХТ у 5 пациентов ПЭТ-исследование оказалось отрицательным, у 4 — положительным. Авторы расценивают эти данные как предварительные.

У 178 больных ЛХ (I–II стадия — 112 человек, III–IV стадия — 66 человек) проводили стандартную ПХТ по схеме ABVD, промежуточные результаты ПЭТ оценивали после 2 курсов и в конце первой линии терапии [68]. При этом 39 больным проводили аутологичную трансплантацию костного мозга и 3 — аллогенную. Промежуточное ПЭТ-исследование было отрицательным у 150 (84 %) пациентов, положительным — у 28 (16 %). У 90 % больных первой группы наблюдали длительную ремиссию, и ни у одного больного после стандартной терапии в ПЭТ-положительной группе такой ремиссии не было; она была достигнута лишь после трансплантации костного мозга у 9 больных. Есть све-

дения о роли ПЭТ и при раннем обнаружении рутуксимаб-индуцированного пульмонита у больных НХЛ [69].

Вопросы применения промежуточной ПЭТ (после 2–3 циклов ПХТ) при лимфомах остаются. Нужно ли проводить ПЭТ в полной ремиссии после ПХТ, если промежуточное ПЭТ-исследование было отрицательным? Следует ли изменять как-то терапию после промежуточной ПЭТ, определяющей остаточные опухолевые массы? Надо ли редуцировать схему лечения, если промежуточное ПЭТ-исследование отрицательно? Описаны случаи ложноположительных результатов ПЭТ, подтвержденных морфологически в срок 3–63 мес. (SUV_{max} 2,7–14,8) после окончания лечения по поводу ЛХ и диффузной В-клеточной крупноклеточной НХЛ [70]. Эти данные были получены при исследовании забрюшинных лимфоузлов, средостения, легких, миндалин и оказались на самом деле обусловленными инфекционными процессами и фиброзом.

Анализируя 57 статей, опубликованных в мировой печати в 2000–2008 гг., И. П. Асланиди и соавт. приходят к выводу, что значение ПЭТ при ЛХ и агрессивных НХЛ особенно велико для исходной диагностики очагового и диффузного поражения селезенки, диффузного вовлечения печени, костей, костного мозга [53]. По чувствительности и специфичности ПЭТ-исследование существенно превосходит сцинтиграфию с ^{67}Ga -цитратом, а точность в определении стадии составляет 95 %, тогда как при стандартных методах — только 60–70 %. ПЭТ превосходит РКТ в точности оценки эффективности проведенного лечения и играет важную роль для выявления рецидива заболевания. Из ограничений ПЭТ отмечают невозможность оценки очагов менее 0,5 см, накопление ^{18}F -ФДГ в очаге воспаления, отсутствие анатомических ориентиров. Последний недостаток устраняется с помощью ПЭТ/РКТ-технологий.

ПЭТ-исследование быстрее, чем другие методы, отражает положительные изменения в процессе ПХТ, однако следует с осторожностью относиться к диагностической оценке результатов ПЭТ после химиолучевого лечения; при этом необходимо учитывать результаты всех диагностических методов и соблюдать сроки проведения ПЭТ-исследования: не ранее чем через 3 нед. после ПХТ, через 3 мес. после лучевой терапии [71].

Высокое физиологическое накопление ^{18}F -ФДГ может происходить в ЖКТ, мочевых путях, мышцах, слюнных железах, а также может наблюдаться при воспалении, послеоперационных заживающих рубцах, гиперплазии тимуса, доброкачественных опухолях; однако уровень поглощения при них меньше, чем при злокачественных новообразованиях. Различные уровни поглощения ^{18}F -ФДГ наблюдаются и при исследовании нормального костного мозга. Любой процесс, который стимулирует костный мозг, может увеличивать поглощение в нем ^{18}F -ФДГ, включая гиперплазию костного мозга после ПХТ при использовании колоннестимулирующих факторов. Поглощение ^{18}F -ФДГ в костном мозге в ответ на лечение обычно диффузно и симметрично, но любая локальная активность должна рассматриваться с осторожностью. Диффузное увеличение поглощения ^{18}F -ФДГ в селезенке также возможно при применении колоннестимулирующих факторов [72].

P. Castelucci и соавт. оценили ПЭТ после лучевой терапии больных с лимфомами, у которых также могли быть ложноположительные результаты [73]. Авторы сообщили об отсутствии патологического поглощения у 13 пациентов и слабое его увеличение — у 3, но данных, что это привело к ложной диагностике, не было. Исследователи полагают, что можно пренебречь наличием активности заболевания вскоре после лучевой терапии без риска увеличения

ложноположительных результатов. Однако рекомендуется выждать 3 мес. после облучения в связи с лучевыми реакциями [74]. Появились данные о роли ПЭТ-исследования при Т-клеточной НХЛ после аутологичной трансплантации стволовых кроветворных клеток [75]. У 14 из 21 больного показано соответствие результатов РКТ и ПЭТ после этого лечебного подхода (5 отрицательных и 9 положительных). У 4 из остальных 7 больных данные ПЭТ были положительными и коррелировали с дальнейшим клиническим течением заболевания, а результаты РКТ были отрицательными и не коррелировали с прогнозом.

Персистирующее аномальное поглощение ^{18}F -ФДГ в первоначально вовлеченных участках прогностически важно для остаточных лимфоузлов или при рецидиве. Если патологическое поглощение определяется вне первоначально пораженных зон, то должны быть исключены прежде всего инфекционные процессы.

Наличие ВИЧ-инфекции представляет особую трудность интерпретации ПЭТ-данных, т.к. иммунодефицит предрасполагает к развитию вторичной, часто необычной инфекции (пневмоцисты, микобактерии, кандидозы), а также опухолей (лимфомы) [76]. Эти сложности в интерпретации связаны с тем, что повышенное поглощение ^{18}F -ФДГ в лимфоузлах наблюдается не только при инфекциях и опухолях, но и при персистирующей генерализованной лимфаденопатии. Тем не менее ПЭТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией может быть быстрым методом для определения очага и места биопсии. ПЭТ можно применять при дифференциации церебральной лимфомы (высокое поглощение ^{18}F -ФДГ в пораженном участке) у пациентов со СПИДом, при исключении токсоплазмоза и прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии. Высокое поглощение ^{18}F -ФДГ требует проведения биопсии, но низкое или отсутствие поглощения позволяет использовать консервативную тактику.

РОЛЬ ПЭТ/РКТ

ПЭТ/РКТ имеет преимущества перед отдельным применением этих методов, т.к. позволяет одновременно получить функциональную и морфологическую информацию [77, 78]. М. Allen-Auerbach и соавт. наблюдали несогласованную интерпретацию данных ПЭТ и ПЭТ/РКТ у 7 (10 %) из 73 пациентов с лимфомами. Данные ПЭТ/РКТ повысили стадию у 2 пациентов и понизили — у 5. Общее стадирование было точным у 93 % пациентов после ПЭТ/РКТ и у 84 % — после ПЭТ [79]. L. S. Freudenberg и соавт. сообщили, что ПЭТ/РКТ-исследование изменило стадию заболевания и повлияло на терапию у 2 (14 %) из 14 больных с рецидивом лимфомы [30]. Весьма вероятно, что почти все ПЭТ-аппараты будут комбинированы с РКТ в ближайшем будущем. ПЭТ/РКТ-исследование может быть особенно необходимым при планировании лучевой терапии или хирургической биопсии. При точной анатомической локализации участков ^{18}F -ФДГ-поглощения также можно будет избежать некоторых ложноположительных результатов. Например, феномен ^{18}F -ФДГ-поглощения в буром жире был впервые открыт, когда совмещение ПЭТ и РКТ показало концентрацию ^{18}F -ФДГ в жировой ткани, а не в мышцах или лимфоузлах, как ранее считалось [80]. Опыт Стэнфордского университета при использовании ^{18}F -ФДГ-ПЭТ/РКТ указывает на очень высокую (100 %) отрицательную прогностическую значимость исследования при отдаленном наблюдении больных и, наоборот, низкую положительную его ценность (47 %) [81]. Получены данные о важном прогностическом значении ПЭТ/РКТ-исследования после окончания ПХТ при Т-клеточных НХЛ [82].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При лимфомах ПЭТ-исследование стало важным ядерным методом изображения и имеет определенное значение при терапии лимфом. ПЭТ в настоящее время играет значительную роль при стадировании, планировании и терапии, наблюдении, прогнозе. Многообещающие данные получены о прогностическом значении ПЭТ при ранней коррекции терапии. ПЭТ/РКТ сочетает метаболические и анатомические изображения и может обеспечить оптимальную оценку заболевания.

ПЭТ рекомендуется при диагностике, в процессе и после первой линии ПХТ, а также после лучевой терапии. Когда имеется ненормальное поглощение ^{18}F -ФДГ после начала лечения в первоначально вовлеченных участках без признаков воспаления, следует задуматься о более агрессивной химиотерапии как НХЛ, так и ЛХ. Отрицательные данные ПЭТ не исключают наличия минимальной остаточной болезни. Положительные результаты сканирования оправдывают более агрессивную терапию. Таким пациентам рекомендуется повторное исследование в течение нескольких лет. Пациенты с ранними стадиями ЛХ и отрицательными результатами ПЭТ после первой линии ПХТ считаются в полной ремиссии, нуждаются только в наблюдении; ПЭТ проводится только в тех случаях, когда клинически подозревается рецидив. Необходимы многоцентровые рандомизированные исследования для определения оптимальной роли ПЭТ при принятии клинического решения и выбора конкретной тактики у пациентов с ЛХ и различными типами НХЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Specht L. The role of PET in staging and response assessment. Education program for the 12 congress of the EHA. Vienna, Austria. 2007: 60–3.
2. Paul R. Comparison of ^{18}F -FDG and gallium-67 citrate imaging for detection of lymphoma. J. Nucl. Med. 1987; 28: 288–92.
3. Позитронно-эмиссионная томография. Руководство для врачей. Под ред. А.М. Гранова, Л.А. Тютина. СПб.: Фолиант, 2008; 368.
4. Shaw A., Dixon A. Imaging. In: Lymphoma. Ed by R. Marcus, L. Sweetenham, M. Williams. New York: Cambridge Medicine, 2007: 19–31.
5. Elstrom R., Guan L., Baker G. et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. Blood 2003; 101: 3875–6.
6. Lapeda M., Leskinen S., Minn H.R. et al. Increased glucose metabolism in untreated non-Hodgkin's lymphoma: a study with positron emission tomography and fluorine-18-fluorodeoxyglucose. Blood 1995; 86: 3522–7.
7. Newman J.S., Francis I.R., Kaminski M.S. et al. Imaging of lymphoma with PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: correlation with CT. Radiology 1994; 190: 111–6.
8. Okada J., Yoshikawa K., Imazeki K. et al. The use of FDG-PET in the detection and management of malignant lymphoma: correlation of uptake with prognosis. J. Nucl. Med. 1991; 32: 686–91.
9. Okada J., Yoshikawa K., Itami M. et al. Positron emission tomography using fluorine-18-fluorodeoxyglucose in malignant lymphoma: a comparison with proliferative activity. J. Nucl. Med. 1992; 33: 325–9.
10. Schoder H., Noy A., Gonen M. et al. Intensity of ^{18}F -fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography distinguishes between indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 4643–51.
11. Hoh C., Glaspy J., Rosen P. et al. Whole body FDG-PET imaging for staging of Hodgkin's disease and lymphoma. J. Nucl. Med. 1997; 38: 343–8.
12. Moog F., Bangert M., Diederichs C.G. et al. Lymphoma: role of whole-body 2-deoxy-2-[F-18] fluoro-D-glucose (FDG) PET in nodal staging. Radiology 1997; 203: 765–800.
13. Jerusalem G., Beguin Y., Najjar F. et al. Positron emission tomography (PET) with ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) for the staging of low grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Ann. Oncol. 2001; 12: 825–30.
14. Moog F., Bangert M., Diederichs C.G. et al. Extranodal malignant lymphoma: detection with FDG PET versus CT. Radiology 1998; 206: 475–81.
15. Rini J.N., Leonidas J.C., Tomas M.B., Palestro C.J. ^{18}F -FDG PET versus CT for evaluating the spleen during initial staging of lymphoma. J. Nucl. Med. 2003; 44: 1072–4.
16. Kostakoglu L., Goldsmith S.J. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the staging and follow-up of lymphoma: is it time to shift gears? Eur. J. Nucl. Med. 2000; 27: 1564–78.
17. Carr R., Barrington S.F., Madan B. et al. Detection of lymphoma in bone marrow by whole-body positron emission tomography. Blood 1998; 91: 3340–6.

18. Chiang S.B., Rebenstock A., Guan L. et al. Diffuse bone marrow involvement of Hodgkin lymphoma mimics hematopoietic cytokine-mediated FDG uptake on FDG PET imaging. *Clin. Nucl. Med.* 2003; 28: 674–6.
19. Moog F., Bangerter M., Kotzerke J. et al. 18-F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography as a new approach to detect lymphomatous bone marrow. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 603–9.
20. Rodriguez M., Ahlstrom H., Sundin A. et al. [18F] FDG PET in gastric non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol.* 1997; 36: 577–84.
21. Hoffmann M., Kletter K., Diemling M. et al. Positron emission tomography with fluoro-18-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F18-FDG) does not visualize extranodal B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 1185–9.
22. Kuwabara Y., Ichiya Y., Otsuka M. et al. High [18F] FDG uptake in primary cerebral lymphoma: a PET study. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1988; 12: 47–8.
23. Rosenfeld S.S., Hoffman J.M., Coleman R.E. et al. Studies of primary central nervous system lymphoma with fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J. Nucl. Med.* 1992; 33: 532–6.
24. Partridge S., Timothy A., O'Doherty M.J. et al. 2-Fluorine-18-fluoro-2-deoxy-D glucose positron emission tomography in the pretreatment staging of Hodgkin's disease: influence on patient management in a single institution. *Ann. Oncol.* 2000; 11: 1273–9.
25. Pakos E.E., Fotopoulos A.D., Ioannidis J.P. 18F-FDG PET for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma a meta analysis. *J. Nucl. Med.* 2005; 46: 958–63.
26. Асланиди И.П., Мухортова О.В., Шурупова И.В. и др. Диагностика поражения костного мозга у больных лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами: сравнительная оценка результатов трепанобиопсии и позитронно-эмиссионной томографии. Мат-лы науч.-практ. конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения лимфомы Ходжкина». Обнинск, 2010: 5–7.
27. Buchmann I., Reinhardt M., Elsner K. et al. 2-(Fluorine-18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in the detection and staging of malignant lymphoma. *Cancer* 2001; 91: 889–99.
28. Jerusalem G., Warland V., Najjar F. et al. Whole body 18F-FDG-PET for the evaluation of patients with Hodgkin's disease and non Hodgkin's lymphoma». *Nucl. Med. Commun.* 1999; 20: 13–30.
29. Gambhir S.S., Czernin J., Schwimmer J. et al. A tabulated summary of the FDG-PET literature. *J. Nucl. Med.* 2001; 42: 1S–93S.
30. Freudenberg L.S., Antoch G., Schutt P. et al. FDG-PET/CT in re-staging of patients with lymphoma. *Eur J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2004; 31: 325–9.
31. Beal K.P., Yeung H.W., Yahalom J. FDG-PET scanning for detection and staging of extranodal marginal zone lymphomas of the MALT type: a report of 42 cases. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 473–80.
32. Schiepers C., Filmont J.E., Czernin J. PET for staging of Hodgkin's disease and non Hodgkin's lymphoma. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2003; 30: 82–8.
33. Hattmann A., Moller S., Bockish A. et al. Positron Emission Tomography guided therapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma (PETAL trial): correlation between clinical variables and PET-parameters. 51 ASH annual meeting. New-Orleans, 2009; abst. 2695.
34. Blum R.H., Seymour J.F., Wirth A. et al. Frequent impact of [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography on the staging and management of patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Lymphoma* 2003; 4: 43–9.
35. Jerusalem G., Hustinx R., Beguin Y., Fillet G. Positron emission tomography imaging for lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2005; 17: 441–5.
36. Jerusalem G., Warland V., Beguin Y. et al. Accuracy of end of treatment 18F-FDG PET for predicting relapse in patients with Hodgkin's disease (Hd) and non-Hodgkin's lymphoma (Nhl). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2003; 22: 572, abst. 2299.
37. Иванова Е.И., Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н. и др. Первичное лечение больных злокачественными лимфомами с применением данных позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) всего тела. Сб. научных трудов Невского радиологического форума. СПб., 2009: 217.
38. Ильин Н.В., Иванова Е.И., Тлостанова М.С. и др. Роль позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) всего тела с 18F-ФДГ в мониторинге первичных больных лимфомой Ходжкина. Мат-лы V съезда онкологов и радиологов СНГ. Ташкент, 2008: 122.
39. Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н., Николаева Е.Н. Роль ПЭТ всего тела с 18F-ФДГ в первичном клиническом стадировании и наблюдении больных лимфомой Ходжкина (ЛХ). Мат-лы науч.-практ. конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения лимфомы Ходжкина». Обнинск, 2010: 20–2.
40. Тлостанова М.С., Ильин Н.В., Иванова Е.И., Виноградова Ю.Н. Использование ПЭТ всего тела в ведении больных злокачественными лимфомами, получающих первичное лечение. Мат-лы научной конференции «От лучей Рентгена — к инновациям XXI века: 90 лет со дня основания первого в мире рентгенорадиологического института (Российского научного центра радиологии и хирургических технологий)». СПб., 2008: 50–1.
41. Тлостанова М.С., Ильин Н.В., Иванова Е.И., Виноградова Ю.Н. Клинический опыт применения ПЭТ с 18F-ФДГ в диагностике и оценке эффективности лечения злокачественных лимфом. Мат-лы научной конференции «От лучей Рентгена — к инновациям XXI века: 90 лет со дня основания первого в мире рентгенорадиологического института (Российского научного центра радиологии и хирургических технологий)». СПб., 2008: 48–9.
42. Тлостанова М.С., Тютин Л.А., Рыжкова Д.В. и др. Роль ПЭТ с 18F-ФДГ в стадировании и оценке эффективности лечения злокачественных лимфом. *Вопр. онкол.* 2008; 54(4): 475–80.
43. Тлостанова М.С., Тютин Л.А., Рыжкова Д.В. и др. Клинический опыт применения ПЭТ с 18F-ФДГ в стадировании и рестадировании злокачественных лимфом. *Вестн. рентгенол. и радиол.* 2008; 1: 50–4.
44. Ilyin N.V., Ivanova E.I., Tlostanova M.S. et al. Use 18F-FDG PET of all body in monitoring of primary patients with Hodgkin's disease. *Haematologica* 2007; 5: 72, abst. P121.
45. Mikhaylova N.V., Tlostanova M.S., Vinogradova J.N., Ilyin N.V. Impact of positron emission tomography on primary staging and changing the therapeutic modality in lymphoma patients. *Cell. Ther. Transpl.* 2009; 2(5): 86.
46. Cheson B. Current role and future of PET in Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2007; 5: 21, abst. 1068.
47. Najjar F., Jerusalem G., Paulus P. et al. Interet clinique de la tomographie a emission de positons dans la detection et le bilan d'extension des lymphomes non Hodgkiniens de malignite intermediaire ou elevee. *Med. Nucl. Imag. Fonction. Metab.* 1999; 23: 281–90.
48. Coccorocchio E., Bassi S., Negri M. et al. Combined VBM (vinblastine, bleomycin, methotrexate) chemotherapy and involved field (IF) radiotherapy (RT) in early stage Hodgkin's lymphoma (HL): a single centre experience. *Haematologica* 2009; s2: 631–2, abst. 1641.
49. Mikhael N.G., Hutchings M., Fields P.A. et al. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression free and overall survival in high-grade non Hodgkin lymphoma. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 1514–23.
50. Radford J., Barrington S., O'Doherty M. et al. Interim results of a UK NCRI randomized trial comparing involved fields radiotherapy with no further treatment after 3 cycles ABVD and a negative PET scan in clinical stages IA–IIA Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2007; s5: 32, abst. C023.
51. Safar V., Dupuis J., Jardin F. et al. Early 18F-FDG PET as a prognostic tool in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with an anthracycline-based chemotherapy plus Rituximab. 51 ASH annual meeting. New-Orleans, 2009: Abstract 98.
52. Gallamini A., Hutchings M., Rigacci I. et al. Early interim FDG-PET overshadows the prognostic role of IPS in advanced-stage Hodgkin's lymphoma treated by conventional ABVD therapy. *Haematologica* 2007; s5: 32, abst. C022.
53. Асланиди И.П., Мухортова О.В., Шурупова И.В. и др. Значение позитронно-эмиссионной томографии у больных лимфомами. *Соврем. онкол.* 2008; 10(3): 69–70.
54. Cheson B., Pfistner B., Juweid M. et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 579–86.
55. Parizo C., Peres Salazar M., Bendandi M. et al. Positron emission tomography using F-fluorodeoxyglucose for the evaluation of residual Hodgkin's disease mediastinal masses. *Leuk. Lymphoma.* 2004; 45: 1829–33.
56. Jerusalem G., Hustinx R. Nuclear Medicine. In: The Lymphomas, 2nd edn. Ed. by G.P. Canellos, T.A. Lister, B. Young. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006: 189–202.
57. Zijlstra J.M., Hoekstra O.S., Raijmakers P.G. et al. 18FDG positron emission tomography versus 67Ga scintigraphy as prognostic test during chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2003; 123: 454–62.
58. Naumann R., Vaic A., Beuthien-Baumann B. et al. Prognostic value of positron emission tomography in the evaluation of post-treatment residual mass in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 793–800.
59. Juweid M., Stroobants S., Hoeksra O. et al. Use of PET for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project (IHP) in lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 571–8.
60. Kobe C., Dietlein M., Franklin J. et al. FDG-PET for assessment of residual tissue after completion of chemotherapy in Hodgkin's lymphoma — report on the second interim analysis of the PET investigation in the trial HD15 of the GHSG. *Haematologica* 2007; s5: 31, abst. C021.
61. Gallamini A., Fiore F., Sorasio R. et al. Early chemotherapy intensification with BEACOPP in high-risk, interim-PET positive advanced-stage Hodgkin lymphoma, improves the overall treatment outcome of ABVD: a gital multicenter clinical study. *Haematologica* 2009; s2: 204, abst. 0502.
62. Johnson P., Federico M., Enblad G. et al. Response-adapted therapy using FDG-PET scanning after initial ABVD: the UK NCRI, Italian and Nordic trial in advanced Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2007; s5: 7, abst. 1023.
63. Pavlovsky S., Pavlovsky I., Fernandez I. et al. PET-CT adapted therapy after 3 cycles of ABVD for all stages of Hodgkin lymphoma. Results in 118 patients. *Haematologica* 2009; s2: 205, abst. 0504.
64. Ruiz de Gaona E., Serra P., Rodriguez-Otero P. et al. Positron emission tomography using 18F-fluorodeoxy glucose for evaluation of residual follicular non-Hodgkin Lymphoma. *Haematologica* 2007; s1: 432, abst. 1179.
65. Markova J., Kobe C., Skopalova M. et al. Early and late response assessment with FDG-PET after BEACOPP-based chemotherapy in advanced-stage Hodgkin's lymphoma patients has a high negative predictive value. *Haematologica* 2009; s2: 33, abst. 0084.
66. Pregno P., Chiappella A., Belli M. et al. Interim 18FDG-PET-CT failed to predict different outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. 51 ASH annual meeting. New-Orleans, 2009: abst. 99.
67. Rubio-Matinez A., Alvarez R., Garcia-Miralles M. et al. Early FDG-PET scan in advanced stage Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP-14. *Haematologica* 2007; s1: 471–472, abst. 1304.
68. Stefoni V., Broccoli A., Alinari L. et al. Predictive role of early interim FDG-PET in Hodgkin's lymphoma. 51 ASH annual meeting. New-Orleans, 2009: abst. 1659.

69. Nieuwenhuizen L., Verzijlbergen F.J., Witrink E. *et al.* A possible role of ^{18}F -FDG PET scanning the early detection of rituximab-induced pneumonitis in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2009; s2: 401–402, abst. 0996.
70. Arguiano J.M., Goni M.A., Mateos M.C. *et al.* False positive PET findings in lymphoma management. *Haematologica* 2009; s2: 655, abst. 1711.
71. Stroobants S., Brepels L., Thomas J., Verhoef G. PET-CT for treatment response assessment in lymphoma. *Haematologica* 2007; s5: 20, abst. 1066.
72. Abouzied M.M., Crawford E.S., Nabi H.A. ^{18}F FDG imaging pitfalls and artifacts. *J. Nucl. Med. Technol.* 2005; 33: 145–55.
73. Castellucci P., Zmzam P., Nanm C. *et al.* ^{18}F FDG PET early after radiotherapy in lymphoma patients. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2004; 19: 606–12.
74. Lavelly W.C., Delbeke D., Greer J.P. *et al.* FDG PET in the follow up management of patients with newly diagnosed Hodgkin and non Hodgkin lymphoma after first line chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003; 57: 307–15.
75. Suh C., Sohn B.S., Yoon D.H. The comparison between conventional procedures and ^{18}F -Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in response assessments of patients with T-cell non-Hodgkin's lymphoma after transplantation. *Haematologica* 2009; s2: 648, abst. 1691.
76. Barnngton S.F., O'Doherty M.J. Limitations of PET for imaging lymphoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2003; 30: S117–S127.
77. Ипатов В.В., Дергунова И.И., Михайловская Е.М. Совмещенная позитронно-эмиссионная и компьютерная томография в стадировании ходжкинских и неходжкинских лимфом. Сб. научных трудов Невского радиологического форума. СПб., 2009: 230–1.
78. Miltenyi Zs., Simon Zs., Illes A. *et al.* Observations with interim PET/CT in Hodgkin-and diffuse large B-cell lymphomas. *Haematologica* 2009; s2: 637, abst. 1657.
79. Allen-Auerbach M., Quon A., Weber W.A. *et al.* Comparison between 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography hardware fusion for staging of patients with lymphoma. *Mol. Imaging Biol.* 2004; 6: 411–6.
80. Hany T.F., Gharehpapagh E., Kamel E.M. *et al.* Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2002; 29: 1393–8.
81. Maeda L., Horning S., Iagaru A. *et al.* Role ^{18}F -FDG PET/CT Surveillance for patients with classical Hodgkin's disease in first complete response: the Stanford University experience. 51 ASH annual meeting. New-Orleans, 2009: abst. 1563.
82. Prochazka V., Papajik T., Kubova Z. *et al.* Integrated ^{18}F -FDG PET/CT may predict the outcome of patients with T-cell lymphomas. *Haematologica* 2009; s2: 646, abst. 1685.



Лейкоз/лимфома Беркитта: клинические особенности, диагностические критерии, терапевтическая тактика

Е. А. Барях, С. К. Кравченко, А. М. Кременецкая, Е. Е. Звонков, А. У. Магомедова,
Т. Н. Обухова, Ю. Ю. Попова, О. С. Финк, Г. А. Клясова, Е. М. Шулутко,
Г. М. Галстян, И. Б. Капланская, И. А. Воробьев, А. И. Воробьев

Burkitt leukemia/lymphoma: clinical features, diagnostic criteria, treatment

E. A. Baryakh, S. K. Kravchenko, A. M. Kremenetskaya,
E. E. Zvonkov, A. U. Magomedova, T. N. Obuhova,
Yu. Yu. Popova, O. S. Fynk, G. A. Klyasova, E. M. Shulutko,
G. M. Galstyan, I. B. Kaplanskaya, I. A. Vorobjov,
A. I. Vorobjov

SUMMARY

Burkitt lymphoma (BL) is the most aggressive B-cell lymphoid neoplasm, which growth phase fraction approximates 100%. BL has specific chromosomal abnormalities: t(8;14)(q24;q32), rare — t(2;8)(p12;q32) or t(8;22)(q24;q11). Burkitt leukemia/BL is one of the stages of Burkitt lymphoma according to S. B. Murphy's classification (blasts > 25%). 23 patients with BL (with *c-myc* rearrangement), 15 males and 8 females, mean age 24 years (15–51) were eligible for our study performed in the Russian Hematological Research Center between 1995 and 2009. The main diagnosis criteria of BL are: translocation t(8;14)(q24;q32) or variant *c-myc* rearrangement, blasts in bone marrow > 25%, young age, rapid tumor progression, bulky disease, tumor localization in abdominal and/or retro abdominal cavity, B-symptoms, increased LDG level, high number of Ki-67-positive cells approximates 100%; CD10+, bcl-6+, slgM+. 16 patients were included in high intensive short term protocol BL-M-04 (2003–2009). The 5-year disease-free survival was 87% with an overall survival of 81%. Most infectious and hemorrhagic complications occurred during the first course (course A), which can be explained by the initial poor condition of the patients. The use of this protocol can achieve rapid tumor regression with short treatment duration due to the chemotherapy intensification.

Keywords

Burkitt lymphoma, Burkitt leukemia, treatment, survival, adult, BL-M-04, NHL-BFM-90.

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Контакты: ebaryakh@gmail.com

Принято в печать: 13 мая 2010 г.

РЕФЕРАТ

Лимфома Беркитта является наиболее агрессивной В-клеточной опухолью с высокой пролиферативной активностью (Ki-67 около 100%) и характерными хромосомными аномалиями: t(8;14)(q24;q32), реже — t(2;8)(p12;q32) или t(8;22)(q24;q11). Лейкоз/лимфома Беркитта (ЛЛБ) в соответствии с классификацией S. B. Murphy — одна из стадий лимфомы Беркитта при наличии поражения костного мозга (число бластных клеток более 25%). С 1995 по 2009 г. в ГНЦ РАМН наблюдалось 23 пациента с цитогенетически подтвержденным диагнозом лимфомы Беркитта, 15 мужчин и 8 женщин в возрасте 15–51 год (медиана 24 года). Основные диагностические критерии и клинические черты ЛЛБ: транслокация t(8;14)(q24;q32) или варианты перестройки локуса гена *c-myc*, число бластов в костном мозге более 25%, молодой возраст, быстрый рост опухоли, большая опухолевая масса, наиболее частая локализация опухоли — брюшная полость или забрюшинное пространство, наличие В-симптомов, повышение активности ЛДГ, высокая пролиферативная активность (Ki-67 около 100%), наличие В-клеточных маркеров: CD10+, bcl-6+, slgM+. 16 пациентов получали лечение согласно короткому высокоинтенсивному протоколу ЛБ-M-04 (2003–2009 гг.). 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 87%, 5-летняя общая выживаемость — 81%. Наибольшее количество инфекционных и геморрагических осложнений наблюдалось во время первого курса химиотерапии, (блок А), что связано с исходно тяжелым состоянием пациентов. Использование данного протокола позволяет достичь быстрой регрессии опухоли благодаря интенсификации терапии и сокращению ее продолжительности.

Ключевые слова

лимфома Беркитта, лейкоз/лимфома Беркитта, терапия, выживаемость, взрослые, ЛБ-M-04, NHL-BFM-90.



ВВЕДЕНИЕ

Лимфома Беркитта — гетерогенная группа преимущественно экстракраниальных агрессивных В-клеточных лимфом с высокой пролиферативной активностью и характерными хромосомными аномалиями — t(8;14)(q24;q32) — или вариантами перестройками гена *c-myc*. По клинико-эпидемиологическим особенностям выделяют три варианта лимфомы Беркитта: эндемический, спорадический

и вариант, ассоциированный с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Лейкоз/лимфома Беркитта (ЛЛБ) является одной из стадий лимфомы Беркитта в соответствии с классификацией S. B. Murphy при наличии поражения костного мозга (число бластных клеток более 25%) [1]. При эндемическом варианте поражение костного мозга определяется в 8–10% случаев, при спорадическом — в 20–35%, при ВИЧ-ассоциированном — в 30–38% случаев [2, 3].

С 1995 по 2009 г. в клиниках ГНЦ РАМН наблюдалось 23 пациента с цитогенетически подтвержденным диагнозом ЛЛБ, 15 мужчин и 8 женщин, средний возраст — 24 года (диапазон 15–51 год). Все пациенты были ВИЧ-отрицательны. Больные ЛЛБ составили 29 % всех пациентов с лимфомой Беркитта, наблюдавшихся за этот же период.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ДАННЫЕ

Клинические проявления ЛЛБ, как правило, были обусловлены локализацией опухоли (рис. 1–4). Большинство больных поступали в тяжелом состоянии, обусловленном большой опухолевой массой, интоксикацией, истощением, метаболическими и электролитными нарушениями. По анамнестическим данным период заболевания до установления диагноза составил 1 мес. (0,5–2 мес.). Клиническая характеристика пациентов ЛЛБ представлена в табл. 1. У 16 (70 %) больных в опухолевый процесс вовлекались органы брюшной полости (см. табл. 1).

У больных ЛЛБ достоверно чаще выявляли поражение селезенки, печени, почек, легких и средостения по сравнению с больными без лейкозного поражения костного мозга. Острая почечная недостаточность (ОПН) на фоне специфического поражения почек и синдрома массивного цитолиза опухоли также наблюдалась только у больных с ЛЛБ. Лечение этих пациентов проводилось одновременно с ежедневными сеансами гемодиализа, суммарно проведено от 3 до 10 сеансов.

У 2 больных ЛЛБ в результате сдавления мочеточников опухолевым конгломератом брюшной полости диагностирован гидронефроз. При начале химиотерапии нарушения уродинамики регрессировали самостоятельно, необходимости в дренировании мочевых путей (установление нефростомы, стента в мочеточник) не было. В обоих случаях механической желтухи у больных с опухолью панкреатодуоденальной зоны установлена чрескожная чреспеченочная холецистостома. У 2 из 3 пациентов с поражением вальдейерова кольца, рото- и носоглотки имела место угроза асфиксии, в связи с чем лечение начато в отделении реанимации. Одной больной предфаза протокола ЛБ-М-04 проводилась на фоне продолжительной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в связи с критическим стенозом гортани и кровотечением из небной миндалины после биопсии. В дальнейшем при быстрой регрессии опухоли больная была экстубирована и переведена в гематологическое отделение, где продолжено лечение по принятому в отделении протоколу [4].

Обращает на себя внимание более частое поражение ЦНС при ЛЛБ в отличие от лимфомы Беркитта I–IV стадии (по S. B. Murphy), которое имело место в 39 и 14 % случаев соответственно [5].

У всех пациентов ЛЛБ определялись В-симптомы и повышение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ЛДГ была в пределах 500–30 400 ЕД/л, у 20 больных она превышала 1000 ЕД/л. В то же время у пациентов с I–IV стадией В-симптомы и повышение активности ЛДГ выявляются в 68 и 70 % случаев соответственно. Таким образом,



Рис. 1. Поражение нижней челюсти



Рис. 2. Поражение вальдейерова кольца, рото- и носоглотки



Рис. 3. Поражение периферических лимфоузлов



Рис. 4. Массивная опухоль брюшной полости

Таблица 1. Клиническая характеристика больных лейкозом/лимфомой Беркитта и лимфомой Беркитта I–IV стадии (по S. B. Murphy)

Параметр	Число больных	
Локализация поражения	Лейкоз/лимфома Беркитта (n = 23)	I–IV стадия лимфомы Беркитта (n = 56)
Печень	11 (48%)	10 (18%)
Абдоминальные и забрюшинные лимфоузлы	11 (48%)	26 (46%)
Селезенка	10 (43%)	2 (4%)
Кишечник	8 (35%)	22 (39%)
Желудок	8 (35%)	11 (20%)
Поджелудочная железа	6 (26%)	7 (13%)
Почки	6 (26%)	6 (11%)
Яичники	4 (50%)	5 (71%)
Мочевой пузырь	2 (7%)	2 (4%)
Желчный пузырь и желчные протоки	3 (13%)	0 (0%)
Средостение	4 (17%)	4 (7%)
Легкие	3 (13%)	3 (5%)
Лицевой скелет и мягкие ткани лица	3 (13%)	7 (13%)
Вальдейерово кольцо, рото- и носоглотка	3 (13%)	3 (5%)
Периферические лимфоузлы	7 (30%)	12 (21%)
Яички	1 (7%)	4 (8%)
Поражение ЦНС	9 (39%)	8 (14%)
Нейролейкоз	6	5
Интратормор спинного мозга	2	2
Нейролейкоз + интратормор головного мозга	2	2
Острая почечная недостаточность	6 (26%)	6 (11%)
Гидронефроз	2 (7%)	7 (13%)
Асцит	8 (35%)	19 (34%)
Плеврит	4 (17%)	6 (11%)
Механическая желтуха	2 (7%)	1 (2%)

при ЛЛБ у больных значительно чаще отмечалась интоксикация, что дополнительно отягощало их состояние. Бластные клетки в периферической крови определялись у 5 больных (рис. 5). Лейкоцитоз составил $12\text{--}62 \times 10^9/\text{л}$, число бластов в периферической крови варьировало от 3 до 87 %. Тромбоцитопения выявлена у 4 больных, анемия — у 3. В костном мозге число бластов составляло 25–97 %.

Диагноз ЛЛБ установлен на основании исследования костного мозга без биопсии лимфоузла/опухоли у 7 больных, при биопсии опухоли — у 16.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

У всех пациентов ЛЛБ цитологическая картина была однотипной: в отпечатках опухоли присутствовали клетки среднего и крупного размера с нежной структурой хроматина и интенсивно базофильной вакуолизированной цитоплазмой, в большом количестве были видны макрофаги и митозы (рис. 6). При гистологическом исследовании биоптата опухоли в 78 % случаев выявлена картина «звездного неба», обусловленная присутствием большого числа макрофагов

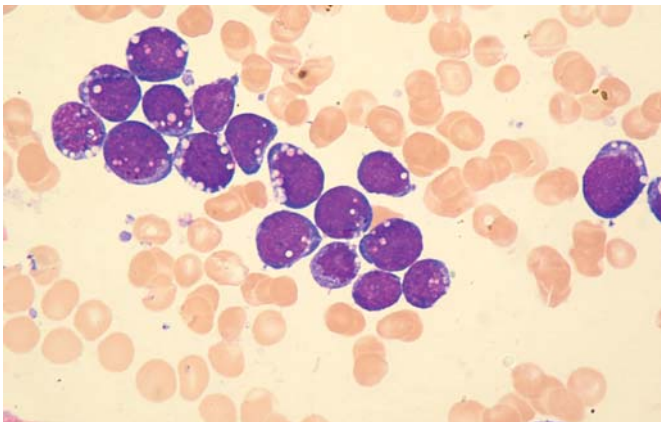


Рис. 5. Бласты в периферической крови у больного лимфомой Беркитта, ×100

(рис. 7). В остальных случаях наблюдалась гистологическая картина, характерная для диффузной В-крупноклеточной лимфомы: диффузная пролиферация крупных атипичных клеток с умеренно выраженным клеточным полиморфиз-

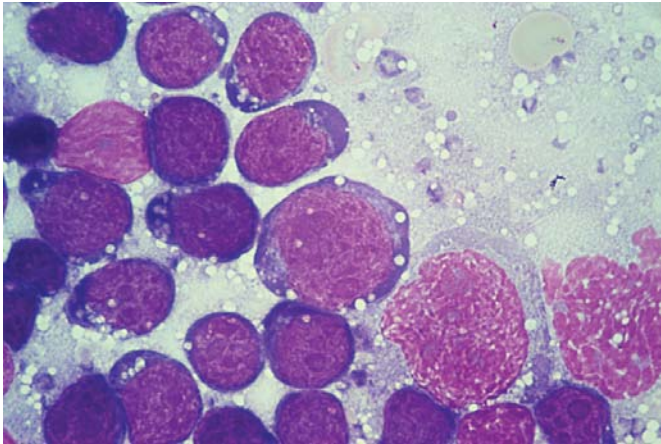


Рис. 6. Цитологическая картина отпечатков ткани опухоли, ×100

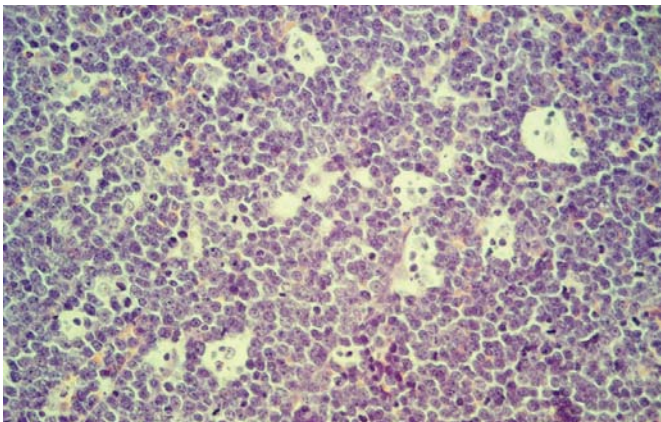


Рис. 7. Биоптат опухоли. Картина «звездного неба», ×40

мом, наличием достаточного количества митозов. Морфологическая картина у больных с I–IV стадиях лимфомы Беркитта не отличалась от таковой у больных с ЛЛБ.

ИММУНОФЕНОТИП

Иммунофенотип опухолевых клеток определяли методом проточной флюориметрии, световой иммунофлюоресценции на суспензии опухолевых клеток и методом иммуногистохимии на гистологических срезах парафиновых блоков. Опухолевые клетки имели иммунофенотип sIgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD10+, bcl-6+, c-myc+, Ki-67 около 100 %. Важным дифференциально-диагностическим критерием является отсутствие или очень слабая экспрессия (< 20 %) bcl-2.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Для выявления диагностических транслокаций у больных ЛЛБ в 9 случаях исследовали клетки лимфоузла или опухоли, в 7 — клетки костного мозга, в 7 — парафиновые блоки биоптатов. Стандартное цитогенетическое исследование (G-дифференциальная окраска хромосом) выполнено 9 больным ЛЛБ. В тех случаях, когда диагностические транслокации t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24) или t(8;22)(q24;q11) не выявлялись при стандартном цитогенетическом исследовании (отсутствие митозов), проводили исследование методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

При отсутствии нативного материала для проведения стандартного цитогенетического исследования или FISH на суспензии опухолевых клеток в связи с тем, что биопсия проводилась по месту жительства, FISH делалась на гистологических срезах парафиновых блоков для выявления t(8;14)(q24;q32) или вариантных перестроек локуса гена *c-myc*. Использовали ДНК-зонд LSI IgH/MYC, CEP 8 Tri-color, Dual Fusion Translocation Probe (Vysis, США), состоящий из двух локус-специфических проб IgH и MYC и пробы к центромере хромосомы 8. Проба IgH окрашена флюорохромом зеленого цвета и гибридизуется с участком около 1,5 Мб в локусе 14q32; проба MYC красного цвета покрывает область длиной около 821 kb в локусе 8q24, включая ген *c-myc*; проба к центромере хромосомы 8 окрашена флюорохромом голубого цвета. В случаях отсутствия t(8;14)(q24;q32), наличия двух сигналов от центромеры хромосомы 8 и дополнительного сигнала от локуса 8q24 выполняли FISH для выявления вариантных транслокаций. Использовали ДНК-зонд LSI MYC, Dual color, Break Apart Rearrangement Probe (Vysis, США), состоящий из пробы красного цвета длиной около 260 kb и пробы зеленого цвета около 400 kb, гибридизующихся с участками ДНК в стороны центро- и теломеры от гена *c-myc*.

FISH на суспензии опухолевых клеток либо на мазках-отпечатках опухоли выполнена 7 больным, FISH на гистологических срезах парафиновых блоков — также 7 пациентам.

Транслокация t(8;14)(q24;q32) выявлена у 17 (74 %) больных, t(8;22)(q24;q11) — у 2, t(2;8)(p12;q24) — у 1 пациента. В 3 случаях методом FISH определена перестройка локуса гена *c-myc* при отсутствии транслокации t(8;14)(q24;q32), что свидетельствует о наличии одной из вариантных транслокаций: t(2;8)(p12;q24) или t(8;22)(q24;q11).

Из наиболее частых дополнительных хромосомных аномалий выявлялась dup(1)(q21-q25) — у 3 из 9 больных, у 2 пациентов обнаружены субклоны.

ЛЕЧЕНИЕ ЛЕЙКОЗА/ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА

Историю программной терапии как лимфомы Беркитта, так и ЛЛБ можно разделить на пять последовательных этапов:

- монотерапия циклофосфаном;
- лечение по схемам В-острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) — программе Хельцера и ее аналогов;
- терапия по программам «золотого стандарта» лечения лимфом — СНОР и СНОР-подобными курсами;
- 5–7-месячные блоковые схемы (NHL-BFM, Hyper-CVAD);
- короткие (3-месячные) высокоинтенсивные протоколы (CODOX-M/IVAC, LMB).

Первые попытки лечения ЛЛБ были предприняты в конце 60-х годов прошлого века Джоном Зиглером, использовавшим для лечения эндемичного варианта лимфомы Беркитта монотерапию циклофосфаном в дозе 40 мг/кг с интервалом 2 нед. 2-летняя общая выживаемость (ОВ) при I–III стадиях не превышала 45 %, все больные с IV стадией ЛЛБ погибли в течение 4–6 мес. [6]. Лечение по протоколам ОЛЛ оказалось малоэффективным, краткосрочные ремиссии достигались у 20–60 % больных, 3-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) не превышала 30 % [7, 8]. В дальнейшем предпринималась попытка использования при ЛЛБ курсов СНОР и СНОР-подобных. С помощью данных схем удавалось добиться лишь кратковременной ремиссии у 40–50 % больных [9].

Дальнейшее лечение пошло по пути интенсификации химиотерапии и сокращения ее продолжительности, что кардинально изменило результаты лечения, позволив достичь ремиссии у 85–90 % больных и увеличить 5-летнюю ОВ до 60–85 % в зависимости от стадии заболевания [10–13]. Впервые короткие интенсивные схемы полихимиотерапии (ПХТ), включающие фракционированное введение циклофосфана, ифосфамид, винкристин, метотрексат, доксорубицин, цитозар, а также адекватную профилактику нейтролейкоза, были использованы в педиатрической практике. Это позволило достичь ремиссии у 88–92 % детей, а у 50–87 % получить длительную БРВ, в т. ч. и при III–IV стадиях заболевания [14–19]. Терапия по программе NHL-BFM-90 дала возможность достичь 6-летней бессобытийной выживаемости при RI, RII и RIII (группах риска) у 100, 96 и 78 % пациентов соответственно [20]. Сопоставимые результаты получены отечественными детскими гематологами [21–23]. S. B. Murphy предложила для использования у детей режим Hyper-CVAD, полные ремиссии удалось получить у 93 % пациентов. 4-летняя БРВ составила 79 % у пациентов с лимфомой Беркитта (I–IV стадия) и 65 % — у больных ЛЛБ [24]. Становилось очевидным, что интенсификация терапии позволяла получить наилучшие результаты, не увеличивая количество рецидивов, в т. ч. у больных с плохим прогнозом. Это подтверждали результаты лечения детей по протоколам LMB и CODOX-M/IVAC и другим высокоинтенсивным программам [11, 12].

Использование аналогичных протоколов у взрослых позволило достичь ремиссии у 63–79 % пациентов с лимфомой Беркитта, но 2-летняя БРВ и ОВ составляли 50–65 %, а у пациентов с ЛЛБ — 30–50 % [11, 12]. В ГНЦ РАМН при лечении больных по протоколу NHL-BFM-90 (1995–2003 гг.) получены аналогичные результаты [5].

Таким образом, при IV стадии заболевания и ЛЛБ не удавалось получить хороших результатов, что свидетельствовало о низкой эффективности данных протоколов для пациентов с поражением ЦНС и лейкемизацией и о необходимости поиска новых подходов к лечению этих больных.

Схема 1. Программа NHL-BFM-90
6 блоков: предфаза А-В-С-А-В-С (4,5–5 мес.).

Предфаза

- 1. Циклофосфан 200 мг/м² в 1–5-й день.
- 2. Дексаметазон 20 мг внутрь в 1–5-й день.

Блок А

- 1. Дексаметазон 20 мг в 1–5-й день
- 2. Винкристин 2 мг в 1-й день
- 3. Ифосфамид 800 мг/м² в 1–5-й день
- 4. Метотрексат 1500 мг/м² в 1-й день
- 5. Цитозар 150 мг/м² в 4–5-й день
- 6. Вепезид 100 мг/м² в 4–5-й день

Блок В

- 1. **Доксорубицин 25 мг/м² в 3-й, 4-й дни**
- 2. Винкристин 2 мг в 1-й день
- 3. **Метотрексат 1500 мг/м² в 1-й день**
- 4. Дексаметазон 20 мг в 1–5-й день
- 5. Циклофосфан 200 мг/м² в 1–5-й день

Блок С

- 1. Дексаметазон 20 мг в 1–5-й день
- 2. Вепезид 150 мг/м² в 3–5-й день
- 3. Цитозар 2 г/м² во 2–3-й день
- 4. Винбластин 10 мг в 1-й день

Схема 2. Модифицированная программа ЛБ-М-04
4 блока: предфаза А-С-А-С (3 мес.).

Предфаза

- 1. Циклофосфан 200 мг/м² в 1–5-й день.
- 2. Дексаметазон 20 мг внутрь в 1–5-й день.

Блок А

- 1. Дексаметазон 20 мг в 1–5-й день
- 2. Винкристин 2 мг в 1-й день
- 3. Ифосфамид 800 мг/м² в 1–5-й день
- 4. Метотрексат 1500 мг/м² в 1-й день
- 5. Цитозар 150 мг/м² в 4–5-й день
- 6. Вепезид 100 мг/м² в 4–5-й день
- 7. Доксорубицин 50 мг/м² в 3-й день
- 8. Люмбальная пункция с введением 3 препаратов в 1-й день курса: цитозар 30 мг, метотрексат 15 мг, дексаметазон 4 мг

Блок С

- 1. Дексаметазон 20 мг в 1–5-й день
- 2. Вепезид 150 мг/м² в 3–5-й день
- 3. Метотрексат 1500 мг/м² в 1-й день
- 4. Винбластин 10 мг в 1-й день
- 5. Цитозар 2 г/м² 2 раза в сутки во 2–3-й день
- 6. Люмбальная пункция с введением 3 препаратов в 1-й день курса: цитозар 30 мг, метотрексат 15 мг, дексаметазон 4 мг

Интервал между курсами 21 день.

Таблица 2. Результаты лечения пациентов с лейкозом/лимфомой Беркитта и лимфомой Беркитта I–IV стадии (по S. B. Murphy) по протоколу ЛБ-М-04

Параметр	Число пациентов		
	Лейкоз/лимфома Беркитта (n = 16)	I–IV стадия лимфомы Беркитта (n = 28)	Всего (n = 44)
Ремиссия	15 (89%)	25 (89%)	40 (91%)
Прогрессия	1	0	1
Смерть от осложнений ПХТ	0	3	3
Ранний рецидив	2	0	2
5-летняя БРВ, %	87	100	95
5-летняя ОВ, %	81	89	86

Из 23 больных ЛЛБ в 2 случаях проводилось непрограммное лечение, 5 пациентов лечились по протоколу NHL-BFM-90 (все погибли, причины смерти: ранний рецидив — 2 больных, прогрессия — 2, смерть в индукции — 1), 16 больным проведено лечение по протоколу ЛБ-М-04.

В связи с недостаточной эффективностью протокола NHL-BFM-90 (5-летняя БРВ 80 %, 5-летняя ОВ 50 %), особенно у пациентов с В-ОЛЛ (5 из 5 погибли), в августе 2003 г. в ГНЦ РАМН внедрен новый исследовательский протокол терапии лимфомы Беркитта и ЛЛБ — «Лимфома Беркитта-Москва-04» (ЛБ-М-04). Основная цель создания протокола — повышение эффективности лечения больных с лимфомой Беркитта за счет интенсификации терапии и сокращения ее продолжительности. За основу взят модифицированный протокол NHL-BFM-90, ветвь высокого риска, с дозой метотрексата 1500 мг/м². Протокол NHL-BFM-90 (ветвь высокого риска) представляет собой последовательное проведение 5-дневной предфазы циклофосфаном и дексаметазоном и блоков: А-В-С-А-В-С. В блок А входят: метотрексат, винкристин, ифосфамид, вепезид, цитозар, дексаметазон; в блок В: метотрексат, винкристин, циклофосфан, доксорубицин, дексаметазон; в блок С: цитозар, винбластин, дексаметазон, вепезид (см. схему 1).

В связи с высокой химиочувствительностью лимфомы Беркитта предполагалось проводить 4 блока: 2 индукционных и 2 консолидирующих. Дальнейшая химиотерапия представлялась нецелесообразной: она не повышала эффективности лечения, но увеличивала количество осложнений в период цитопении. Было решено интенсифицировать ПХТ первой линии, особенно индукционных курсов, с введением макси-

мально возможного числа препаратов, не обладающих перекрестной резистентностью. Учитывая данные о наибольшей чувствительности опухоли к высоким дозам метотрексата и цитозара, решено использовать эти препараты в фазе индукции с целью получить максимальный циторедуктивный эффект [10, 25]. Для достижения ремиссии применяли блоки А и С протокола NHL-BFM-90. С целью интенсификации терапии к блоку А добавляли доксорубицин, к блоку С — метотрексат. Блок С классически используется при отсутствии ответа на лечение, мы внедрили его в терапию первой линии, когда опухолевые клетки наиболее чувствительны к химиопрепаратам, не дожидаясь формирования первичной резистентности. Курсы консолидации ремиссии были аналогичны индукционным (см. схему 2). Таким образом, блок В был исключен из протокола, а блоки А и С — интенсифицированы препаратами, входящими в блок В. Интервал между блоками остался прежним — 21 день [25–27].

Результаты лечения больных ЛЛБ и лимфомой Беркитта I–IV стадии по протоколу ЛБ-М-04 представлены в табл. 2. Первичная рефрактерность (прогрессия на фоне терапии и ранний рецидив) наблюдалась только у больных ЛЛБ, что и объясняет более низкую 5-летнюю БРВ и ОВ — 87 и 81 % в сравнении с пациентами с I–IV стадией заболевания — 100 и 89 % соответственно. Три летальных исхода в группе пациентов с I–IV стадией заболевания относятся к периоду первого года внедрения протокола в клиническую практику лечения больных с лимфомой Беркитта, когда отсутствовал опыт ведения этих тяжелых пациентов, не была отработана сопроводительная терапия.

Общая продолжительность лечения — 3–3,5 мес.

Гематологическая токсичность курсов соответствовала III–IV степени. Все курсы сопровождались развитием миелотоксического агранулоцитоза. Характеристика осложнений у больных ЛЛБ в период лечения по протоколу ЛБ-М-04 представлена в табл. 3.

Из представленных результатов видно, что основные терапевтические проблемы наблюдаются при проведении первого блока химиотерапии (раннее начало и большая продолжительность миелотоксического агранулоцитоза, повышенное число инфекционных и геморрагических осложнений, более частое, чем при последующих блоках, развитие тяжелых бактериальных, грибковых и вирусных инфекций, необходимость в гемодиализе, расширенной сопро-

Таблица 3. Характеристика осложнений у пациентов с лейкозом/лимфомой Беркитта при лечении по протоколу ЛБ-М-04

Осложнения в период агранулоцитоза	Блоки/число больных			
	A1 (n = 16)	C1 (n = 16)	A2 (n = 16)	C2 (n = 15)
Продолжительность агранулоцитоза, медиана, дни	11	6	5	7
Продолжительность агранулоцитоза, дни	3–24	1–20	1–10	3–16
Синдром массивного цитолиза опухоли	9 (63%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Стоматит, мукозит	13 (81%)	9 (56%)	13 (81%)	8 (53%)
Эзофагит	4 (25%)	1 (6%)	3 (19%)	0 (0%)
Некротическая энтеропатия	6 (37%)	5 (31%)	3 (19%)	3 (20%)
Пневмония	2 (12%)	0 (0%)	2 (12%)	2 (13%)
Пневмония, острая дыхательная недостаточность, ИВЛ	5 (31%)	1 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
Сепсис	6 (37%)	2 (12%)	2 (12%)	2 (13%)
Септический шок	2 (12%)	11 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
Проктит, парапроктит, анальная трещина	0 (0%)	1 (6%)	2 (12%)	1 (7%)
Менингит	3 (19%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Герпетическая инфекция	2 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
Мочевая инфекция	2 (12%)	1 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
Катетерный сепсис	0 (0%)	2 (12%)	1 (6%)	1 (7%)
Геморрагический синдром	6 (37%)	0 (0%)	1 (6%)	1 (7%)
Токсический гепатит	2 (12%)	1 (6%)	0 (0%)	1 (7%)

водительной терапии, проведение массивной инфузионно-трансфузионной терапии).

Подобная ситуация обусловлена исходно тяжелым состоянием большинства пациентов, связанным с:

- большой опухолевой массой, часто по типу bulky disease;
- интоксикацией;
- истощением вплоть до кахексии;
- предыдущим лечением;
- нарушением функции почек и/или уродинамики за счет специфического поражения почек или сдавления опухолевым конгломератом мочевых путей с развитием ОПН;
- наличием в анамнезе расширенных полостных операций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные диагностические критерии ЛЛБ:

- t(8;14)(q24;q32) или варианты перестройки локуса гена *c-myc* — главный диагностический критерий ЛЛБ;
- бласты в костном мозге более 25 % с характерной морфологией: бластная структура хроматина, интенсивно базофильная вакуолизированная цитоплазма;
- молодой возраст пациентов;
- быстрый рост опухоли (короткий анамнез заболевания);
- большая опухолевая масса;
- наиболее частая локализация опухоли: брюшная полость, забрюшинное пространство;
- В-симптомы, повышение активности ЛДГ;
- высокая пролиферативная активность (Ki-67 около 100 %); наличие В-клеточных маркеров: CD10+, bcl-6+; sIgM+.

Наиболее перспективным направлением в терапии ЛЛБ представляется короткая интенсивная ПХТ. При лечении по протоколу ЛБ-М-04 5-летняя БРВ составила 87 %, 5-летняя ОВ — 81 %. Для повышения эффективности терапии представляется целесообразным включение в протокол ритуксимаба (Мабтера).

ЛИТЕРАТУРА

1. Murphy S.B. Classification, staging and results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. Semin. Oncol. 1980; 7(3): 332–9.

2. Clift R.A., Wright D.H., Clifford P. Leukaemia in Burkitt's lymphoma. Blood 1963; 22(3): 243–51.

3. Blum K.A., Lozansky G., Byrd J. Adult Burkitt's leukaemia and lymphoma. Blood 2004; 104: 3009–20.

4. Финк О.С., Барях Е.А., Кравченко С.К., Фоломеев В.Н. Тактика терапии лимфомы Беркитта с вовлечением миндалины и угрозой асфиксии. Гематол. и трансфузиол. 2009; 54(3): 28–30.

5. Барях Е.А., Кравченко С.К., Обухова Т.Н. и др. Лимфома Беркитта: клиника, диагностика, лечение. Клин. онкогематол. 2009; 2(2): 137–46.

6. Ziegler J.L., Morrow R.H., Fass L. et al. Treatment of Burkitt's lymphoma tumor with cyclophosphamide. Cancer 1970; 26(2): 474–84.

7. Baccarani M., Corbelli G., Amadori S. et al. Adolescent and adult lymphoblastic leukemia: prognostic features and outcome of therapy — a study of 293 patients. Blood 1982; 60: 677–84.

8. Gill P.S., Meyer P.R., Pavlova Z. et al. B-cell acute lymphocytic leukemia in adults: clinical, morphologic and immunologic findings. J. Clin. Oncol. 1986; 4: 737–43.

9. Bernstein J.I., Coleman C.N., Strickler J.G. et al. Combined modality therapy for adult with small noncleaved cell lymphoma (Burkitt's and Burkitt-like type). J. Clin. Oncol. 1986; 4: 847–58.

10. Hoelzer D., Ludwig J., Thiel E. et al. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 1996; 87: 495–508.

11. Magrath I., Adde M., Shad A. et al. Adult and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. J. Clin. Oncol. 1996; 14: 925–34.

12. Soussain C., Patte C., Ostronoff M. et al. Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adult. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. Blood 1995; 85: 664–74.

13. Thomas D., Cortes J., O'Brien S. et al. Hyper-CVAD program in Burkitt's type adult acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 2461–70.

14. Bowman W., Shuster J., Cook B. et al. Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a Pediatric Oncology group study. J. Clin. Oncol. 1996; 14: 1252–61.

15. Patte C., Philip T., Rodary C. et al. High survival rate in advanced-stage B-cell lymphomas and leukemias without CNS involvement with a short intensive polychemotherapy: results from the French Pediatric Oncology Society of a randomized trial of 216 children. J. Clin. Oncol. 1991; 9: 123–32.

16. Patte C., Philip T., Rodary C. et al. Improved survival rate in children with stage III–IV B-cell non-Hodgkin lymphoma and leukemia using multiagent chemotherapy: results of a study of 114 children from the French Pediatric Oncology Society. J. Clin. Oncol. 1986; 8: 1219–26.

17. Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.-D. et al. Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group. Blood 1992; 90: 2471–8.

18. Reiter A., Schrappe M., Parwaresch R. et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage — a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group. J. Clin. Oncol. 1995; 13: 359–72.

19. Murphy S., Bowman W., Abromovitch M. et al. Results of treatment of advanced-stage Burkitt's lymphoma and B-cell (Slg+) acute lymphoblastic leukemia with high-dose fractionated cyclophosphamide and coordinated high-dose methotrexate and cytarabine. J. Clin. Oncol. 1986; 4: 1732–9.

20. Reiter A., Schrappe M., Tiemann M. et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM-90. Blood 1999; 94(10): 3294–306.

21. Самочатова Е.В., Островская А.В., Карачунский А.И. и др. Значение верификации варианта неходжкинских лимфом у детей для эффективности лечения по современным протоколам. Гематол. и трансфузиол. 2000; 6: 9–14.

22. Самочатова Е.В., Алейникова О.В., Беликова Л.Ю. и др. Неходжкинские лимфомы у детей: клиническая характеристика, возможности диагностики и терапии; по данным клиник России и Белоруссии. Гематол. и трансфузиол. 2001; 46(1): 3–10.

23. Самочатова Е.В., Мякова Н.В., Литвинов Д.В. и др. Применение ритуксимаба (мабтеры) в комбинированном лечении В-клеточных неходжкинских лимфом у детей: предварительные результаты. Вопр. гематол. онкол. и иммунопат. в педиатрии 2004; 3(4): 54–9.

24. Lones M.A., Sanger W.G., Le Beau M.M. et al. Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2004; 26(3): 169–78.

25. Барях Е.А. Диагностика и лечение лимфомы Беркитта. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007.

26. Барях Е.А., Звонков Е.Е., Кременецкая А.М. и др. Лечение беркиттоподобной лимфомы взрослых. Тер. арх. 2005; 7: 53–8.

27. Барях Е.А., Звонков Е.Е., Кременецкая А.М. и др. Новый короткий высокоинтенсивный протокол терапии лимфомы Беркитта взрослых ЛБ-М-04: промежуточные результаты. Гематол. и трансфузиол. 2006; 6: 3–11.

Результаты дифференциальной диагностики
и терапии первичной медиастинальной
В-крупноклеточной лимфомыК.Д. Капланов, И.В. Матвеева, Т.Ю. Клиточенко, Л.С. Трегубова, О.Е. Голубева,
О.В. Левина, А.Л. Шипаева, В.А. Васильева, О.Б. Калашникова**Diagnostic discordances and results
of treatment of primary mediastinal
diffuse large B-cell lymphoma**K.D. Kaplanov, I.V. Matveeva, T.U. Klitochenko,
L.S. Tregubova, O.E. Golubeva, O.V. Levina,
A.L. Shipaeva, V.A. Vasileva, O.B. Kalashnikova**SUMMARY**

Results of diagnostic work up and treatment of 42 patients admitted to our department from October 2003 to April 2009 with preliminary histological diagnosis of primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma are presented. After review of histological slides and immunohistochemical evaluation of biopsied material the diagnosis of primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma was verified in 36 (86%) of cases. In the rest of the patients the final diagnoses were as follows: anaplastic large T-cell lymphoma (2), T-cell lymphoblastic lymphoma (1), myeloid sarcoma (1), neuroendocrine cancer (2). The chemotherapy protocols used for treatment of patients with verified diagnosis of primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma were as follows: 17 patients — R-CHOD(8)-R-EDHAP, 4 patients — R-CHOP-like chemotherapy. Without rituximab group: 9 patients — CHOD(8)-EDHAP, 3 — MACOP-B and 3 — CHOP. Overall 5-year survival for all patients treated was 83%.

Keywords

primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma, chemotherapy, rituximab, overall survival, diagnostic discordances.

Volgograd Regional Clinical Oncological Dispensary No. 1

Контакты: kamilos@mail.ru

Принято в печать: 24 мая 2010 г.

РЕФЕРАТ

Представлены данные о дифференциальной диагностике и терапии 42 пациентов, поступивших в отделение гематологии с морфологическим заключением «медиастинальная крупноклеточная лимфома», в период с октября 2003 г. по апрель 2009 г.

После иммуногистохимического исследования первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (ПМБКЛ) верифицирована у 36 (86%) пациентов. У 6 пациентов ПМБКЛ не подтверждена, у 2 из них установлена Т-анплазированная крупноклеточная лимфома, у 1 — Т-лимфобластная лимфома, у 1 — опухоль с фенотипом миелобластов и у 2 — нейроэндокринный рак. 21 больному ПМБКЛ проведена комбинированная химиотерапия с ритуксимабом: 17 пациентов получили R-CHOD(8)-R-EDHAP, 4 — CHOP-подобную терапию с ритуксимабом. 15 пациентов проходили терапию без ритуксимаба: 9 — CHOD(8)-EDHAP, 3 — MACOP-B и 3 — CHOP. Общая 5-летняя выживаемость больных ПМБКЛ составила 83%.

Ключевые слова

первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, химиотерапия, ритуксимаб, общая выживаемость, дифференциальная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Среди агрессивных лимфом с исходным поражением средостения подавляющее большинство представлено первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой (ПМБКЛ). ПМБКЛ — вариант диффузной В-крупноклеточной лимфомы, предположительно развивающийся из тимических В-лимфоцитов и характеризующийся отличительными клиническими, иммунофенотипическими и генотипическими признаками [1].

ПМБКЛ составляет около 2–4 % среди всех неходжкинских лимфом, встречается чаще у лиц молодого возраста (медиана возраста 35 лет), с преобладанием женщин в структуре заболевших (соотношение мужчин и женщин приблизительно 1:2) [2].

Тимическая локализация опухоли определяет поражение передневерхнего средостения. На момент диагностики

нередко имеется большой объем опухоли, проявляющийся синдромом сдавления верхней полой вены и возможным вовлечением в процесс смежных структур — легких, плевры или перикарда. Встречается поражение надключичных и шейных лимфоузлов. Отсутствие поражения других лимфоузлов или костного мозга имеет значение для исключения генерализованной диффузной В-крупноклеточной лимфомы с преимущественным поражением средостения. Для прогрессирования и диссеминации первичной В-медиастинальной лимфомы характерно поражение почек, надпочечников, печени или ЦНС [3, 4].

Морфологическая картина опухоли представлена клетками среднего и крупного размера с обильной цитоплазмой и округлыми или овальными ядрами. Некоторые случаи характеризуются плеоморфными и/или

многоядерными формами, похожими на клетки Березовского—Рид—Штернберга. Гистологическое исследование в большинстве случаев выявляет в ткани опухоли тяжи фиброза [5].

Иммуногистохимическое исследование определяет экспрессию В-клеточных антигенов: CD19, CD20, CD22 и CD79a. Опухолевые клетки часто позитивны при окрашивании антителами к MUM1 (75 %), PAX5 и CD23 (70 %). Характерна отрицательная реакция при окрашивании антителами к поверхностным иммуноглобулинам [2].

Базисным подходом к лечению первичной В-крупноклеточной лимфомы является терапия, включающая антрациклиновые агенты. Как этап консолидации достигнутой ремиссии после химиотерапии применяется локальная лучевая терапия [6].

Наиболее крупное из опубликованных исследований отмечает общую 10-летнюю выживаемость при ПМБКЛ, равную 65 %. Кривая выживаемости выходит на плато 65 % уже после 3 лет наблюдения. Общая 10-летняя выживаемость при СНОР-подобной терапии — 44 %, в случае лечения по программам МАСОР-В или ProMACE-ЦитаВОМ — 71 %. На фоне применения высокодозной химиотерапии с ауто-трансплантацией периферических стволовых кроветворных клеток общая 10-летняя выживаемость составила 77 % [7].

Ритуксимаб (Мабтера) — моноклональное анти-CD20-антитело, широко применяемое в комбинации с химиотерапией при лечении В-клеточных лимфом. Опубликованные работы по иммунохимиотерапии ПМБКЛ характеризуются небольшим количеством и коротким сроком наблюдений, что объясняется достаточно редкой встречаемостью данной формы в структуре В-крупноклеточных лимфом [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты с первичным опухолевым поражением средостения госпитализируются в торакоабдоминальное отделение ГУЗ Волгоградский областной клинический онкологический диспансер № 1.

После биопсии опухоли средостения при наличии гистологического заключения «медиастинальная крупноклеточная лимфома» пациенты переводятся в гематологическое отделение.

В период с октября 2003 г. по апрель 2009 г. с рабочим диагнозом «медиастинальная крупноклеточная лимфома» в отделение гематологии было переведено 42 пациента: 18 мужчин и 24 женщины. Медиана возраста больных составила 32 года (диапазон 20—79 лет), медиана наблюдения — 18 мес. (диапазон 5—68 мес.).

В табл. 1 представлены клинические характеристики 42 пациентов.

Иммуногистохимическое исследование биопсированной опухоли проведено во всех 42 случаях.

В 36 (86 %) из 42 случаев верифицирована ПМБКЛ. Опухолевые клетки демонстрировали типичную экспрессию В-клеточных маркеров: CD19, CD20, CD22, CD23 и CD79a. Экспрессия Ki-67 варьировала от 20 до 70 %.

26 (72 %) из 36 пациентов получили СНOD(8)-EDHAP — дозоинтенсивные курсы, включающие циклофосфан, доксорубицин, винкристин и дексаметазон, с последующей комбинацией этопозида, высоких доз цитозара, цисплатина и дексаметазона. В курсе СНOD(8) повторное введение циклофосфана, винкристина и доксорубицина осуществляется на 8-й день цикла, причем доза доксорубицина аналогична таковой в программе СНОР, а доза циклофосфана уменьшена с 750 до 650 мг/м². Вместо преднизолона назначается 2-недельный прием дексаметазона.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

Показатель	Число пациентов
Большая опухолевая масса	36 (86%)
Инфильтрация (прорастание) смежных структур по данным торакоскопии и КТ	35 (83%)
Синдром сдавления верхней полой вены	32 (76%)
Международный прогностический индекс	I — 8 (19%) II — 22 (52%) III — 12 (29%)
Стадия по Ann-Arbor	I — 5 (12%) II — 26 (62%) IV — 11 (26%)
В-симптомы	12 (29%)
Плеврит	9 (21%)
Перикардит	5 (12%)
Отдаленные экстранодальные поражения	3 (7%)
Повышение активности лактатдегидрогеназы	> 1 нормы — 12 (29%) > 2 норм — 5 (12%) > 3 норм — 11 (26%)

Основанием для использования такого варианта лечения был опыт Гематологического научного центра РАМН по терапии ПМБКЛ в соответствии с подобным протоколом [8] и собственный опыт лечения ПМБКЛ различными генерациями СНОР и МАСОР-В в период до 2003 г.

В 17 случаях терапия СНOD(8)-EDHAP усилена добавлением Мабтеры. 4 (11 %) из 36 больных получили СНОР-подобную терапию с включением Мабтеры. Остальные 6 (17 %) пациентов получили лечение режимами без ритуксимаба — СНОР-подобными схемами и терапией по программе МАСОР-В (метотрексат, доксорубицин, циклофосфан, винкристин, преднизолон, блеомицетин) (рис. 1).

Режим R-CHOD(8)-R-EDHAP представлен следующим образом.

Первый блок R-CHOD(8):

- Ритуксимаб (Мабтера) 375 мг/м² в/в в 0-й день.
- Циклофосфан 650 мг/м² в/в в 1-й и 8-й дни.
- Доксорубицин 50 мг/м² в/в в 1-й и 8-й дни.
- Винкристин 2 мг в/в в 1-й и 8-й дни.
- Дексаметазон 10 мг внутрь в 1–14-й день.

Второй блок R-CHOD(8) начинается на 28-й день терапии.

На 56-й день лечения начинается первый блок R-EDHAP:

- Ритуксимаб (Мабтера) 375 мг/м² в/в в 0-й день.
- Цисплатин 25 мг/м² в/в в течение 24 ч в 1–4-й день.
- Этопозид 60 мг/м² в/в в 1–4-й день.
- Цитозар 2000 мг/м² в/в капельно в течение 2 ч в 5-й день.
- Дексаметазон 40 мг в/в в 1–4-й день.

Второй блок R-EDHAP начинается на 84-й день лечения.

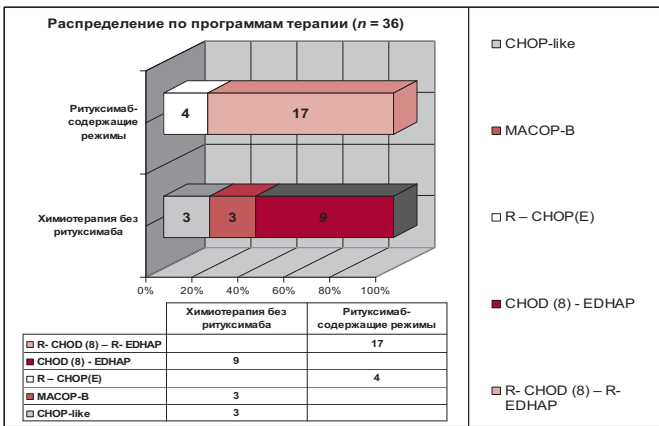


Рис. 1. Распределение больных в зависимости от получаемого лечения

После двух блоков R-CHOD(8) проводили рентгенографическое исследование и КТ органов грудной клетки с контрастированием.

Окончательное рестадирование выполнялось после двух блоков R-EDHAP.

Медиана возраста пациентов, которым проводился режим R-CHOD(8)-R-EDHAP, составила 30 лет, в среднем 31 год. CHOP-подобные режимы использовались в возрастной группе старше 60 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После двух CHOD(8) ± R и двух EDHAP ± R во всей группе имело место более чем двукратное преобладание частичных ремиссий по классификации ВОЗ — 25 (69 %) из 36 случаев. Полные ремиссии — 5 (14 %). Раннее прогрессирование на фоне терапии первой линии констатировано у 2 (6 %) пациентов. Резистентность к терапии первой линии с отсутствием даже минимального сокращения опухолевой массы отмечено у 4 (11 %) пациентов.

Уменьшение массы опухоли более чем на 50 и менее чем на 100 % расценивалось как химиочувствительность опухоли. Поэтому основным лечебным мероприятием для индукции полной ремиссии у пациентов с частичной ремиссией была химиотерапия — 14 (56 %) из 25 случаев. Лучевая терапия как вариант достижения полной ремиссии проведена 6 (24 %) из 25 пациентов (рис. 2). В качестве химиотерапии 10 (47 %) из 25 пациентов продолжили терапию по программе EDHAP.

Из группы больных с установленной первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой к октябрю 2009 г. жив 31 (86 %) пациент. 5 пациентов погибли от прогрессирования заболевания в интервале 6–13 мес. от момента установления диагноза.

Общая 5-летняя выживаемость равна 83 %. Кривая Каплана—Мейера представлена на рис. 3.

В группе с частичной ремиссией 3 пациента отказались от дальнейшего лечения и живы в настоящее время, 1 пациентка погибла от прогрессирования заболевания.

Из 4 пациентов с резистентной ПМБКЛ двое погибли от прогрессирования заболевания. Процесс был резистентен к режимам второй линии, включая IGEV (ифосфамид, гемцитабин, навельбин, дексаметазон) и dexa-BEAM (кармустин, вепезид, цитозар, мелфалан, дексаметазон).

В одном случае после констатации устойчивости опухоли к R-EDHAP-терапии у 20-летней девушки



Рис. 2. Распределение больных с частичной ремиссией в зависимости от дальнейшей терапии PBSCT — трансплантация периферических гемопоэтических стволовых клеток; ОМО — остаточное медиастинальное образование.

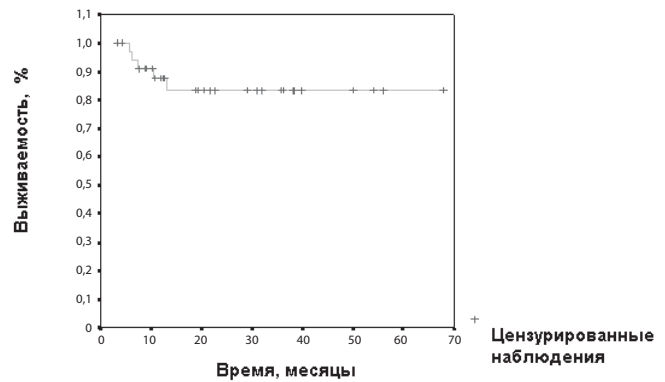


Рис. 3. Общая 5-летняя выживаемость

и определения при позитронной эмиссионной томографии активности процесса в области медиастинальных масс выполнена торакотомия с удалением медиастинального образования с последующей лучевой терапией на область средостения.

Мужчина 33 лет с уменьшением опухоли не более чем на 30 % отказался от дальнейшей терапии и сменил место жительства.

В 1 (50 %) из 2 случаев раннего прогрессирования лимфомы у 26-летней девушки был достигнут частичный регресс опухоли на фоне терапии ритуксимабом + dexa-BEAM с последующим удалением остаточного медиастинального образования и лучевой терапией на область средостения. Срок наблюдения от момента начала терапии — 4,5 года. Вторая пациентка с ранним прогрессированием лимфомы погибла через 6 мес. от момента начала лечения.

Все 5 пациентов с полной ремиссией, достигнутой на фоне терапии первой линии, получили консолидирующую лучевую терапию и живы в настоящее время.

Из токсических осложнений отмечается следующее: курс CHOD(8) характеризуется развитием миелотоксического агранулоцитоза II–III степени в 92 % случаев (22 пациента).

Начало агранулоцитоза находится в интервале с 10-го дня курса по 3-й день перерыва, длительность — в диапазоне 2–8 дней. Фебрильная нейтропения определялась у 18 (75 %) из 24 пациентов и разрешалась на фоне антибиотической терапии первой линии. Тромбоцитопения II степени развилась у 4 пациентов, ее длительность — 2–4 дня, не было геморрагического синдрома и необходимости заместительной трансфузионной терапии.

Режим EDHAP характеризовался развитием миелотоксического агранулоцитоза у 17 (71 %) из 24 пациентов с началом его в интервале с 6-го по 11-й день перерыва и длительностью 4–7 дней. Фебрильная нейтропения определялась у 12 (50 %) из 24 пациентов и контролировалась антибиотической терапией I линии.

Тромбоцитопения II–III степени отмечена в 8 (33 %) из 24 случаев, у 3 из этих пациентов с умеренным геморрагическим синдромом с петехиальными высыпаниями на кожных покровах. 7 (30 %) из 24 пациентов перенесли EDHAP без осложнений.

Не было ни одного случая летальности, ассоциированной с терапией. Также не было ни одного случая побочных реакций на введение ритуксимаба, потребовавших отмены препарата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ДВУХ ТИПИЧНЫХ СЛУЧАЕВ

Наблюдение 1

Пациентка П., 31 год. Поражение передневерхнего средостения (9,7 × 3,7 × 12 см) с наличием участков распада, уча-

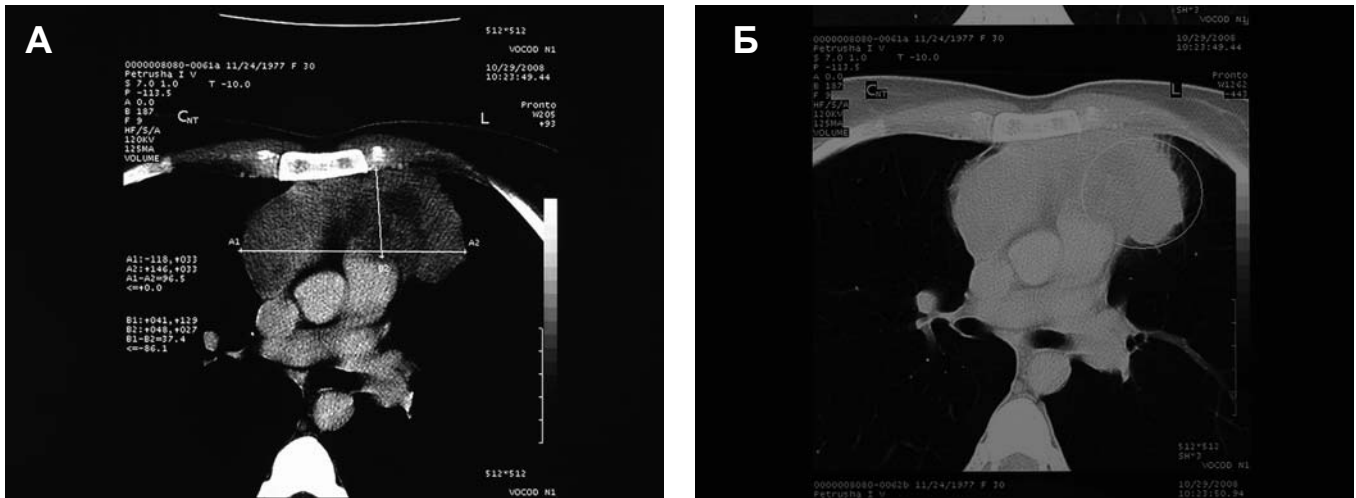


Рис. 4. (А, Б) Компьютерные томограммы с контрастированием на момент верификации диагноза (октябрь 2008 г.)

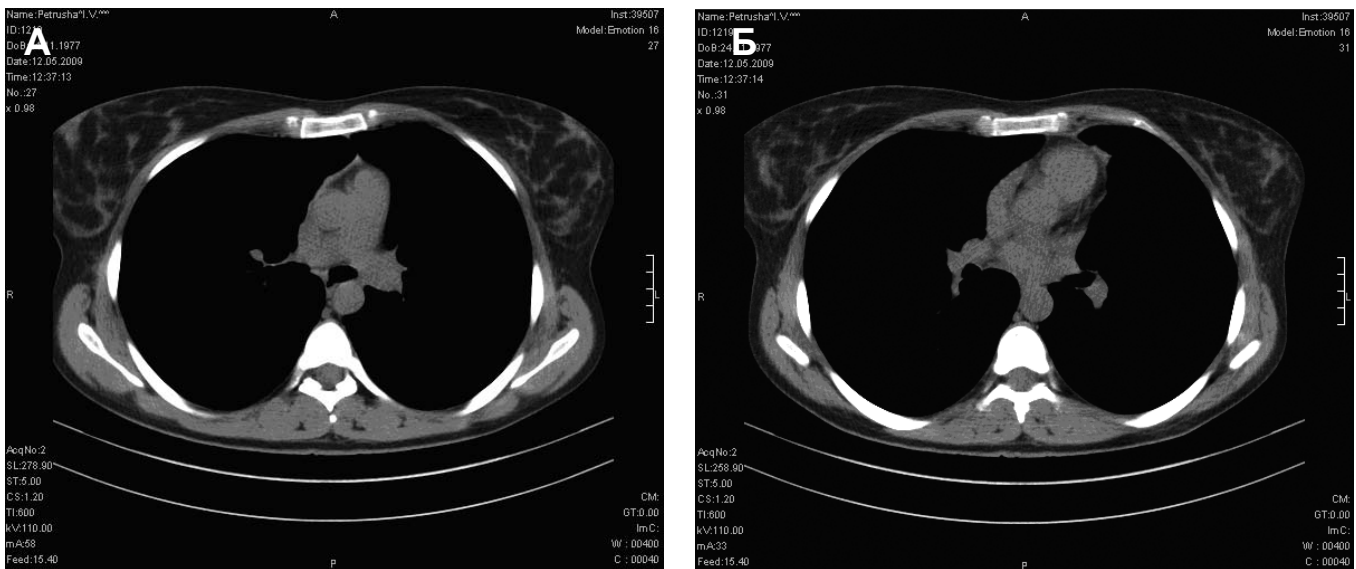


Рис. 5. (А, Б) Компьютерные томограммы с контрастированием (май 2009 г.) после лечения: полная ремиссия

сток инвазии слева S3, вокруг которого также имеется перифокальная инфильтрация легочной ткани (рис. 4).

После двух блоков R-CHOD(8), двух R-EDHAP констатировано достижение частичной ремиссии. Проведено еще два курса R-EDHAP, достигнута полная ремиссия (рис. 5), выполнена лучевая терапия на область средостения.

Наблюдение 2

Пациентка К., 69 лет, при КТ-исследовании в сентябре 2007 г. обнаружен опухолевый конгломерат $9 \times 9 \times 10$ см в среднем средостении, оттесняющий трахею вправо, вызывающий компрессию левого главного бронха и левой легочной артерии (рис. 6, А) После 6 курсов R-СНОЕР (январь 2008 г.) — полная ремиссия (рис. 6, Б).

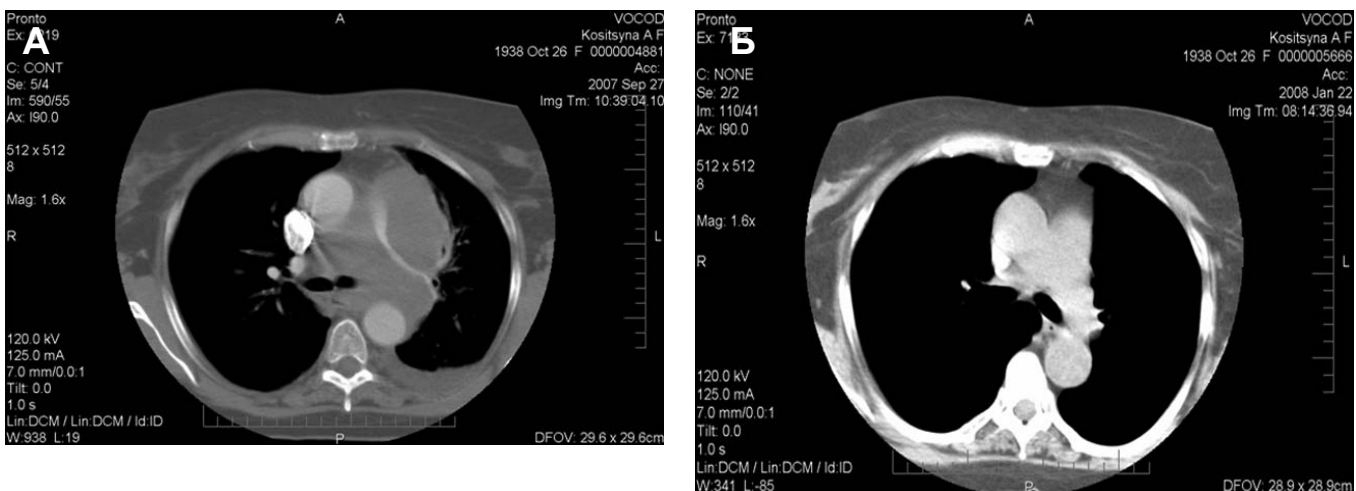


Рис. 6. Компьютерные томограммы:

А — левое легкое в состоянии гиповентиляции; Б — КТ с контрастированием: полная ремиссия

РАСХОЖДЕНИЕ ДИАГНОЗОВ МЕЖДУ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Типичные случаи ПМБКЛ не представляли трудностей для диагностики. На рис. 7 и 8 представлено положительное окрашивание опухолевых клеток антителами к CD20 и CD23, что в комплексе с анализом экспрессии других В-клеточных маркеров определяло верификацию ПМБКЛ.

В 6 (14 %) из 42 случаев окрашивание на В-клеточные маркеры оказалось отрицательным. В двух из них опухолевые клетки экспрессировали линейно-специфические маркеры иммунологически зрелых Т-лимфоцитов — CD3, CD5, CD7, что в сочетании с положительным окрашиванием на антиген CD30 позволило установить Т-анapластическую крупноклеточную лимфому средостения. Один из двух пациентов получил лечение по программе МАСОР-В и находится в состоянии полной ремиссии в течение 7 лет. Во втором случае после констатации химиорезистентности процесса выполнена высокодозная терапия с трансплантацией аутологичных стволовых кроветворных клеток. Пациент погиб от тотальной грибково-пневмоцистной пневмонии.

В 1 из 6 случаев, отрицательных при окрашивании на В-клеточные маркеры, у 22-летнего пациента клетки опухоли средостения оказались положительными при окрашивании на маркеры ранних предшественников Т-клеток — TdT, CD45RO, выявлено слабое окрашивание с антителами к CD3. Клетки оказались отрицательными при окрашива-

нии с антителами к CD20, CD79a, CD10, bcl-6, bcl-2, CD1a, CD5, CD34, CD1a, IgG, IgM и CD30. Верифицирована Т-лимфобластная лимфома.

На момент установления диагноза у данного больного имелась опухоль передневерхнего и среднего средостения, размером около 14 × 12 × 8 см, с инфильтрацией плевры слева и перикарда и развитием специфического плеврита и перикардита.

Пациент получал терапию, соответствующую протоколам лечения острых лимфобластных лейкозов.

У другого пациента, 34 года, по данным КТ определялся опухолевый конгломерат 8 × 8 × 16 см (последний размер вертикальный), внутри которого находились легочные артерии, восходящий отдел и дуга грудной аорты, а также измененные брахиоцефальные сосуды. В плевральной полости справа обнаружено незначительное количество жидкости. Иммуногистохимическое исследование биоптата опухоли выявило окрашивание клеток антителами к CD117, CD68, TdT, CD15 и миелопероксидазе, что позволило верифицировать миелосаркому (рис. 9 и 10). Отмечена высокая пролиферативная активность опухоли: антиген Ki-67 определялся в 90 % клеток. Исходно признаков поражения костного мозга не было.

В дальнейшем возникла лейкемизация процесса в форме острого миелобластного лейкоза, M2-вариант. Химиорезистентность опухоли к терапии по протоколам лечения острого миелобластного лейкоза стала причиной гибели пациента через 3 мес. после диагностики миелосаркомы.

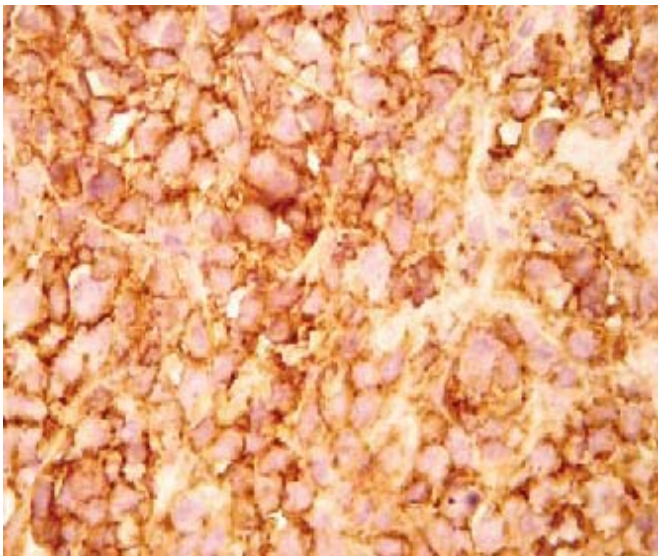


Рис. 7. Экспрессия опухолевыми клетками антигена CD20

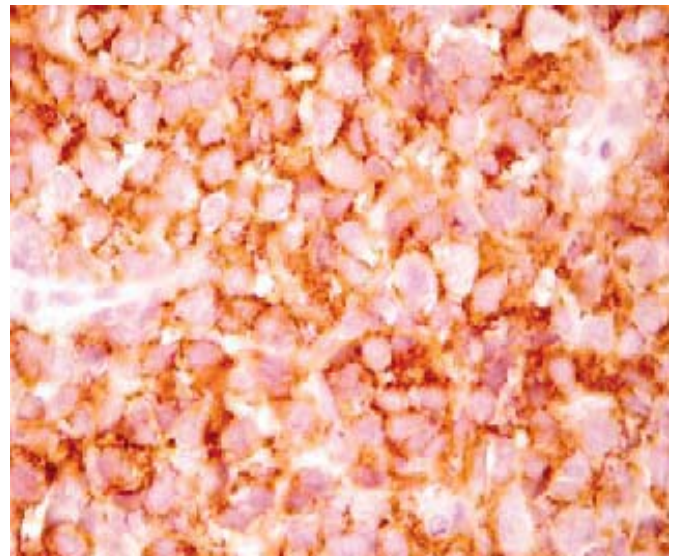


Рис. 8. Экспрессия опухолевыми клетками антигена CD23

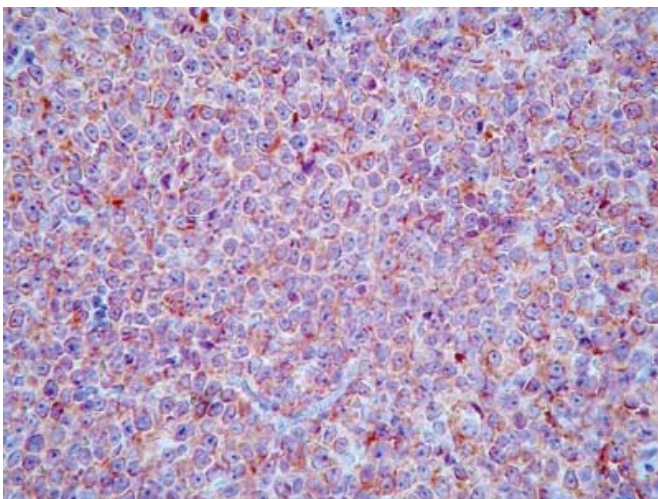


Рис. 9. Экспрессия опухолевыми клетками миелопероксидазы

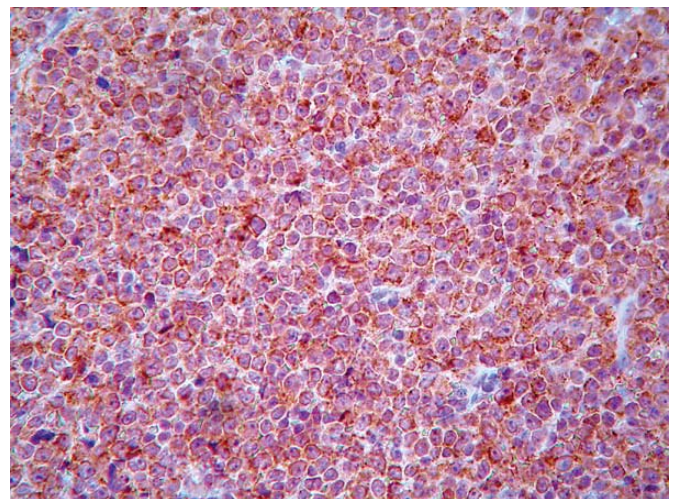


Рис. 10. Экспрессия опухолевыми клетками антигена CD117

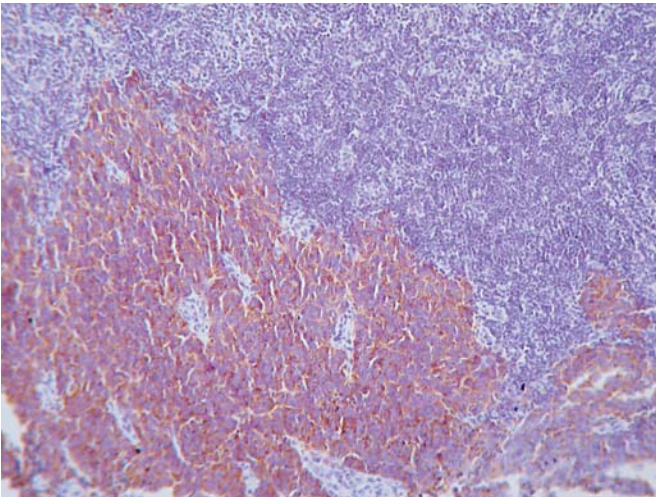


Рис. 11. Экспрессия опухолевыми клетками синаптофизина (иммуногистохимическое окрашивание, En-Vision, $\times 100$). Отсутствие экспрессии синаптофизина в лимфоидных клетках

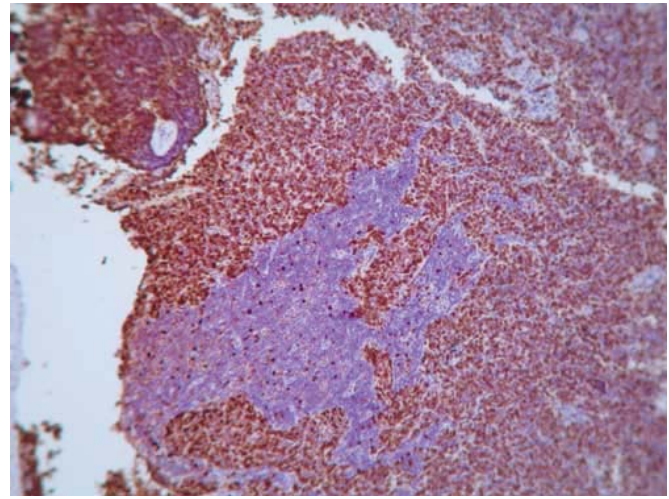


Рис. 12. Экспрессия опухолевыми клетками Ki-67 (En-Vision, $\times 100$)

В следующих 2 из 6 случаев, отрицательных при окрашивании на В-клеточные маркеры, были установлены опухоли негемопозитического происхождения.

Пациенту, 48 лет, была удалена опухоль переднего средостения размером 12 см в диаметре. С гистологическим заключением «крупноклеточная лимфома» больной переведен в гематологическое отделение. При иммуногистохимическом исследовании отмечено отрицательное окрашивание опухолевых клеток с антителами к CD45, CD20, CD3 и цитокератинам. Однако имела место выраженная экспрессия хромогранина и синаптофизина. Это позволило констатировать нейроэндокринный рак.

Пациент, 53 года, после исследования биопсированного участка неоперабельной опухоли средостения переведен в гематологическое отделение с гистологическим заключением «крупноклеточная лимфома». При госпитализации определялась опухоль передневерхнего средостения $9 \times 8 \times 7$ см с проращением в корень правого легкого, увеличением трахеобронхиальных и бронхопульмональных лимфоузлов до 2×2 см. Иммуногистохимическое исследование исключило лимфатическую принадлежность опухоли. Отмечена высокая пролиферативная активность (Ki-67 90 %). Опухолевые клетки интенсивно экспрессировали синаптофизин и Ki-67 (рис. 11 и 12). Установлен нейроэндокринный рак.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение СНОР-подобных программ при лечении ПМБКЛ характеризуется худшими результатами по сравнению с таковыми при диффузной В-крупноклеточной лимфоме других локализаций. Несколько исследований демонстрирует преимущество программы МАСОР-В перед СНОР при лечении ПМБКЛ [9]. Предпринимались попытки улучшения результатов лечения за счет выполнения высокодозной химиотерапии с аутотрансплантацией CD34+ стволовых кроветворных клеток в первой линии [10]. Включение в терапию ритуксимаба реализовано в программах R-ЕРОСН и R-СНОР. В исследовании К. Dunleavy ритуксимаб в комбинации с ЕРОСН получило 26 пациентов. Общая 4-летняя выживаемость составила 100 % [11].

Альтернативой СНОР-подобным режимам для молодых пациентов нами был выбран режим CHOD(8)-EDHAP [8,12]. Один курс CHOD(8), также называемый 2-недельный CHOD, включает двукратное введение доксорубина в дозе 50 мг/м^2 с недельным интервалом, что само по себе значительно интенсифицирует лечение, и 2-недельный курс при-

ема дексаметазона. После двух курсов CHOD $\pm$ R(8) и двух EDHAP $\pm$ R результаты рестадирирования определили частичную ремиссию в 69 % случаев. Высокая частота частичных ремиссий по данным КТ при медиастинальной лимфоме описывается в большинстве работ. По данным разных авторов, по окончании терапии первой линии (МАСОР-В, САР-ВОР и др.) частота частичной ремиссии колеблется от 40 до 90 % [13]. Возможно, широкое применение позитронной эмиссионной томографии позволит несколько пересмотреть критерии полной и частичной ремиссии при ПМБКЛ. Программа EDHAP, традиционно считающаяся режимом второй линии, стала базисной терапией для пациентов после двух CHOD(8). При сокращении опухолевой массы после двух EDHAP, но отсутствии полной ремиссии возможно проведение еще 2 курсов с последующим рестадирированием. Подход с ранней интенсификацией лечения пациентов с медиастинальной лимфомой по программе CHOD(8)-EDHAP используется в Гематологическом научном центре РАМН [8, 12].

Добавление ритуксимаба к химиотерапии согласуется с современной практикой лечения агрессивных В-клеточных лимфом вообще и ПМБКЛ в частности.

Наши результаты по анализу общей 5-летней выживаемости подтверждают высокую частоту длительной полной ремиссии, а возможно, и выздоровления пациентов с ПМБКЛ при лечении с применением более интенсивных лечебных программ, чем стандартная программа СНОР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC-press, 2008: 250–1.
2. Cazals-Hatem D., Lepage E., Brice P. et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 non-mediastinal large B-cell lymphomas, a GELA study. Am. J. Surg Pathol. 1996; 20: 877–88.
3. Barth T.F., Leithauser F., Joosse S. et al. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? Lancet Oncol. 2002; 3: 229–34.
4. Lazzarino M., Orlandi E., Paulli M. et al. Treatment outcome and prognostic factors for primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma: a multicenter study of 106 patients. J. Clin. Oncol. 1997; 15: 1646–53.
5. Paulli M., Strater J., Gianelli U. et al. Mediastinal B-cell lymphoma: a study of its histomorphologic spectrum based on 109 cases. Hum. Pathol. 1999; 30: 178–87.
6. Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007: 751–2.
7. Zinzani P.L., Martelli M., Bertini M. et al. Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. Haematologica 2002; 87: 1258–64.
8. Джумабаева Б.Т., Кременецкая А.М., Готман Л.Н. и др. Эффективность различных программ химиотерапии, показания к хирургическому ле-

чению и лучевой терапии при медиастиальной В-клеточной лимфосаркоме. Тер. арх. 2005; 8: 78–81.

9. *Nguyen L.N., Ha C.S., Hess M. et al.* The outcome of combined-modality treatments for stage I and II primary large B-cell lymphoma of the mediastinum. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000; 47: 1281–5.

10. *Cairali R., Grillo G., Tedeschi A. et al.* Efficacy of an early intensification treatment integrating chemotherapy, autologous stem cell transplantation and radiotherapy for poor risk primary mediastinal large B cell lymphoma with sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 473–7.

11. *Dunleavy K., Pittaluga S., Janik J. et al.* Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL) outcome may be significantly improved by the addition of rituximab to dose-adjusted (DA) — EPOCH and obviates the need for radiation: results from a prospective study of 44 patients [abstract]. *Blood* 2006; 108: Abstract 209.

12. Руководство по гематологии. Под ред. А.И. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2003; 2: 107–8.

13. *Besien K., Kelta M., Bahaguna P. et al.* Primary mediastinal B-cell lymphoma: a review of pathology and management. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 1855–64.



Молекулярный мониторинг у пациентов
с хроническим миелолейкозом: корреляция
с цитогенетическим ответом, прогностическое
значение, оценка ответа на терапиюЕ. В. Аксенова, А. А. Крутов, И. Н. Солдатова, Е. Ю. Чельшева,
А. Г. Туркина, Н. Д. Хорошко, А. В. Мисюрин**Molecular monitoring in CML patients:
correlation with cytogenetic
response, prognostic significance,
assessment of therapy response**E. V. Aksenova, A. A. Krutov, I. N. Soldatova,
E. Yu. Chelysheva, A. G. Turkina, N. D. Khoroshko,
A. V. Misyurin**SUMMARY**

Modern treatment options for the chronic myelogenous leukemia require the regular performance of molecular monitoring of the *BCR/ABL* expression level by means of the Real Time PCR. Achievement of the major molecular response (MMR) is considered to be a prominent hallmark of the successful therapy with the inhibitors of tyrosine kinase activity and a very important prognostic factor. Our aim was to report the data of molecular monitoring of *BCR/ABL* gene expression in CML patients treated with imatinib during the 5 years experience of this work in the real clinical conditions of the Research Center for Hematology (Moscow, Russia). The strict correlation between cytogenetic and molecular data was shown and unevenness of CML patients in complete cytogenetic response (CCR) when they were analyzed in the terms of molecular response. We found it out that 1% IS was a threshold that shouldn't be exceeded to keep cytogenetic response for a long time of observation. The level of *BCR/ABL* expression at the start of imatinib treatment had a great prognostic significance. All changes in cytogenetic and molecular data showed the same trend and their dynamics adequately reflected evolution of disease.

KeywordsCML, molecular monitoring, *BCR-ABL* expression, imatinib.

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Контакты: e.aletris@gmail.com

Принято в печать: 10 июня 2010 г.

РЕФЕРАТ

Молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* — обязательный атрибут контроля лечения хронического миелолейкоза. Достижение большого молекулярного ответа признано важным прогностическим фактором и показателем успешной терапии ингибиторами тирозинкиназ. Целью исследования было дать оценку молекулярного мониторинга, проводимого в течение 5 лет в реальных клинических условиях в ГНЦ РАМН у пациентов, получавших иматиниб. Показана зависимость между уровнем цитогенетического и молекулярного ответов, неоднородность пациентов с полным цитогенетическим ответом (ПЦО) по уровню экспрессии *BCR-ABL*. Значение экспрессии 1% (IS) у пациентов с ПЦО является границей для сохранения цитогенетического ответа. Уровень экспрессии *BCR-ABL* на ранних сроках терапии иматинибом имеет прогностическое значение. Изменения экспрессии и цитогенетический ответ согласуются между собой, динамика экспрессии адекватно отражает динамику заболевания.

Ключевые словахронический миелолейкоз, молекулярный мониторинг, экспрессия *BCR-ABL*, иматиниб.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основными методами мониторинга заболевания при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) являются цитогенетическое определение содержания Ph-позитивных клеток в костном мозге и молекулярное измерение уровня транскрипта гена *BCR-ABL*. Цитогенетическое исследование применяется наиболее широко. Для определения цитогенетического ответа (ЦО) оценивается количество Ph-позитивных клеток по отношению к числу клеток, не несущих Ph-хромосомы, количество исследуемых метафаз при этом должно быть не менее 20. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) обладает более высокой чувствительностью, чем метод стандартной цитогенетики, и с его помощью анализируется большее количество клеток (> 200). Однако недо-

статком этого метода служит наличие базового уровня ложноположительных результатов, что ограничивает его применение. Наиболее чувствительным из всех применяемых методов мониторинга ХМЛ является количественное определение экспрессии гена *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [1–3].

Молекулярный мониторинг приобрел особую значимость в связи с внедрением в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназ, первым из которых был иматиниб. При терапии ингибиторами тирозинкиназ большая часть пациентов в хронической фазе (ХФ) достигает полного цитогенетического ответа (ПЦО), поэтому дальнейшее отслеживание динамики опухолевого клона цитогенетическими методами становится невозможным [4]. Огромную роль в доказательстве важности молекулярного мониторинга при терапии ХМЛ ингиби-

торами тирозинкиназ внесло исследование IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571). В этом исследовании были определены основные параметры молекулярного ответа (МО) — базовая линия и большой молекулярный ответ (БМО). Базовая линия — это значение медианы экспрессии у первичных пациентов, а БМО — это уменьшение экспрессии *BCR-ABL* на 3 порядка от базовой линии. Было доказано, что БМО служит важным прогностическим фактором и показателем успешной терапии иматинибом [5, 6]. Сейчас понятия базовой линии и БМО используются в координатах международной шкалы (International Scale, IS). В этой универсальной шкале результатам молекулярного мониторинга базовой линии соответствует значение 100 %, а значению БМО — показатель 0,1 %, при этом экспрессия определяется как соотношение *BCR-ABL*/контрольный ген $\times 100$ %. Для представления результатов в формате IS для каждой лаборатории, использующей свой метод молекулярного мониторинга *BCR-ABL*, вычисляется фактор конверсии. Это коэффициент, умножение на который переводит значение экспрессии *BCR-ABL*, полученное в лаборатории, в значение IS [7–9].

На основании результатов исследования IRIS группа европейских клиницистов определила современную концепцию лечения ХМЛ, включающую оценку МО [7, 8, 10]. На сегодняшний день молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* является обязательным атрибутом контроля результатов лечения ХМЛ у пациентов, получающих терапию иматинибом и ингибиторами тирозинкиназ второй линии. Достижение БМО включено ELN в параметры оценки ответа на терапию. Достижение БМО к 18 мес. терапии иматинибом в дозе 400 мг у пациентов в ранней ХФ служит критерием оптимального ответа, пациенты, не достигшие БМО к этому сроку, относятся к категории имеющих субоптимальный ответ. Отсутствие БМО к 12 мес. терапии или возрастание уровня транскрипта *BCR-ABL* рассматривается как предостережение. Для терапии дазатинибом и нилотинибом как препаратами второй линии после неудачи терапии иматинибом оптимальным ответом признано достижение БМО к 12 мес. [11, 12].

Было показано, что существует явная корреляция между МО по IS и ЦО. Значение экспрессии *BCR-ABL* в периферической крови 1–10 % соответствует большому цитогенетическому ответу (БЦО) в 98 % случаев, а экспрессия 1 % и менее в 96 % случаев соответствуют ПЦО. Были продемонстрированы также значимые различия в медианах уровня транскрипта *BCR-ABL* у пациентов с разным уровнем ЦО [13].

Считается, что молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* наиболее необходим после достижения ПЦО, в этом случае он является наиболее чувствительным и информативным методом для отслеживания статуса пациента и остаточной болезни [14]. Полагают также, что цитогенетический анализ имеет ограниченную значимость для пациентов с БМО, так, ни у одного из таких пациентов австралийские исследователи не обнаружили цитогенетических аномалий [13]. Некоторые исследователи считают, что мониторинг экспрессии *BCR-ABL* может заменить цитогенетический мониторинг с самого начала терапии, но эта точка зрения остается предметом обсуждения [6, 15]. Однако в случаях, когда цитогенетический анализ оказывается неэффективным из-за отсутствия достаточного количества метафаз или этот анализ недоступен, ПЦР в реальном времени необходима у пациентов на начальных этапах терапии, в т.ч. и для примерной оценки цитогенетического статуса [16].

Существует достаточно много данных о том, что достижение МО имеет прогностическое значение. Уровень

транскрипта на ранних этапах терапии (1–3 мес.) коррелирует с достижением БЦО на 6-м месяце терапии иматинибом [17, 18]. Пациенты, достигшие БМО к 6 или 12 мес. терапии или одновременно с ПЦО, имели значительно более длительную продолжительность ПЦО, чем пациенты, не достигшие МО [19–21]. Достижение БМО к 18 мес. терапии значительно снижает риск прогрессии заболевания, что отражается в значительно меньшей вероятности потери ПЦО [22, 23].

Уровень МО на ранних стадиях терапии позволяет прогнозировать прогрессию заболевания. В рамках исследования IRIS было продемонстрировано, что если к 3 мес. терапии иматинибом снижение уровня транскрипта *BCR-ABL* составило менее 1 lg, то риск резистентности составляет 83 %, а вероятность достижения БМО — 13 % к 30 мес. терапии. При снижении уровня транскрипта на 1–2 lg риск резистентности составляет 5 %, вероятность достижения БМО — 69 %, а при снижении более чем на 2 lg риск резистентности составляет 0 % и вероятность достижения БМО — 100 % к 30 мес. терапии [6].

Считается, что увеличение уровня транскрипта *BCR-ABL* может служить ранним индикатором последующей потери ответа на терапию. Было показано, что двукратное увеличение уровня транскрипта коррелирует с наличием мутаций гена *BCR-ABL* и развитием вторичной резистентности [24, 25]. Однако в различных исследованиях приводятся разные значения увеличения уровня транскрипта, которые ассоциируются с высокой вероятностью детекции мутаций или вероятностью возникновения рецидива: двукратное увеличение, увеличение на 0,5 или 1 lg [26–29]. По данным исследователей из Техасского университета, пациентами с наибольшим риском потери ПЦО являются лица, потерявшие БМО или никогда его не достигавшие, у которых увеличение уровня транскрипта *BCR-ABL* составило более 1 lg [30].

Таким образом, на настоящий момент в официальных рекомендациях по мониторингу МО признано только достижение БМО на 18-м месяце терапии иматинибом как критерий оптимального ответа. Значение МО на более ранних и более поздних сроках заболевания остается предметом обсуждения, несмотря на довольно большое количество публикаций по этому поводу. Не вполне понятна и корреляция МО и ЦО, роль молекулярного мониторинга у пациентов без ПЦО, возможность принятия клинических решений на основании только данных молекулярной диагностики. Возможно, не существует прямой взаимосвязи между степенью ЦО и уровнем экспрессии *BCR-ABL*, поскольку экспрессия в клетках регулируется на различных уровнях и может быть неодинаковой у разных пациентов. Остается актуальным и вопрос, какое увеличение уровня транскрипта следует считать значимым для внепланового проведения уточняющего цитогенетического анализа, мутационного анализа или изменения терапии.

Целью нашего исследования было дать оценку молекулярного мониторинга, проводимого в реальных клинических условиях в ГНЦ РАМН у пациентов, получающих терапию иматинибом в течение 5 лет. Для многих врачей-гематологов информационная ценность результатов молекулярного анализа ограничена, остается не вполне понятным, что означает конкретный уровень экспрессии в данный момент терапии и какие шаги следует предпринимать. Мы хотели прояснить вопросы зависимости ЦО и МО между собой, определить возможную прогностическую роль молекулярной диагностики на разных этапах терапии, понять, какой уровень транскрипта может быть значимым для принятия клинических решений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 213 пациентов в ХФ ХМЛ при терапии иматинибом, которые наблюдались в ГНЦ РАМН. Медиана возраста на момент диагноза составила 40,5 года (диапазон 9–68 лет). Срок наблюдения (время от даты установления диагноза до даты последнего молекулярного анализа) варьировал от 5 до 244 мес., медиана — 84 мес. У 106 пациентов терапия иматинибом была начата в поздней ХФ после неудачи терапии интерфероном- α . Время от установления диагноза до начала терапии иматинибом колебалось от 12 до 143 мес., медиана — 35,5 мес. В ранней ХФ начата терапия иматинибом у 107 пациентов, у 78 из них время от установления диагноза до начала терапии не превышало 6 мес. Доза иматиниба составляла 400–800 мг. Смена иматиниба на терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) второй линии наблюдалась у 50 пациентов.

Молекулярная диагностика проводилась в 2005–2009 гг. Сроки проведения молекулярной диагностики определялись лечащим врачом пациента. Частота молекулярного мониторинга составляла 1–4 раза в год, в среднем 1,6 раза в год за 1–5 лет лечения. У 39 пациентов молекулярный анализ при терапии иматинибом был проведен однократно, у 26 из них этот единственный анализ был сделан при смене терапии. Молекулярная диагностика начинала проводиться у пациентов в разные сроки терапии иматинибом. После 1.01.2005 г. начали лечение иматинибом 65 пациентов (30,5 % от общего числа), т.е. только у этих пациентов молекулярный мониторинг мог осуществляться от начала терапии.

В качестве материала для анализа использовалась в основном периферическая кровь в объеме 10 мл. Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени проводились по стандартной методике с использованием тест-систем производства ООО «Генотехнология» (Россия). Тест-системы были разработаны на основе рекомендаций программы EAS по количественному мониторингу экспрессии химерных онкогенов [31]. ПЦР в реальном времени проводилась на приборе IQ-Cycler производства компании Bio-Rad с использованием технологии TaqMan. В реакции определялась экспрессия гена *BCR-ABL* типа p210 для обоих вариантов транскрипта (b2a2 и b3a2), в качестве контрольного гена использовались гены β_2 -микроглобулина (до апреля 2007 г.) и *ABL*. Для каждого образца крови ПЦР в реальном времени проводилась в трех повторах для гена *BCR-ABL* и для контрольного гена.

Чувствительность метода по разведениям клеточных линий составила 0,01 %, по разведениям РНК первичного пациента ХМЛ РНК здорового донора 10^{-4} , воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам составила 10 копий/мкл ($CV\% = 1,86$). Метод стандартизован по IS, все результаты представлены в формате IS. Лаборатория является референсной по России [32].

Для статистического анализа использовали χ^2 критерий Пирсона для связанных таблиц, коэффициент ранговой корреляции Спирмена, критерии Манна–Уитни и Краскала–Уоллиса. Использовалась также описательная статистика: медиана, диапазон.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение значений цитогенетического и молекулярного ответов

Сравнение данных МО и ЦО проводилось на 274 образцах крови пациентов, у которых оба анализа были выполнены одновременно. Образцы были разделены на группы,

соответствующие уровню ЦО. Группа с отсутствием ЦО состояла из 29 образцов, с минимальным ЦО — из 16, малым ЦО — из 18, частичным ЦО — из 43, ПЦО — из 168 образцов.

Диапазон значений экспрессии *BCR-ABL* в каждой группе был очень широким, но в целом он уменьшался по мере снижения процентного содержания Ph-позитивных клеток. Медиана экспрессии также уменьшалась, от 88,53 в группе с отсутствием ответа, до 0,07 в группе с ПЦО (табл. 1). Соотношение доли образцов с разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* заметно отличалось в группах с разным ЦО. С уменьшением процентного содержания Ph-позитивных клеток увеличивалась доля образцов с более слабым уровнем экспрессии. В группе с отсутствием ЦО 10,34 % (3 из 29) образцов имели экспрессию 1–10 %, для остальных 89,66 % (26 из 29) экспрессия была выше 10 %. В группе с минимальным ЦО экспрессия 1–10 % наблюдалась в 18,75 % (3 из 16) случаев, экспрессия выше 10 % — в 81,25 % (13 из 16). В группе с малым ЦО 5,56 % образцов (1 из 18) имели экспрессию *BCR-ABL* 0,1–1 % и столько же — 1 образец (5,56 %) — экспрессию 0–0,1 %, в 11,1 % (2 из 18) образцов наблюдалась экспрессия 1–10 %, в остальных 77,78 % (14 из 18) — выше 10 %. В группе с частичным ЦО 9,3 % (4 из 43) образцов имели экспрессию, равную нулю, 2,33 % (1 из 43) — экспрессию 0–0,1 %, 11,63 % (5 из 43) — экспрессию 0,1–1 %, 41,86 % (18 из 43) — экспрессию 1–10 %, 34,88 % (15 из 43) — экспрессию выше 10 %. В группе с ПЦО 38,1 % (64 из 168) образцов имели экспрессию, равную нулю, 16,1 % (27 образцов) — экспрессию 0–0,1 %, 24,4 % (41) — экспрессию 0,1–1 %, 12,5 % (21) — экспрессию 1–10 %, 8,9 % (15 образцов) — экспрессию выше 10 % (рис. 1).

Таким образом, образцы с высокими значениями экспрессии *BCR-ABL* ($> 10\%$) имеются во всех группах, в т.ч. и в группе пациентов с ПЦО, но их доля в этой группе не превышает 9 %. Отдельные пациенты с низким уровнем экспрессии (БМО, $IS < 0,1\%$) имеются уже в группах с малым и частичным ЦО, в группе с частичным ЦО есть также пациенты с отсутствием экспрессии *BCR-ABL*. Доля образцов пациентов с БМО и полным МО значительно возрастает в группе с ПЦО и составляет более 50 %. Группа пациентов с ПЦО неоднородна по уровню экспрессии *BCR-ABL*.

Сравнительный анализ данных ЦО и МО подтвердил наличие положительной корреляции между процентным содержанием Ph-позитивных клеток и уровнем экспрессии *BCR-ABL*. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров составил 0,713 ($p < 0,0001$). Мы проанализировали взаимосвязь между ЦО в трех группах (отсутствие БЦО — Ph+ более 35 % метафаз, частичный ЦО и ПЦО) и распределением по уровню экспрессии *BCR-ABL* в каждой из них. При попарном сравнении групп по критерию Манна–Уитни было показано, что существуют значимые различия по медиане и среднему между этими группами ($p < 0,0001$), т.е. эти группы не относятся к одной общей со-

Таблица 1. Диапазон и медиана экспрессии *BCR-ABL* в группах пациентов с разным цитогенетическим ответом

ЦО	Ph+ метафазы	Число образцов Всего 274	Экспрессия <i>BCR-ABL</i> , IS	
			Диапазон (квартили 25–75 %)	Медиана
Отсутствие	96–100 %	29	55,7–134,9	88,53
Минимальный	66–95 %	16	20,4–64,1	36,74
Малый	36–65 %	18	14,5–120,1	58,24
Частичный	1–35 %	43	1,3–21,2	6,10
Полный	0 %	168	0–0,8	0,07

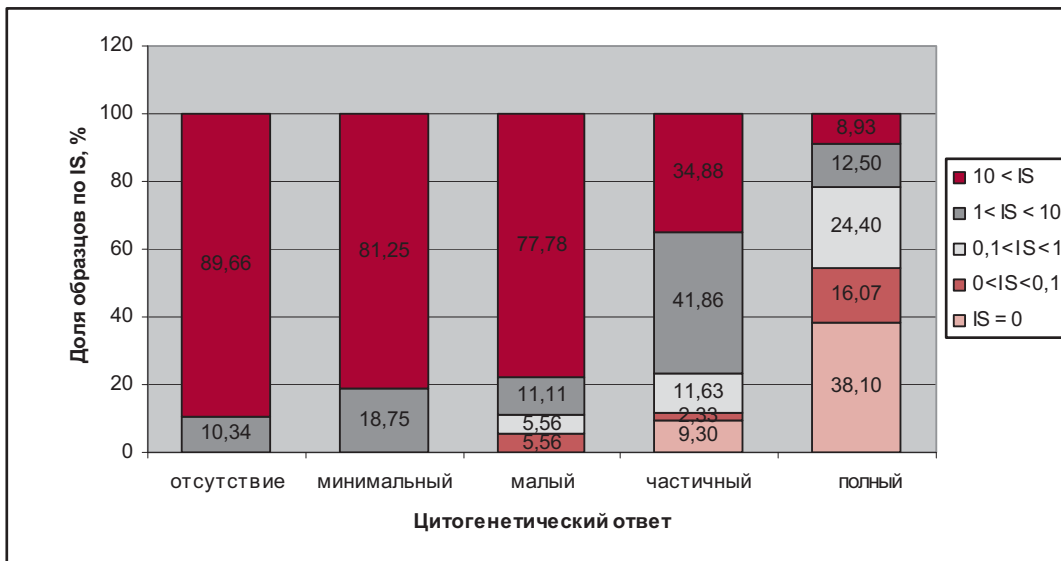


Рис. 1. Распределение по уровню молекулярного ответа в группах с разным цитогенетическим ответом

вокупности. По критерию Краскала—Уоллиса эти три группы также отличались друг от друга с высоким уровнем значимости ($p < 0,0001$).

На основании этих же данных мы определили, что уровню экспрессии $BCR-ABL \leq 1\%$ в 91,4 % случаев соответствует ПЦО, а уровню экспрессии 1–10 % — БЦО в 82,4 % случаев.

Значение разного уровня экспрессии $BCR-ABL$ у пациентов с ПЦО

Поскольку у пациентов с ПЦО наблюдается разный уровень экспрессии $BCR-ABL$, мы попытались оценить, как влияет этот уровень в разных временных точках на дальнейшее течение заболевания. Пациенты после 12, 18 и 24 мес. терапии иматинибом, достигшие к этому моменту ПЦО, были разделены на группы по уровню МО: 1) экспрессия не более 0,1 % (БМО); 2) экспрессия 0,1–1 %; 3) экспрессия выше 1 %. В каждой группе оценивалась потеря ПЦО у пациентов при дальнейшей терапии.

На 12-м месяце терапии иматинибом был обследован 21 пациент с ПЦО. Из 11 пациентов с экспрессией $BCR-ABL \leq 0,1\%$ ПЦО в дальнейшем потеряли 3: у одного из этих пациентов потеря зафиксирована в течение года после исследования, у другого — в течение 2 лет; у обоих этих пациентов зафиксированы перерывы в терапии. У третьего пациента потеря ПЦО произошла через 26 мес. после исследования, сведений о перерывах в терапии у этого пациента нет. Из 6 пациентов с экспрессией 0,1–1 % потеря ПЦО наблюдалась у 3: у 1 — через 13 мес. после исследования, у 2 — более чем через 3 года. Из 4 пациентов с экспрессией выше 1 % двое потеряли ПЦО: один — через 5 мес., другой — через 4 года. У 1 пациента из этой группы, у которого не проводилось дальнейшее цитогенетическое исследование, наблюдалась потеря гематологического ответа. Между тремя группами значимых различий обнаружено не было, но при объединении двух групп с экспрессией более 0,1 % в одну наблюдались достоверные различия между ней и группой с экспрессией до 0,1 % ($p < 0,05$). Таким образом, к 12 мес. терапии пациенты, достигшие БМО, значимо отличаются от его не достигших по параметру дальнейшей потери ПЦО.

После 18 мес. терапии иматинибом было обследовано 29 пациентов с ПЦО. Из 18 пациентов с экспрессией $BCR-ABL \leq 0,1\%$ ПЦО в дальнейшем потеряли 5 пациентов: 1 — вскоре после исследования, 2 — более чем через год, 2 — более чем через 3 года после исследования. Из 9 пациентов с экспрессией 0,1–1 % потеря ПЦО наблюдалась у 3, у всех в течение года после исследования. Экспрессия

выше 1 % отмечалась у 2 пациентов, оба они в дальнейшем потеряли ПЦО. Не было найдено значимых различий между группами ни изначально, ни при каких-либо вариантах их объединения.

После 24 мес. терапии иматинибом был обследован 31 пациент с ПЦО. Из 22 пациентов с экспрессией $BCR-ABL \leq 0,1\%$ ПЦО в дальнейшем потеряли 4 пациента, у всех потеря наблюдалась более чем через 2 года после исследования. Из 3 пациентов с экспрессией 0,1–1 % потеря ПЦО отмечена у 2: у одного — через 4 мес. после исследования, у второго — более чем через 4 года. Из 6 пациентов с экспрессией выше 1 % ПЦО потеряли 2, оба в течение года после исследования; у одного пациента наблюдалась прогрессия заболевания, цитогенетическое исследование ему не проводилось. Значимых различий между группами обнаружено не было ни изначально, ни при каких-либо вариантах их объединения.

Для того чтобы полнее оценить значимость уровня МО у пациентов с ПЦО на более поздних сроках терапии иматинибом, мы обследовали пациентов с ПЦО при сроке терапии 24–60 мес. От 56 пациентов 79 образцов были разделены на три группы по уровню экспрессии $BCR-ABL$. В каждой группе оценивалось достижение БМО при терапии иматинибом, длительное сохранение БМО, потеря БМО и потеря ПЦО. Достижение БМО учитывалось при любом сроке терапии иматинибом, под длительным сохранением БМО подразумевалось наличие БМО как минимум в двух последовательных анализах. Доля потерявших БМО определялась по отношению к числу пациентов, достигших БМО в этой группе, пациенты, у которых не было сведений о потере БМО, не учитывались при подсчете.

В группе с экспрессией не более 0,1 %, которая составила 32 пациента, все достигли БМО, 29 (93,5 %) длительно сохраняли БМО, потеря БМО наблюдалась у 9 человек (32,1 % от числа достигших БМО, у 4 нет данных о потере БМО). Потеря ПЦО в этой группе наблюдалась у 6 (18,8 %) пациентов, при этом только 1 потерял ПЦО в течение года после исследуемой временной точки, в течение 2 лет ПЦО потеряли 2 пациента. В группе с экспрессией $BCR-ABL$ 0,1–1 % из 14 пациентов 13 (92,9 %) достигли БМО, 11 (78,6 %) длительно сохраняли БМО, потеря БМО наблюдалась у 5 пациентов (41,7 % от числа достигших БМО, у 2 нет данных о потере БМО). Потеря ПЦО в этой группе наблюдалась у 3 (21,4 %) пациентов, в течение года никто не потерял ПЦО, в течение 2 лет ПЦО потеряли 2 пациента. В группе с экспрессией выше 1 % из 10 пациентов БМО достигли 4 (40 %), длительно сохраняли БМО 3 (30 %), потеря БМО отмечена у 1 пациента (33,3 % от числа достигших БМО, у 1

нет данных о потере БМО). В этой группе ПЦО потеряли 8 (80 %) пациентов, 7 из них — в течение года (рис. 2).

Между первыми двумя группами различия в пропорциях достижения, длительного сохранения, потери БМО и ПЦО не являются статистически значимыми. Группа с уровнем экспрессии *BCR-ABL* > 1 % значимо отличается от двух других ($p < 0,0005$) по доле пациентов, достигших и длительно сохранявших БМО, и, что наиболее важно, по доле пациентов с потерей ПЦО. Если рассматривать потерю ПЦО в этих группах в течение года после исследования, разница будет еще более заметной — 2,2 % (1 из 46) для объединенных первых двух групп и 70 % для третьей группы.

Время достижения ПЦО и молекулярный ответ

104 пациента были разделены на шесть групп по времени первого достижения ПЦО. Группа с временем достижения ПЦО 3–4,8 мес. (медиана 3,45 мес.) составила 8 человек; 5,3–8,9 мес. (медиана 6,1 мес.) — 31 человек; 9,5–14,9 мес. (медиана 11,9 мес.) — 29 человек; 15,4–20,5 мес. (медиана 18,4 мес.) — 12 человек; 22,1–25,4 мес. (медиана 24,1 мес.) — 9 человек; 26,9–61,3 мес. (медиана 33,6 мес.) — 15 человек. В каждой группе оценивалось число пациентов, достигших БМО, длительно сохранявших БМО, число пациентов с потерей БМО и ПЦО. Подходы к определению этих параметров были те же, что и в предыдущем разделе.

В первой группе все пациенты достигли БМО, сохраняли БМО 6 (100 %) из 6 пациентов, никто не терял БМО, потеря ПЦО наблюдалась у 2 (25 %) пациентов. Во вто-

рой группе БМО достигли 25 (80,7 %) пациентов, длительно сохраняли БМО 22 (71 %), потеря БМО наблюдалась у 8 (36,4 %) из 22 пациентов, потеря ПЦО — у 10 (32,3 %). В третьей группе БМО достиг 21 (72,41 %) пациент, длительно сохраняли БМО 16 (61,54 %) из 26 пациентов, потеря БМО зафиксирована у 7 (46,7 %) из 15 пациентов, потеря ПЦО — у 15 (51,72 %) из 29. В четвертой группе БМО достигли 11 (91,67 %) из 12 пациентов, длительно сохраняли БМО 8 (72,7 %) из 11, потеря БМО — у 4 (40 %) из 10, потеря ПЦО — у 4 (33,3 %) из 12 пациентов. В пятой группе БМО достигли 7 (77,8 %) из 9 пациентов, длительно сохраняли БМО 6 (75 %) из 8, потеря БМО не зафиксирована ни у одного пациента, потеря ПЦО — у 6 (66,7 %) из 9. В шестой группе БМО достигли 8 (53,3 %) из 15 пациентов, длительно сохраняли БМО 7 (46,7 %) из 15, потеря БМО — у 3 (42,9 %) из 7, потеря ПЦО — у 6 (42,9 %) из 14 (рис. 3).

Доля пациентов, достигших БМО, меняется волнообразно по мере увеличения срока достижения ПЦО, пики наблюдаются на сроках с медианой 3,5 и 18,4 мес. Доля пациентов, длительно сохраняющих БМО, максимальна при сроке с медианой 3,5 мес., по мере увеличения срока достижения ПЦО, эта доля уменьшается. Однако значимые различия в пропорции достижения БМО наблюдаются только между группами с медианой срока 3,5 и 33,6 мес. ($p < 0,05$), а также между группами с медианой 18,4 и 33,6 мес. ($p < 0,05$). Доля пациентов, длительно сохраняющих БМО, различается только между группами с медианой 3,5 и 33,6 мес. ($p < 0,05$). Между группами не было обнаружено значимых различий по потере ПЦО. В двух группах (медиана 3,5 и 24,1 мес.) были

Рис. 2. Параметры изменения молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов с ПЦО и разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* в сроки 24–60 мес. терапии иматинибом

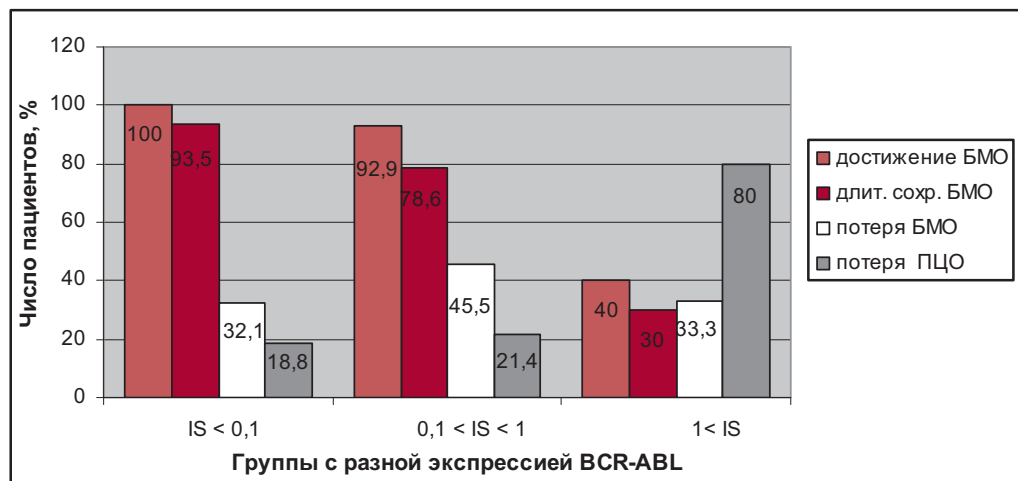


Рис. 3. Параметры молекулярного ответа у пациентов с разными сроками достижения ПЦО

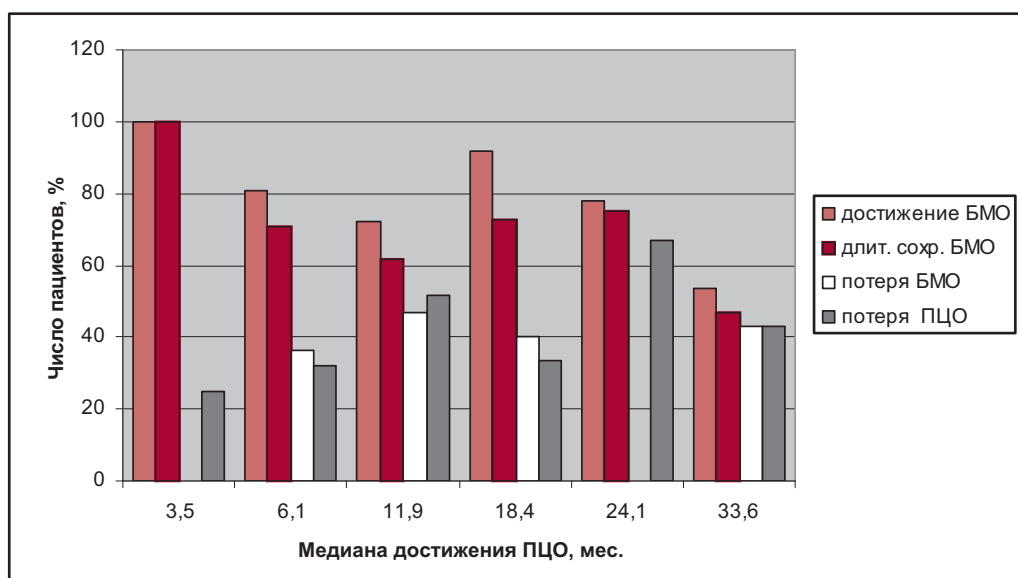


Таблица 2. Ответ на терапию, достижение БМО и смена терапии у пациентов с разным уровнем экспрессии BCR-ABL после 6 мес. терапии иматинибом

n	Экспрессия BCR-ABL, IS	Ответ на терапию иматинибом			БМО, %	Переход на терапию ИТК 2-й линии, %
		Оптимальный, %	Субоптимальный, %	Резистентные, %		
6	≤ 0,04	100	0	0	100	0
9	0,12–4,49	11,1	66,7	22,2	11,1	22,2
11	≥ 10	0	9,1	90,9	0	72,7

отмечены пациенты с потерей ПЦО, но не было зафиксировано пациентов с потерей БМО. Это несоответствие вызвано нерегулярным обследованием пациентов и несовпадением сроков молекулярного и цитогенетического анализа: например, молекулярное исследование начали проводить уже после потери и последующего восстановления ПЦО или в молекулярном исследовании был длительный перерыв. Если не учитывать эти две группы, среди оставшихся значимых различий по потере БМО отмечено не было.

Прогностическое значение уровня экспрессии BCR-ABL на ранних этапах терапии иматинибом

Прогностическое значение уровня экспрессии BCR-ABL оценивалось в 6 и 12 мес. терапии иматинибом. У пациентов с разным уровнем экспрессии определялись следующие параметры: 1) ответ на терапию по критериям ELN; 2) достижение БМО при терапии иматинибом; 3) переход на терапию ИТК второй линии.

На сроке 6 мес. терапии было обследовано 26 пациентов, 12 мес. — 50 пациентов. При представлении экспрессии BCR-ABL на графиках в логарифмической шкале значения на каждом сроке распадались на три отдельных кластера с промежутками между ними. Исходя из этого, пациенты на каждом сроке терапии были разбиты на три группы по уровню экспрессии: 1) от 0 до 0,04 %; 2) от 0,12 до 4,49 %; 3) от 9,8 до 170 %.

На сроке 6 мес. терапии в первую группу вошло 6 пациентов, во вторую — 9 пациентов, в третью — 11 пациентов (табл. 2). В группе с экспрессией до 0,04 % все пациенты продемонстрировали в дальнейшем оптимальный ответ на терапию, все достигли БМО и никто из них не был переведен на терапию второй линии. В группе с экспрессией 0,12–4,49 % оптимальный ответ получен у 1 (11,1 %) пациента, субоптимальный — у 6 (66,7 %), резистентными оказались 2 (22,2 %) пациента. БМО на иматинибе был достигнут у 1 (11,1 %) пациента, на терапию ИТК второй линии переведено 2 (22,2 %) пациента. В группе с экспрессией более 9,8 % оптимальный ответ не был получен ни у одного пациента, у одного (9,1 %) отмечен субоптимальный ответ, остальные 10 (90,9 %) пациентов оказались резистентными к терапии иматинибом. БМО не достиг ни один пациент, 8 (72,7 %) пациентов были переведены на терапию второй линии. Группы различаются между собой по всем трем параметрам с высоким уровнем значимости: по ответу ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 91,3 %), по доле пациентов, достигших БМО ($p < 0,0003$, коэффициент сопряженности 95,1 %), по доле пациентов со сменой терапии ($p < 0,05$, коэффициент сопряженности 75,1 %).

На сроке 12 мес. терапии в группу с экспрессией до 0,04 % вошло 18 пациентов, в группу с экспрессией 0,12–4,49 % — 13 пациентов, в группу с экспрессией выше 9,8 % — 19 пациентов. В первой группе оптимальный ответ на терапию иматинибом получен у 12 (66,7 %) пациентов, субоптимальный — у 5 (27,8 %), в одном случае наблюдалась потеря ответа (вторичная резистентность — 5,6 %). Все пациенты достигли БМО, на терапию второй линии был переведен 1 (5,6 %) пациент. Во второй группе оптимальный ответ получен у 9 (69,2 %) пациентов, субоптимальный — у 3 (23,1 %), у 1 (7,7 %) пациента наблюдалась вторичная резистентность. БМО был достигнут у 9 человек, из тех же, кто получил оптимальный ответ на терапию, 1 пациент переведен на терапию второй линии (7,7 %). В третьей группе оптимальный ответ получен у 1 (5,3 %) пациента, субоптимальный — у 5 (26,3 %), 13 (68,4 %) пациентов оказались резистентными. БМО был достигнут у 2 (10,5 %) пациентов, смена терапии отмечалась у 10 (52,6 %) пациентов. По ответу на терапию и доле пациентов со сменой терапии первая и вторая группа не различались. Наблюдаются значимые различия между двумя первыми и третьей группой по ответу ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 82,2 %) и по доле пациентов со сменой терапии ($p < 0,0005$, коэффициент сопряженности 65,72 %). Три группы демонстрируют значимые различия по доле пациентов, достигших БМО ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 93,5) (табл. 3).

Динамика молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов с разным ответом на терапию

Динамика МО у пациентов ХМЛ хорошо отражает течение заболевания и в большинстве случаев коррелирует с динамикой цитогенетического ответа. К сожалению, молекулярные исследования в большинстве случаев проводятся нерегулярно и не всегда совпадают с цитогенетическими исследованиями по дате выполнения, что затрудняет сравнение между двумя исследованиями.

На рис. 4 приведены параметры МО и ЦО у нескольких пациентов ХМЛ. Пациент № 1 первоначально хорошо ответил на терапию иматинибом и достиг ПЦО. На 24-м месяце терапии пациент потерял ПЦО, в это же время был проведен первый молекулярный анализ, экспрессия BCR-ABL составила 1,3 %. После 30 мес. терапии наблюдалось резкое увеличение уровня экспрессии до 28,6 % при том же уровне ЦО — 5 %, а к 36 мес. терапии ЦО составил уже 30 %, уровень экспрессии несколько снизился, но был достаточно высок — 14,2 %. Вскоре пациенту была увеличена доза иматиниба, и к 42 мес. терапии он достиг ПЦО и уровня экспрессии 1,1 %. К 48 мес. уровень экспрессии снизился до

Таблица 3. Ответ на терапию, достижение БМО и смена терапии у пациентов с разным уровнем экспрессии BCR-ABL на 12-м месяце терапии иматинибом

n	Экспрессия BCR-ABL, IS	Ответ на терапию иматинибом			БМО, %	Переход на терапию ИТК 2-й линии, %
		Оптимальный, %	Субоптимальный, %	Резистентные, %		
18	≤ 0,04	66,7	27,8	5,6	100	5,6
13	0,12–4,49	69,2	23,1	7,7	69,2	7,7
19	≥ 10	5,3	26,3	68,4	10,5	52,6

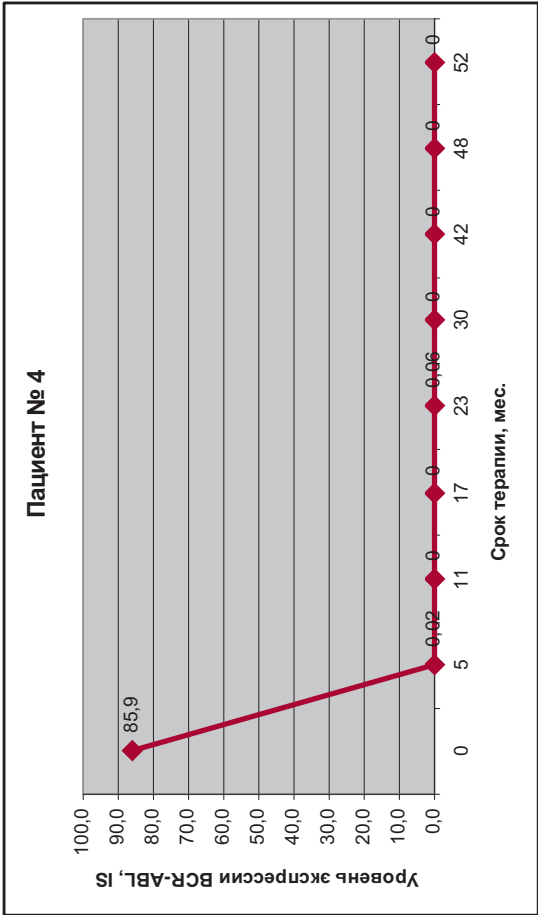
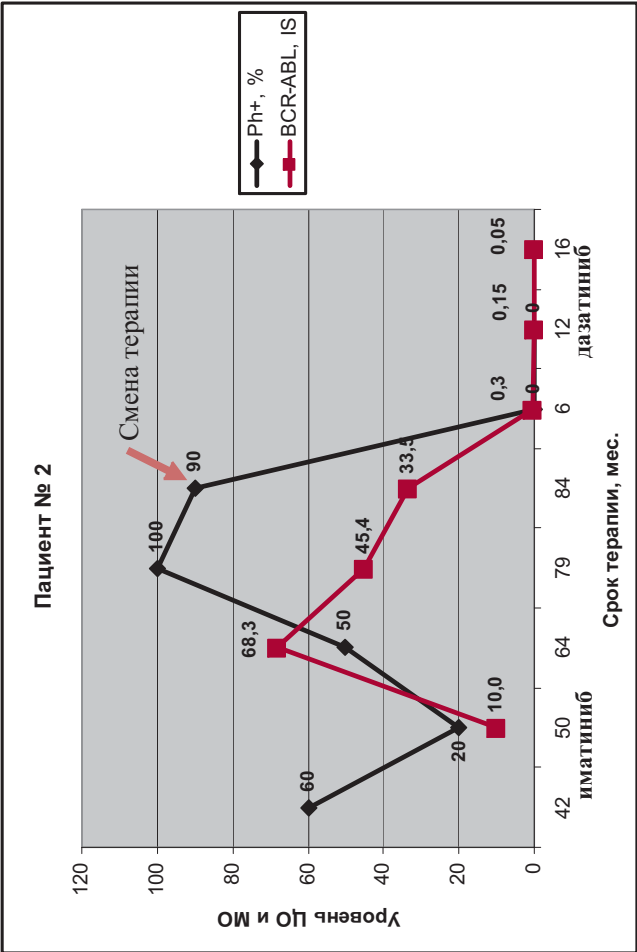
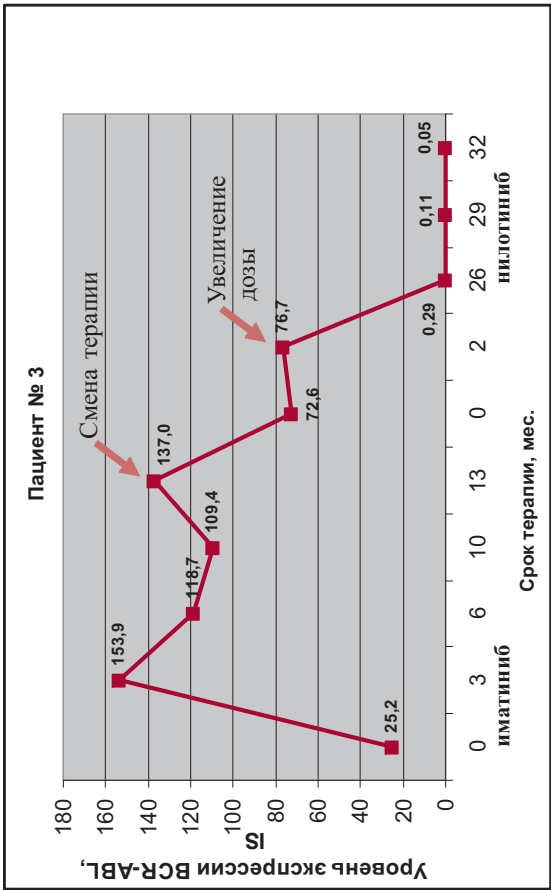
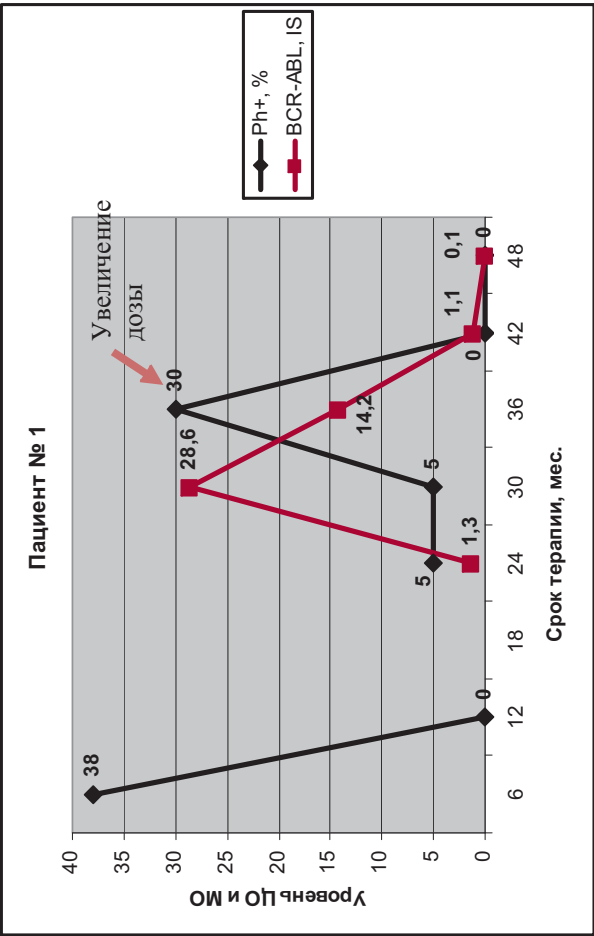


Рис. 4. Показатели молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов ХМЛ

уровня БМО и составил 0,1 %. У пациента № 2 молекулярные исследования стали проводиться с 50-го месяца терапии иматинибом, на этот срок ЦО составил 20 %, а экспрессия *BCR-ABL* — 10 %. К 64 мес. терапии наблюдалось значительное увеличение ЦО и МО, этот высокий уровень сохранялся до 84 мес. После смены терапии на дазатиниб на сроке 84 мес. приема иматиниба уровень ЦО и МО резко снизился, и к 6 мес. терапии второй линии пациент достиг ПЦО и экспрессии *BCR-ABL* 0,3 %. Далее при сохраняющемся ПЦО экспрессия продолжала уменьшаться. На примере этих двух пациентов со вторичной резистентностью к терапии иматинибом мы видим корреляцию МО с ЦО, увеличение уровня экспрессии предшествует или совпадает с увеличением уровня ЦО.

Пациент № 3 является примером больного с первичной резистентностью к терапии иматинибом. Экспрессия *BCR-ABL* от начала терапии до 13 мес. была очень высокой, при этом она увеличилась от начального уровня и превышала 100 %. После смены терапии на нилотиниб уровень экспрессии несколько снизился, а после увеличения дозы препарата снижение оказалось более значительным, в конечном итоге — до уровня БМО. В данном случае уровень МО вполне адекватно отражает динамику заболевания и ответ пациента на терапию. Пациент № 4 — это пациент с оптимальным ответом на терапию иматинибом. Уровень экспрессии *BCR-ABL* уже к 5 мес. терапии снизился до уровня БМО и в дальнейшем сохранялся.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном анализе данных ЦО и МО мы показали, что существует корреляция между уровнями этих ответов. Чем лучше ЦО, тем больше доля образцов с низкой экспрессией гена *BCR-ABL*. Каждая группа с определенным уровнем ЦО неоднородна по структуре МО: в ней есть образцы с более высокой и более низкой экспрессией. В группах с отсутствием ЦО, с минимальным и малым ЦО преобладают образцы с высокой экспрессией *BCR-ABL* — более 10 %, которые составляют в этих группах 88,7, 81,2 и 77,8 % соответственно. В группе с частичным ЦО доля образцов с высокой экспрессией уже не является преобладающей и составляет 34,9 %, а среди пациентов с ПЦО эта доля снижается до 8,9 %. Образцы с экспрессией *BCR-ABL* < 1 % и с БМО появляются уже в группе пациентов с малым ЦО, в группе с частичным ЦО доля таких образцов увеличивается. В группе с частичным ЦО появляются и образцы с полным МО, т.е. с недетектируемой экспрессией *BCR-ABL*. Таких пациентов было 4 из 43 в этой группе, у всех содержание Ph-позитивных клеток составляло 4–5 %. Возможное объяснение этого феномена заключается либо в наличии другого типа транскрипта *BCR-ABL* (p190, p230), либо в ингибировании экспрессии в клетках. Группа пациентов с ПЦО наиболее неоднородна по составу образцов с разным уровнем МО. Более 50 % в этой группе составляют образцы с БМО и еще около 25 % — образцы с экспрессией 0,1–1 %. Образцы с экспрессией выше 1 % составляют немногим более 20 % образцов в этой группе.

Мы показали, что уровню экспрессии *BCR-ABL* ≤ 1 % в 91,4 % случаев соответствует ПЦО, а уровню экспрессии 1–10 % — БЦО в 82,4 % случаев. Это вполне согласуется с данными, полученными D. M. Ross и соавт. в рамках исследования по сравнению параметров МО и ЦО [13].

Неоднородность группы пациентов с ПЦО по уровню МО и наличие в ней образцов с высокой экспрессией может вызывать закономерные вопросы о ее причинах и о том, есть ли отличия в дальнейшем течении заболевания у пациентов с разной экспрессией. На группе пациентов с ПЦО и раз-

ным уровнем экспрессии за 24–60 мес. терапии иматинибом мы продемонстрировали, что такие отличия действительно есть. В группе пациентов с уровнем экспрессии *BCR-ABL* > 1 % доля пациентов с потерей ПЦО была значимо выше, чем в группах с экспрессией менее 1 %, и составила 80 %, тогда как в группах с БМО и с экспрессией 0,1–1 % потеря ПЦО была 18,8 и 21,4 % соответственно. Примечательно, что потеря ПЦО в группе с экспрессией более 1 % в большинстве случаев происходила в течение года после исследования (в 7 из 8 случаев потери, 70 % от числа пациентов в группе). В группах с низкой экспрессией *BCR-ABL* в течение года ПЦО потерял только 1 из 46 пациентов (2,2 % от общего числа). Таким образом, две части нашего исследования привели к одному и тому же выводу: уровень экспрессии *BCR-ABL* 1 % у пациентов с ПЦО считается границей для сохранения ПЦО, при превышении этого уровня вероятность потери ПЦО значительно возрастает. Мы полагаем, что это может служить вполне определенным сигналом для врачей: если уровень экспрессии у пациента с ПЦО превысил 1 %, необходимо более частое и тщательное цитогенетическое и молекулярное мониторинговое принятие клинических решений.

Пациенты в группе с экспрессией более 1 % реже достигали БМО и реже длительно сохраняли его при продолжающейся терапии иматинибом, чем пациенты из групп с более низкой экспрессией. Это может говорить о том, что заболевание у них еще (или уже) не находится в стадии улучшения, а в лучшем случае — в стадии неустойчивого равновесия, которое легко может сместиться в сторону потери ответа и рецидива.

Значение разного уровня экспрессии *BCR-ABL* у пациентов с ПЦО при сроке терапии 12, 18 и 24 мес. оказалось неодинаковым. Мы получили результаты, показывающие, что чем меньше срок терапии, тем разница в уровне экспрессии полнее отражает возможные изменения в течении заболевания. На срок 12 мес. терапии граница проходит на уровне 0,1 % — пациенты с уровнем экспрессии меньше и больше БМО значимо отличаются друг от друга по потере ПЦО. В срок 18 и 24 мес. терапии нет никаких различий между группами — границу провести уже нельзя. Возможно, небольшая выборка пациентов в каждой группе и единичное число пациентов с экспрессией более 1 % в этих группах не позволили нам обнаружить различия между ними.

Большая информативность уровня экспрессии *BCR-ABL* на ранних стадиях терапии подтвердилась и при оценке прогностического значения уровня экспрессии у пациентов в срок 6 и 12 мес. терапии. По уровню экспрессии после 6 мес. лечения пациенты могли быть четко разделены на группы, продемонстрировавшие в дальнейшем разный ответ на терапию. Мы получили данные, что все пациенты, достигшие к 6 мес. БМО (в нашем исследовании — уровня экспрессии менее 0,04 %), оптимально отвечают на терапию. Если уровень экспрессии к 6 мес. был более 10 %, то в 90 % случаев пациенты оказались резистентными к проводимой терапии, остальные 10 % приходились на долю субоптимального ответа. Группа пациентов с промежуточной экспрессией (0,12–4,49 %) включила пациентов с оптимальным, субоптимальным ответом и резистентных пациентов, доля которых составила 11,15, 66,7 и 22,2 % соответственно. Параметры достижения БМО и смены терапии как маркеры сохранения и потери ответа тоже четко отражали деление пациентов на группы по уровню экспрессии. При сроке 12 мес. терапии иматинибом уровень экспрессии менее 0,04 % уже не являлся однозначным показателем оптимального ответа, распределение по ответу не отличалось в этой группе и в группе с промежуточной экспрессией. Здесь граница, разделяющая группы по от-

вету на терапию, смещается на уровень 10 %. Мы можем сказать, что с увеличением срока терапии становятся значимыми различия экспрессии на более высоком уровне. Интересно отметить, что по доле достижения БМО на этот срок группы по-прежнему значимо различаются. По-видимому, по цитогенетическим критериям не всегда можно однозначно разделить пациентов по ответу на терапию, пациентов с субоптимальным ответом бывает трудно идентифицировать четко, и здесь критерии молекулярного ответа могут оказаться полезными. По результатам этой части исследования можно сказать, что уровень экспрессии более 10 % в срок 6 и 12 мес. с высокой вероятностью служит показателем резистентности к проводимой терапии, а уровень менее 0,1 % к 6 мес. — показателем оптимального ответа в дальнейшем.

По нашим данным, срок достижения ПЦО слабо связан со степенью достижения и сохранения БМО и со степенью потери ПЦО. Значимые отличия по всем этим параметрам обнаружены только между группами, достигшими ПЦО очень рано (срок достижения 3–4,8 мес.) и очень поздно (срок достижения 26,9–61,3 мес.). Некоторый подъем доли пациентов с БМО наблюдался в группе с медианой срока достижения ПЦО 18,4 мес., между этой группой и группой с медианой срока достижения 33,6 мес. есть значимые отличия.

Исследование динамики экспрессии *BCR-ABL* и динамики цитогенетического ответа показало, что эти два показателя хорошо согласуются между собой. Повышение уровня МО предшествует или совпадает с повышением уровня ЦО, уровень экспрессии отражает динамику заболевания, при адекватной терапии происходит снижение уровня транскрипта. На примере двух пациентов с вторичной резистентностью к терапии иматинибом мы видим, что по повышению уровня экспрессии можно судить о последующей потере ответа. При сравнении молекулярного ответа у пациента с первичной резистентностью и пациента с оптимальным ответом разница в динамике экспрессии очевидна.

ЛИТЕРАТУРА

1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology: chronic myelogenous leukemia, version 2.2008. Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network, 2007. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cml.pdf Accessed October 2007.
2. Lesser M.L., Dewald G.W., Sison C.P., Silver R.T. Correlation of 3 methods of measuring cytogenetic response in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002; 137: 79–84.
3. Schoch C., Schnittger S., Bursch S. et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002; 16: 53–9.
4. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2404–17.
5. Hughes T.P., Kaeda J., Branford S. et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(15): 1423–32.
6. Hughes T., Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev.* 2006; 20(1): 29–41.
7. Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108(1): 28–37.
8. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108(6): 1809–20.
9. Branford S., Fletcher L., Cross N.C.P. et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008; 112(8): 3330–8.
10. Branford S., Cross N.C.P., Hochhaus A. et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20(11): 1925–30.
11. Baccarani M., Castagnetti F., Gugliotta G. et al. Response definitions and European LeukemiaNet Management recommendations. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2009; 22(3): 331–4.
12. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(35): 6041–51. Epub 2009 Nov 2.
13. Ross D.M., Branford S., Moore S., Hughes T.P. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. *Leukemia* 2006; 20(4): 664–70.
14. Jabbour E., Cortes J.E., Kantarjian H.M. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008; 112(10): 2112–8.
15. Lange T., Bumm T., Otto S. et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy. *Haematologica* 2004; 89: 49–57.
16. Hughes T.P., Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2009: 477–87.
17. Merx K., Muller M.C., Kreil S. et al. Early reduction of BCRABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia* 2002; 16: 1579–83.
18. Wang L., Pearson K., Ferguson J.E., Clark R.E. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2003; 120: 990–9.
19. Cortes J., Talpaz M., O'Brien S. et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3425–32.
20. Paschka P., Muller M.C., Merx K. et al. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia* 2003; 17: 1687–94.
21. Iacobucci I., Saglio G., Rosti G. et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCyR) predicts a better duration of CCyR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 3037–42.
22. Marin D., Milojkovic D., Olavarria E. et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008; 112: 4437–44.
23. Palandri F., Iacobucci I., Soverini S. et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 1059–63.
24. Branford S., Rudzki Z., Parkinson I. et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2004; 104: 2926–32.
25. Wang L., Knight K., Lucas C., Clark R.E. The role of serial BCR-ABL transcript monitoring in predicting the emergence of BCR-ABL kinase mutations in imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 235–9.
26. Branford S., Seymour J., Grigg A. et al. BCR-ABL messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5 years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable BCR-ABL using strict sensitivity criteria. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 7080–6.
27. Press R., Galderisi C., Yang R. et al. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 6136–44.
28. Press R., Love Z., Tronnes A. et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006; 107: 4250–6.
29. Cortes J., Talpaz M., O'Brien S. et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3425–32.
30. Kantarjian H., Shan J., Jones D. et al. Significance of Increasing Levels of Minimal Residual Disease in Patients With Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia in Complete Cytogenetic Response. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 3659–63.
31. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12): 2318–57.
32. Muller M., Cross N., Erben P. et al. Harmonization of molecular monitoring of CML in Europe. *Leukemia* 2009; 23(11): 1957–63.

Стандартизация молекулярной диагностики
хронического миелолейкозаЕ. В. Аксенова, А. А. Крутов, И. Н. Солдатова, Т. В. Ахлынина,
Н. А. Лапшина, А. В. МисюринStandardisation of molecular
diagnostics for CMLE. V. Akseanova, A. A. Krutov, I. N. Soldatova,
T. V. Akhlynina, N. A. Lapshina, A. V. Misyurin

SUMMARY

Real Time PCR enables an adequate molecular monitoring of the chronic myelogenous leukemia (CML) without which in the case of this disease it is impossible to thoroughly evaluate therapy response especially when modern target inhibitory molecules involved. Unfortunately, discrepancy and methodological deviations of the results obtained by different researches hinder a proper involvement of different labs and clinics into international research protocols and makes it impossible to compare the data obtained. In this paper we discuss the different approaches to standardize Real Time PCR technique and stress the significance of the international effort to incorporate International Scale (IS) into *BCR/ABL* gene expression monitoring of CML as well as a great importance of the regular sample exchange between participating labs and necessity of the calculation of individual conversion factor (CF) for each lab involved. Nowadays CF is the only way to turn the data collected from different labs into the universal and comprehensive IS scale. The Lab for Genetic Engineering of Research Center for Hematology (Moscow) is the only one in Russia that successfully fulfilled all necessary steps of standardization procedure and obtained a position of the national reference lab for Russia. We report here the preliminary results of the Russian program of *BCR/ABL* Real Time PCR standardization that has been started under our supervision.

Keywords

chronic myeloid leukemia, molecular monitoring,
standardization, International Scale, *BCR-ABL*.

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Контакты: e.aletris@gmail.com

Принято в печать: 11 июня 2010 г.

РЕФЕРАТ

Метод ПЦР в реальном времени позволяет осуществлять молекулярный мониторинг хронического миелолейкоза, что является обязательным при современной оценке ответа на терапию. Методологические различия применяемого метода затрудняют участие лабораторий в совместных клинических и научных исследованиях, адекватную сравнимую интерпретацию получаемых результатов. Существует несколько подходов к стандартизации метода. Переход на международную шкалу (IS), который осуществляется путем обмена образцами и вычисления фактора конверсии для каждой лаборатории, признан наиболее универсальным инструментом стандартизации. Лаборатория генной инженерии является референсной в России, применяемый в ней метод молекулярной диагностики стандартизован по IS. Получены первые результаты по стандартизации других российских лабораторий.

Ключевые слова

хронический миелолейкоз, молекулярный мониторинг, стандартизация, международная шкала (IS), *BCR-ABL*.

ВВЕДЕНИЕ

Основным методом молекулярной диагностики и молекулярного мониторинга хронического миелолейкоза (ХМЛ) является количественное определение экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Роль молекулярного мониторинга *BCR-ABL* приобрела важнейшее значение с появлением ингибиторов тирозинкиназ, первым из которых стал иматиниб, поскольку при этой терапии пациенты достаточно быстро достигают полного цитогенетического ответа и дальнейшее отслеживание динамики опухолевого клона цитогенетическими методами становится невозможным. Современная концепция лечения ХМЛ включает обязательную оценку молекулярного ответа [1, 2].

Методика ПЦР в реальном времени была предложена более 10 лет назад, и существует множество вариаций этого исследования [3]. Основные эта-

пы анализа экспрессии химерных онкогенов включают выделение тотальной РНК из периферической крови или костного мозга, проведение реакции обратной транскрипции с получением кДНК и метода ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени основана на использовании специфических олигонуклеотидных последовательностей — прямого и обратного праймеров и флуоресцентного зонда, которые комплементарны последовательности кДНК изучаемого гена. По уровню флуоресцентного сигнала, продуцируемого в ходе реакции, можно судить о количестве копий гена в исходной матрице. Для определения экспрессии *BCR-ABL* вычисляется не только число копий химерного гена, но и число копий контрольного гена, или гена сравнения. Экспрессия *BCR-ABL* представляется как отношение числа копий *BCR-ABL* к числу копий контрольного гена в образце, выраженное в процентах или умноженное на коэффициент 10^n .

В лабораториях могут использоваться разные методики детекции флуоресцентного сигнала, приборы для амплификации, праймеры и зонды, ферменты для проведения обратной транскрипции, протоколы анализа и способы вычисления количества копий генов [4]. Наиболее существенным фактором, вносящим различия в значение относительной экспрессии *BCR-ABL*, служит использование различных контрольных генов. Нормализация результатов экспрессии *BCR-ABL* к значениям контрольного гена позволяет компенсировать вариации в количестве РНК в каждой реакции и различия в эффективности реакции обратной транскрипции. Кроме того, по количеству копий контрольного гена можно судить о качестве исходного генетического материала и отсеивать образцы с низким содержанием РНК.

В идеале контрольный ген должен одинаково экспрессироваться в клетках различных типов, экспрессия его должна быть сходна с экспрессией *BCR-ABL* у первичных пациентов ХМЛ, на нее не должны влиять терапевтические воздействия [4]. Наиболее широко в настоящее время используются гены *ABL*, *BCR*, *GUSB* и $\beta 2m$ (β_2 -микроглобулина), каждый из которых соответствует предъявляемым требованиям лишь отчасти. При использовании гена *ABL* возникает проблема занижения уровня реальной экспрессии для высоких значений *BCR-ABL*, вызванная тем, что амплифицируется не только сам контрольный ген, но и часть *ABL*, входящая в состав химерного гена. Относительная экспрессия *BCR-ABL* выражается как $BCR-ABL / ABL \times 100 \%$, при этом значение знаменателя складывается из двух частей: число копий самого гена *ABL* и число копий *ABL*, включенного в *BCR-ABL* как фрагмент слитного гена. Таким образом, в действительности формула выглядит как $BCR-ABL / (ABL + BCR-ABL) \times 100 \%$, при низких значениях *BCR-ABL* дополнительное слагаемое в знаменателе изменяет общее значение экспрессии незначительно, а при высоких значениях *BCR-ABL* знаменатель существенно увеличивается и общее значение экспрессии соответственно занижается. Для тест-систем с геном *BCR* в качестве контрольного тоже характерно нелинейное изменение экспрессии на высоких уровнях, но здесь наблюдается завышение значений, поскольку нормальные клетки имеют два транскрипционно активных аллеля этого гена, а клетки с химерным *BCR-ABL* — только один аллель. Ген $\beta 2m$ экспрессируется на уровне примерно на 2 lg выше, чем *ABL* и *GUSB* [5], но при этом было показано, что при его использовании можно обнаружить изменения экспрессии *BCR-ABL* в гораздо более широком диапазоне значений, а это позволяет точнее отслеживать динамику изменения экспрессии при терапии ХМЛ [6].

После нескольких лет использования технологии ПЦР в реальном времени для определения экспрессии *BCR-ABL* возник вопрос о сравнении результатов, получаемых в разных лабораториях, о выработке общих подходов к оценке результатов молекулярного анализа. Методологические различия не позволяли оценить вклад молекулярной диагностики в процесс клинического мониторинга заболевания и выработать общие рекомендации по ее использованию. Стало понятно, что для участия в совместных клинических и научных проектах по ХМЛ методика мониторинга *BCR-ABL* должна быть приведена к каким-то общим стандартам.

Существует несколько возможных подходов к стандартизации метода. Один подход — это унификация всех этапов методики или большинства из них. Такой подход достаточно трудоемкий и может включать ограниченное число лабораторий. При этом степень свободы лабораторий резко ограничивается использованием только определенных реактивов, приборов, протоколов. Другой подход заключается в строгом закреплении какого-либо одного существен-

ного параметра — использование одной и той же плазмиды в качестве стандартного положительного контроля или универсального метода оценки результатов. И наконец, третьим подходом служит переход на общую международную шкалу представления результатов, который осуществляется путем обмена образцами со стандартизованными лабораториями.

СОЗДАНИЕ СТАНДАРТНЫХ ПРОТОКОЛОВ АНАЛИЗА

Первым крупным шагом на пути стандартизации и примером первого подхода к решению проблемы стало исследование под эгидой программы «Европа против рака» (ЕАС), результаты которого были опубликованы в 2003 г. [7, 8]. Целью исследования, проводимого в 26 лабораториях 10 европейских стран, было создать универсальный стандартизованный протокол для определения экспрессии химерных онкогенов при лейкозах методом TaqMan ПЦР в реальном времени. В результате интенсивной работы по сравнению различных параметров и условий реакции были подобраны и оптимизированы праймеры и зонды к соответствующим генам-мишеням, определены температурные и временные параметры реакций обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, установлена чувствительность и воспроизводимость метода. Было признано, что чувствительность метода должна составлять не менее 100 копий плазмидной ДНК и разведения РНК 10^{-4} . Воспроизводимость, которая оценивалась как значение коэффициента вариации для порогового цикла (Ct), в этом исследовании составила менее 6 % для разведений РНК в $-3/-4$ -й степени и менее 4 % для 10 копий плазмидной ДНК. Эффективность реакции, определяемая наклоном калибровочной кривой, должна быть максимально близкой к 100 %, что соответствует наклону $-3,32$. В этой работе была достигнута эффективность $-3,45 \pm 0,3$ для разведений РНК и $-3,3 \pm 0,3$ для разведений плазмидной ДНК. Для варианта p210 гена *BCR-ABL*, служащего маркером ХМЛ, оптимальный набор праймеров и зондов был выбран из 6 вариантов. Прямой праймер располагается на экзоне 13 гена *BCR*, а обратный праймер и зонд — на экзоне 2 гена *ABL*, что позволяет в одной реакции определять оба типа транскрипта: b3a2 и b2a2. В качестве контрольных генов были предложены *ABL*, *GUS* и $\beta 2m$, определены параметры экспрессии этих генов и гена *BCR-ABL* в образцах первичных пациентов с ХМЛ и клетках линии К-562. Таким образом, были определены основные ориентиры, на которые необходимо полагаться в оценке качества работы лаборатории при мониторинге экспрессии гена *BCR-ABL*. Внедрение общих наборов праймеров и зондов и лабораторных протоколов, которые сейчас используются большинством европейских лабораторий, стало существенным продвижением на пути получения сравнимых результатов. Однако различия между лабораториями, использующими одну и ту же методику и реактивы, все равно оставались, что было показано как в этом, так и в последующих исследованиях [8, 9].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАНДАРТНЫХ ПЛАЗМИД И РАЗВЕДЕНИЙ

Было осуществлено несколько исследований с использованием одинаковых плазмид в качестве положительного контроля, одних и тех же разведений образцов клеточных линий или образцов пациентов. В исследовании, проведенном с участием 38 лабораторий в Северной Америке, экспрессия определялась в одинаковых образцах разведений клеточной линии К-562, содержащей ген *BCR-ABL*, разными методами. При оценке экспрессии, выраженной в логарифмической шкале, разброс между лабораториями оказался весьма значительным — от 1,56 до 3,04 lg для разных разведений. Наиболее

существенный вклад в различия результатов, по мнению исследователей, внесло использование *ABL* в качестве контрольного гена [10]. В работе японских авторов значения экспрессии *BCR-ABL* в одних и тех же образцах пациентов для 4 лабораторий различались в пределах от 1,3 до 714,2 раза [11]. Европейским исследователям при использовании одинаковых образцов разведений клеток пациентов и универсальной плазмиды в качестве контроля удалось достичь сопоставимых результатов между 37 лабораториями, но и здесь разница в экспрессии между крайними точками могла в отдельных случаях составлять более 2 lg. Были продемонстрированы значительные различия при использовании двух разных методов детекции флуоресцентного сигнала [12].

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПО ЛОГАРИФИЧЕСКОЙ ШКАЛЕ

В рамках масштабного международного исследования IRIS был предложен метод универсального сравнения результатов молекулярного мониторинга между лабораториями с использованием базовой линии и логарифмической шкалы представления данных. В этом исследовании молекулярный анализ методом ПЦР в реальном времени проводился в трех центрах с использованием различных лабораторных процедур и двух различных контрольных генов [13, 14]. Было отмечено, что между центрами наблюдались существенные различия в уровне экспрессии *BCR-ABL* у пациентов в одних и тех же точках времени. Между тремя лабораториями был осуществлен обмен образцами 30 первичных пациентов, и в каждой лаборатории своим вариантом метода ПЦР в реальном времени была определена базовая линия, являющаяся медианой экспрессии *BCR-ABL* в этих 30 образцах. Значение экспрессии на фоне терапии представлялось как разница между текущим и базовым уровнем, выраженным в десятичных логарифмах (lg). Таким образом, базовая линия в каждой лаборатории могла быть различной в численном выражении, но значение изменения экспрессии по логарифмической шкале позволило адекватно сравнивать ответ на терапию у разных пациентов.

Исследование IRIS внесло огромный вклад в доказательство важности молекулярного мониторинга при терапии ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ и определило базовые параметры молекулярного ответа [1, 14]. Было предложено использование параметра «большой молекулярный ответ» (БМО), значение которого является уменьшением экспрессии на 3 lg от базовой линии, и доказано, что БМО — важный прогностический фактор и показатель успешной терапии иматинибом.

МЕЖДУНАРОДНАЯ ШКАЛА

На международном совещании экспертов в Бетесде в 2005 г. были обобщены данные по молекулярному мониторингу ХМЛ и выработаны рекомендации по оптимизации методики детекции транскрипта *BCR-ABL* [15–17], которые включают все параметры анализа: качество образцов для анализа и выделение РНК, ферменты и праймеры для реакции обратной транскрипции, требования к праймерам для ПЦР-анализа, подходящие контрольные гены и стандарты, определение чувствительности и воспроизводимости анализа.

Экспертами было предложено заменить представление результатов экспрессии *BCR-ABL* в виде логарифма снижения концентрации от базовой линии на вид *BCR-ABL* / контрольный ген $\times 100\%$ и перейти на международную шкалу. Под международной шкалой (International Scale, IS) подразумевается универсальная шкала представления результатов, в которой базовой линии соответствует значение 100% ,

а БМО соответствует значение $0,1\%$. Для перехода на IS для каждой лаборатории должен быть вычислен фактор конверсии. Это коэффициент, умножение на который переводит значение экспрессии *BCR-ABL*, полученное в лаборатории, в значение IS. Представление результатов в виде *BCR-ABL* / контрольный ген $\times 100\%$ еще не является представлением результатов в IS, как иногда ошибочно полагают. Вычисление фактора конверсии происходит путем обмена образцами со стандартизованными лабораториями и сравнения получаемых результатов определения экспрессии.

Необходимость перехода на IS вызвана тем, что, как было сказано выше, между лабораториями во всем мире существуют широкие вариации в методике анализа, а полную унификацию метода невозможно осуществить в глобальном масштабе, так же как и распространить одинаковые образцы для вычисления базовой линии. Во многих лабораториях используется понятие базовой линии и представление результатов в виде lg, но каждая базовая линия вычислена на основании экспрессии у разных групп пациентов, и поэтому сравнение таких результатов между собой невозможно. Различия между лабораториями в определении экспрессии наблюдаются и при использовании одинаковых подходов и реактивов. Концепция IS позволяет каждой лаборатории применять свой метод детекции экспрессии *BCR-ABL* при условии, что метод обладает достаточной чувствительностью, специфичностью и линейностью. По рекомендациям экспертов, чувствительность анализа должна быть как минимум $0,01\%$ по IS, что соответствует уменьшению экспрессии *BCR-ABL* на 4 lg от базового уровня [15].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА КОНВЕРСИИ

Для подтверждения концепции IS был осуществлен большой международный проект по определению фактора конверсии, в котором принимало участие 38 лабораторий из 15 стран [18]. В качестве референсной лаборатории выступила лаборатория в Аделаиде, одна из трех, принимавших участие в исследовании IRIS. Определение фактора конверсии осуществлялось в два этапа. На первом этапе каждая из лабораторий вычисляла значение экспрессии *BCR-ABL* у пациентов своим методом, эти же образцы, в среднем 20 из каждой лаборатории, передавались в референсную лабораторию, в которой тоже определялось значение экспрессии. Поскольку при высоких значениях экспрессии *BCR-ABL* наблюдаются существенные искажения результатов и эти искажения различны при использовании разных контрольных генов, фактор конверсии вычисляется и считается приемлемым только для образцов с уровнем экспрессии менее 10% .

Если анализ экспрессии в лабораториях стабильный и воспроизводимый, результаты между двумя лабораториями будут отличаться на одинаковую величину. Значение фактора конверсии вычислялось по методу Bland & Altman, исходя из средней разницы между значениями, полученными в референсной и исследуемой лабораториях и выраженными в логарифмической шкале. При этом для самой референсной лаборатории для перехода на IS тоже был определен фактор конверсии, равный 1,25. Это коэффициент, умножение на который позволяет привести значение БМО в этой лаборатории, равное $0,08\%$, к значению $0,1\%$.

Вторым этапом этой работы является валидация, т.е. подтверждение значения фактора конверсии для каждой лаборатории. Для этого осуществляется повторная передача образцов в референсную лабораторию. Было показано, что до конверсии диапазон средних значений между референсной и исследуемыми лабораториями варьировал в пределах от $-7,7$ до $+8,1$ раза, а после конверсии для 17 из 19 ла-

бораторий различия в средних укладывались в промежуток $\pm 1,2$ раза. Из 38 лабораторий, в которых использовались 19 различных методов и 5 разных контрольных генов, для 22 (58 %) вычисление фактора конверсии оказалось успешным. Для остальных лабораторий вычисление фактора конверсии не могло быть осуществлено либо вследствие нелинейности выполняемого ими анализа, либо вследствие его нестабильности в течение времени исследования.

Таким образом, было подтверждено, что вычисление фактора конверсии и представление результатов экспрессии *BCR-ABL* в IS позволяет значительно снизить различия в данных лабораторий, использующих отличающиеся аналитические системы. Это дает возможность адекватно сравнивать результаты исследований разных лабораторий, что в значительной мере облегчает им совместную научную и клиническую работу, участие в международных исследованиях.

КОНЦЕПЦИЯ РЕГИОНАЛЬНЫХ РЕФЕРЕНСНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ. СТАНДАРТИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОНИТОРИНГА В ЕВРОПЕ

Одна референсная лаборатория не в состоянии справиться с работой по вычислению фактора конверсии для лабораторий всего мира, поэтому было предложено развивать сеть национальных или региональных референсных лабораторий. Первой линией таких лабораторий могут быть те, для которых определен и подтвержден фактор конверсии путем обмена образцами с лабораторией в Аделаиде. В Европе такой лабораторией является лаборатория в Мангейме (Германия), действующая в рамках программы EUTOS в European LeukemiaNet, которая провела исследование по вычислению фактора конверсии для 57 европейских лабораторий.

Лаборатория в Мангейме предложила несколько измененный подход к вычислению фактора конверсии, чем лаборатория в Аделаиде [19]. На первом этапе в исследуемую лабораторию передаются закодированные образцы разведений клеток первичного пациента ХМЛ клетками здорового донора в соотношении 0,01, 0,1, 1 и 10 %, каждый в трех повторях. На основании данных экспрессии *BCR-ABL* в этих образцах определяется зависимость значений между собой, полученных в двух лабораториях, и вычисляется уравнение линейной регрессии. Если зависимость оказывается линейной ($R^2 > 0,98$ для данных в логарифмической шкале), исследуемая лаборатория включается в работу по определению фактора конверсии. Исходя из параметров уравнения регрессии, для лаборатории вычисляется предварительный фактор конверсии. На втором этапе происходит обмен образцами пациентов и вычисление фактора конверсии по методу Bland & Altman. Схожесть между результатами исследуемой и референсной лабораторий считается приемлемой, когда результаты с учетом фактора конверсии достигают двух из трех следующих характеристик: 1) более 50 % образцов пациентов находятся в пределах 2-кратного диапазона; 2) более 75 % образцов в пределах 3-кратного диапазона; 3) более 90 % образцов в пределах 5-кратного диапазона. Первый этап позволил отсеять лаборатории с недостаточной эффективностью амплификации ПЦР в реальном времени (6 из 57). Предварительный фактор конверсии, вычисленный на первом этапе, позволяет улучшить сопоставимость результатов двух лабораторий, но схожесть при использовании фактора конверсии, полученного на втором этапе, оказалась значительно выше. Во втором этапе вычисления фактора конверсии приняло участие 48 лабораторий, для 43 из них результаты с учетом фактора конверсии отвечали заявленным критериям: для 72 % лабораторий данные находились в пределах 2-кратного диапазона, для 90 % — в пределах 3-кратного, для 96 % — в пределах 5-кратного.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ПУТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ

Развитие системы вычисления факторов конверсии и переход на IS, несомненно, является большим шагом вперед в вопросе стандартизации. Однако этот подход служит некоторым компромиссом между тем, чего хочется достичь, и тем, что доступно в настоящий момент. Наилучшим вариантом для каждой лаборатории могло бы стать наличие доступных референсных стандартов, которые позволили бы конвертировать результаты непосредственно в IS. О необходимости таких стандартов специалисты по молекулярной диагностике ХМЛ говорят на протяжении последних нескольких лет. Однако в настоящее время такие референсные материалы пока недоступны, и нет единого мнения о том, какими они должны быть. Задача довольно сложная: эти материалы должны достаточно точно имитировать образцы пациентов, контролировать все этапы анализа, должны быть применимы ко всем существующим вариантам методик [20]. Всемирной организацией здравоохранения опубликованы рекомендации по вопросам характеристики биологических референсных материалов, их подготовке и внедрению [21].

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ГНЦ РАМН

В лаборатории генной инженерии Гематологического научного центра РАМН регулярная молекулярная диагностика и мониторинг экспрессии *BCR-ABL* при ХМЛ методом ПЦР в реальном времени были начаты в 2005 г. За 5 лет работы исследовано более 9000 образцов, это около 3000 пациентов со всей России, более чем у 1000 пациентов осуществляется мониторинг.

Определение экспрессии *BCR-ABL* в лаборатории проводится методом TaqMan ПЦР в реальном времени. В качестве образцов в основном используется периферическая кровь в объеме 5–10 мл, консервант ЭДТА, образцы из регионов России доставляются в течение суток при температуре 4 °С. Выделение РНК проводится по методу Homchinsky со своими вариациями. Реакция обратной транскрипции проводится в 40 мкл с использованием random-гексамеров в конечной концентрации 10 мкмоль, обратной транскриптазы М-MLV, 2 мкг тотальной РНК. Тест-системы были разработаны на основе рекомендаций программы ЕАС по количественному мониторингу экспрессии химерных онкогенов.

ПЦР в реальном времени проводится на приборе IQ-Cycler компании Bio-Rad, каждый образец ставится в трех повторях для гена *BCR-ABL* и для контрольного гена. В качестве контрольного гена с 2005 г. по апрель 2007 г. использовался ген $\beta 2m$, с апреля 2007 г. по настоящее время — ген *ABL*. Как положительные контроли (стандарты) применяются 10-кратные разведения плазмидной ДНК, содержащей вставку фрагмента соответствующего гена. Клонирование фрагментов осуществлялось в собственной лаборатории с использованием вектора pGEM-T Easy, Promega. Стандарты применяют в каждой ПЦР для построения калибровочной кривой, для *BCR-ABL* диапазон стандартов составляет $10^6 - 10^2$ копий, для *ABL* — $10^6 - 10^4$ копий.

Параметры ПЦР в реальном времени: эффективность в пределах 95–105 %, коэффициент корреляции не менее 0,98, чувствительность метода по разведениям клеточных линий 0,01 %, по разведениям РНК первичного пациента ХМЛ РНК здорового донора 10^{-4} , воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам 10 копий/мкл ($CV\% = 1,86$).

Представление результатов при использовании $\beta 2m$ осуществлялось в виде *BCR-ABL* / $\beta 2m \times 10^7$ и lg, при

ABL — в виде $BCR\text{-}ABL / ABL \times 100 \%$ и lg. Нужно отметить, что в обоих случаях определяется число копий каждого гена — *BCR-ABL* и контрольного — и вычисляется относительная экспрессия как частное этих значений. 10^7 и lg являются лишь коэффициентами, которые вводятся для удобства представления результатов. Базовая линия была определена как медиана значений экспрессии у 30 первичных пациентов, она составила 75,16 %.

Для продолжения адекватного мониторинга экспрессии при переходе от одного контрольного гена к другому был вычислен коэффициент пересчета. Для этого в 46 образцах пациентов ХМЛ была определена экспрессия *BCR-ABL* по отношению к обоим контрольным генам ($\beta 2m$ и *ABL*), на основании полученных данных построено уравнение линейной регрессии. Полученный коэффициент регрессии составил 0,9562, а вероятность ошибки — 0,00016, что говорит о высокой корреляции результатов по двум контрольным генам между собой и возможности достоверного пересчета и представления данных, полученных с использованием гена *ABL* в данные с использованием $\beta 2m$, и наоборот. Таким образом, данные, полученные по гену $\beta 2m$, после пересчета могли быть объединены с результатами по гену *ABL* для одного и того же пациента, что позволило вести непрерывный мониторинг экспрессии *BCR-ABL*.

В 2008 г. наша лаборатория была включена в работу по вычислению фактора конверсии. В качестве референсной лаборатории выступала лаборатория в Мангейме, работа проводилась по стандартной процедуре в два этапа. На основании сравнения данных экспрессии образцов клеточных разведений была показана линейность полученных результатов ($R^2 = 0,9997$) и вычислен предварительный фактор конверсии, который составил 0,7852. Для последующей валидации наша лаборатория передала в референсную лабораторию 40 образцов пациентов, экспрессия в которых не превышала 10 %. Значение фактора конверсии, вычисленное по методу Bland & Altman, составило 0,9631. Значения схожести между результатами двух лабораторий были близки к заявленным критериям и составили: 51 % в пределах 2-кратного, 63 % в пределах 3-кратного, 88 % в пределах 5-кратного диапазона. Для представления результатов в параметрах IS значения экспрессии, полученные в лаборатории в виде $BCR\text{-}ABL / ABL \times 100 \%$, необходимо умножать на 0,9631.

Таким образом, метод определения экспрессии *BCR-ABL*, используемый в нашей лаборатории, удовлетворяет предъявляемым требованиям, лаборатория признана стандартизованной, результаты молекулярного мониторинга выражаются в формате IS. Предполагается регулярная процедура подтверждения (валидации) фактора конверсии.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ В РОССИИ

В настоящее время лаборатория генной инженерии является референсной в России. Помимо этой в России есть 8 лабораторий, включенных в программу по молекулярно-

му мониторингу *BCR-ABL* по инициативе и при поддержке компании «Новартис». Две из этих лабораторий — в Екатеринбурге и в Ростове-на-Дону, стабильно работают уже на протяжении нескольких лет, остальные начали работу по мониторингу *BCR-ABL* в 2009 г. Все лаборатории используют одинаковые наборы реактивов для обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, одни и те же протоколы, стандарты, *ABL* является контрольным геном также во всех лабораториях.

В 2009 г. нами начата работа по определению факторов конверсии для этих лабораторий. Были приготовлены 10-кратные разведения клеток линии К-562, экспрессирующей *BCR-ABL*, клетками здоровых доноров. В 7 лабораторий были разосланы закодированные образцы разведений 4 концентраций — от 0,01 до 10 %, каждого разведения по 3 повтора. Для каждого образца проводили два независимых эксперимента по определению экспрессии *BCR-ABL*, начиная с этапа обратной транскрипции. В нашей лаборатории были выполнены аналогичные измерения на таких же образцах.

На настоящий момент получены результаты из 4 лабораторий. В референсной и только в одной из исследуемых лабораторий (Екатеринбург) чувствительность метода оказалась достаточной для определения экспрессии *BCR-ABL* в разведении 0,01 %. В остальных 3 лабораториях конечным разведением, в котором детектировалась экспрессия *BCR-ABL*, было 0,1 % (табл. 1). Лаборатории отличались друг от друга и по количеству копий контрольного гена *ABL* в образцах. В лаборатории Самары медиана количества копий гена *ABL* составила всего 317,5, в лаборатории Ростова-на-Дону — 1255, что значительно ниже количества копий в трех остальных лабораториях (табл. 2). Во всех исследуемых лабораториях обнаружилась линейная зависимость между их результатами и результатами референсной лаборатории ($R^2 > 0,99$). Были определены предварительные факторы конверсии, исходя из уравнений линейной регрессии для каждой лаборатории, по формуле:

$$\lg y = (\text{slope} \times \lg \text{MMR}^{\text{IS}}) + \text{intercept},$$
$$\text{где } \lg \text{MMR}^{\text{IS}} = -1.$$

$$\text{Фактор конверсии} = \text{MMR}^{\text{IS}} / \text{antilg } y.$$

Таблица 1. Средние значения экспрессии *BCR-ABL* и коэффициент вариации для разведений линии К-562 в 5 лабораториях

Лаборатория/ город	Параметры анализа	Разведение			
		10 %	1 %	0,10 %	0,01 %
Москва	Среднее	42,57	6,20	0,42	0,03
	Коэффициент вариации, %	21,98	21,68	33,92	41,62
Екатеринбург	Среднее	15,61	2,63	0,2	0,03
	Коэффициент вариации, %	49,63	17,39	22,14	60,96
Ростов-на-Дону	Среднее	21,45	3,16	0,17	—
	Коэффициент вариации, %	15,81	18,09	54,01	—
Новосибирск	Среднее	37,02	4,83	0,4	—
	Коэффициент вариации, %	10,51	10,85	21,81	—
Самара	Среднее	49,67	2,86	0,14	—
	Коэффициент вариации, %	31,01	45,83	75,17	—

Таблица 2. Медиана количества копий гена *ABL* в образцах, определенная в 5 лабораториях, коэффициент регрессии и предварительный фактор конверсии для 4 исследуемых лабораторий

Лаборатория/город	Медиана количества копий гена <i>ABL</i> в образцах	Коэффициент регрессии, R^2	Предварительный фактор конверсии
Москва	35 600		
Екатеринбург	47 750	0,9962	1,3192
Ростов-на-Дону	1 255	0,9995	2,4424
Новосибирск	12 400	0,9985	1,0053
Самара	317,5	0,9935	4,5709

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на использование одного и того же метода, значения экспрессии *BCR-ABL* в одинаковых образцах заметно различаются между лабораториями, что еще раз подтверждает необходимость определения для них фактора конверсии. Высокое значение коэффициента регрессии, полученное в каждой лаборатории, доказывает линейную зависимость между результатами референсной и всеми исследуемыми лабораториями. Однако недостаточная чувствительность применяемых в трех лабораториях методов и низкое значение количества копий гена *ABL* в двух из них не позволяют с полной уверенностью утверждать, что результаты этих лабораторий могут быть адекватно переведены в формат IS. По-видимому, для них требуется как минимум повторная проверка их работы по разведениям клеточных линий и, если результаты повторных тестов будут такими же, дальнейшее совершенствование применяемого метода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2404–17.
2. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(35): 6041–51. Epub 2009 Nov 2.
3. ПЦР «в реальном времени». Под ред. Д.В. Ребрикова. М.: Бином, 2009.
4. van der Velden V.H., Hochhaus A., Cazzaniga G. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17(6): 1013–34.
5. Rosti G., Martinelli G., Bassi S. et al. Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103(6): 2284–90.
6. Rulcova J., Zmekova V., Zemanova Z. et al. The effect of total-ABL, GUS and B2M control genes on BCR-ABL monitoring by real-time RT-PCR. *Leuk. Res.* 2007; 31(4): 483–91.
7. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V.H. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) — a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12): 2474–86.
8. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12): 2318–57.
9. Muller M.C., Saglio G., Lin F. et al. An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. *Haematologica* 2007; 92(7): 970–3.
10. Zhang T., Grenier S., Nwachukwu B. et al. Inter-laboratory comparison of chronic myeloid leukemia minimal residual disease monitoring: summary and recommendations. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9(4): 421–30.
11. Yamada M.F., Fujiwara T., Ishikawa I. et al. Interlaboratory comparison of quantitative RT-PCR based detection for minimal residual disease in leukemias: a standardization approach in Japan. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008; 214(2): 97–104.
12. Muller M.C., Erben P., Saglio G. et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia* 2008; 22(1): 96–102.
13. Hughes T.P., Kaeda J., Branford S. et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(15): 1423–32.
14. Hughes T., Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev.* 2006; 20(1): 29–41.
15. Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108(1): 28–37.
16. Branford S., Cross N.C.P., Hochhaus A. et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20(11): 1925–30.
17. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108(6): 1809–20.
18. Branford S., Fletcher L., Cross N.C.P. et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008; 112(8): 3330–8.
19. Muller M.C., Cross N.C.P., Erben P. et al. Harmonization of molecular monitoring of CML in Europe. *Leukemia* 2009; 23(11): 1957–63.
20. Cross N.C. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2009; 22(3): 355–65.
21. WHO Expert Committee on biological standardization. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* 2007; 941: 1–340.

Современные возможности Карельского регистра неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток по поиску неродственных доноров для российских гематологических трансплантационных центров

Ю.Г. Иоффе

Modern possibilities Karelian Registry of unrelated hematopoietic stem cell donors in searching unrelated donors for Russian transplant centers

Yu. G. Ioffe

SUMMARY

This manuscript presents the modern possibilities of Karelian Registry of unrelated hematopoietic stem cells donors in the searching donors for Russian hematology transplant centers.

Keywords

searching of unrelated hematopoietic stem cells donors.

Charitable Fund «Karelian Registry of unrelated hematopoietic stem cell donors», Petrozavodsk

Контакты: karelian.bmd@onego.ru

Принято в печать: 6 мая 2010 г.

РЕФЕРАТ

В статье представлена информация о современных возможностях Карельского регистра неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток по поиску доноров кроветворных клеток для российских гематологических трансплантационных центров.

Ключевые слова

поиск неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток.

Для выполнения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) абсолютным условием является наличие совместимого донора. Однако далеко не всем пациентам, нуждающимся в этой операции, удается найти совместимого донора-родственника. В таком случае возникает необходимость поиска неродственного донора ГСК. На протяжении более чем двух десятилетий во всем мире широко применяется алгоритм поиска донора ГСК для реципиента, нуждающегося в аллогенной трансплантации: поиск донора среди близких родственников пациента (родные братья или сестры), в случае же отсутствия совместимого родственного донора — поиск неродственного донора ГСК. Информация о потенциальных неродственных донорах ГСК находится в специальных организациях — регистрах доноров ГСК. Регистр доноров ГСК — это информационная база, включающая в себя данные о донорах, а именно: личные данные, HLA-фенотип, масса тела, рост, информация о состоянии здоровья на момент вступления в регистр, контактные данные донора и его индивидуальный код.

Карельский регистр неродственных доноров ГСК был создан в 2001 г. при поддержке одного из крупнейших регистров Германии — Фонда Стефана Морша. За время своего существования Карельский регистр провел 13

массовых акций по рекрутированию новых доноров в Петрозаводске, Костомукше (Республика Карелия), Москве, Астрахани и Чите. Кроме того, Карельский регистр осуществляет привлечение новых доноров по их индивидуальным просьбам. В 2004 г. в Центре трансплантации костного мозга Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова осуществлены две аллогенные неродственные трансплантации ГСК от доноров Карельского регистра. С 2004 г. по май 2010 г. было получено 135 запросов на поиски доноров из России и других стран мира. В настоящее время база данных Карельского регистра насчитывает около 2700 доноров.

Первоначально Карельский регистр осуществлял свою деятельность по рекрутированию, поиску и обследованию доноров при активной помощи и поддержке Фонда Стефана Морша. Однако с 2006 г. Карельский регистр стал членом Всемирной ассоциации доноров костного мозга (World Marrow Donor Association — WMDA), а с 2007 г. вошел в Международную поисковую систему доноров костного мозга (Bone Marrow Donors Worldwide — BMDW) [1]. В результате необходимость в дальнейшей внешней поддержке Фондом Стефана Морша отпала, и с 2006 г. Карельский регистр действует абсолютно самостоятельно и независимо.

ПЕРВИЧНЫЙ ЗАПРОС НА ПОИСК ДОНОРА

**В: КАРЕЛЬСКИЙ РЕГИСТР НЕРОДСТВЕННЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**
ФАКС: +7-8142-765-897; ТЕЛЕФОН: +7-8142-670-180;
E-MAIL: KARELIAN.BMD@ONEGO.RU

Дата запроса: ____/____/____ День месяц год	Необходимый тип поиска: ☐ Только доноры ГСК ☐ Только единицы пуповинной крови ☐ И доноры ГСК, и пуповинная кровь	Поиск срочный? ☐ Да ☐ Нет Принимается ли частичная совместимость? ☐ Да ☐ Нет Провести поиск совместимого неродственного донора ГСК для данного пациента: ☐ в России ☐ в России и за ее пределами
Фамилия: _____		Имя: _____
Дата рождения: ____/____/____ День месяц год	Пол: ☐ М ☐ Ж Масса тела: _____	CMV-статус: ☐ Положительный ☐ Отрицательный ☐ Неизвестен
Диагноз: _____		Дата установки диагноза: ____/____/____ День месяц год
Группа крови и резус фактор: _____		Этническая принадлежность (указывать не обязательно): _____

Результаты типирования пациента класса I:

	A	B	C
Первый антиген/аллель:			
Второй антиген/аллель:			
Метод анализа:	☐ Серол. ☐ ДНК	☐ Серол. ☐ ДНК	☐ Серол. ☐ ДНК

Результаты типирования пациента класса II:

	DRB1	DRB3/4/5	DQB1	DQA1
Первый антиген/аллель:				
Второй антиген/аллель:				
Метод анализа:	☐ Серол. ☐ ДНК	☐ Серол. ☐ ДНК	☐ Серол. ☐ ДНК	☐ Серол. ☐ ДНК
ВЫЯВЛЕНЫ ЛИ ГАПЛОТИПЫ? ☐ Да ☐ Нет				

Запрашивающий центр: _____		Координатор/врач: _____
Телефон: _____	Факс: _____	E-mail: _____
ЛПУ, в котором лечится пациент: _____		
Трансплантационный центр, где планируется выполнение ТКМ: _____		

Включение в BMDW позволило Карельскому регистру предоставлять своих доноров для трансплантационных и поисковых центров разных стран мира (в т. ч. и России), а также осуществлять поиск доноров в базах данных иностранных регистров. Помимо этого Карельский регистр активно сотрудничает с другими российскими регистрами доноров костного мозга, находящимися в Москве и Пушкине (г. Санкт-Петербург), и с Самарским банком пуповинной крови. Все это позволяет оперативно и эффективно осуществлять поиск доноров в российских и международных базах доноров кроветворных клеток.

В настоящее время Карельский регистр обладает следующими возможностями:

- 1) предварительный поиск доноров в собственной базе данных по запросам российских и иностранных трансплантационных/поисковых центров;
- 2) предварительный поиск доноров в базах данных других российских регистров неродственных доноров ГСК и Самарском банке пуповинной крови в случае отсутствия предварительно совместимых доноров в собственной базе данных;
- 3) предварительный поиск доноров в базах данных иностранных регистров доноров ГСК (с помощью BMDW) в случае отсутствия предварительно совместимых доноров в базах данных российских регистров;
- 4) выполнение дополнительного HLA-типирования предварительно совместимым донорам Карельского регистра, а также иностранным донорам по локусам HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 (и иным локусам в случае необходимости) с низким, средним и высоким разрешением;
- 5) исследование предварительно совместимых доноров Карельского регистра и иностранных доноров на трансмиссивные инфекции;
- 6) медицинское обследование предварительно совместимых доноров Карельского регистра и иностранных доноров с целью определить их годность к донации ГСК;
- 7) организация забора донорских ГСК у доноров Карельского регистра и иностранных доноров в центрах сбора ГСК;
- 8) организация медицинского обследования и наблюдения доноров Карельского регистра, осуществивших донацию ГСК.

Следует обратить особое внимание на то, что в настоящее время в России не существует единой структуры, объединяющей действующие российские регистры доноров ГСК и банки пуповинной крови, которая могла бы существенно облегчить поиск доноров российским трансплантационным центрам. В какой-то мере эту роль сейчас выполняет BMDW, поскольку она аккумулирует информацию о донорах из тех российских регистров, которые входят в эту систему. Поэтому российские трансплантационные центры, имеющие доступ к этой системе, уже сейчас могут осуществлять предварительный поиск российских доноров через BMDW. Однако такой возможностью обладают не все российские трансплантационные центры и гематологические клиники. Для них мы готовы осуществлять предварительный поиск доноров в иностранных регистрах через BMDW, а также и все остальные действия, указанные выше.

Поиск совместимого неродственного донора — довольно непростая процедура и состоит из ряда этапов, соблюдение которых требуется для того, чтобы получить положительный результат. Ниже очень схематично и кратко рассмотрены все необходимые шаги.

Для инициации поиска донора ГСК в базах данных Карельского регистра, российских регистров, а также иностранных регистров достаточно прислать в наш адрес за-

полненный бланк «Первичного запроса на поиск донора». Образец такого бланка представлен выше.

После получения первичного запроса на поиск донора регистр высылает запрашивающему трансплантационному/поисковому центру информацию обо всех предварительно совместимых с реципиентом донорах. Поскольку при рекрутировании доноров первичное типирование включает в себя определение HLA-фенотипа/генотипа по локусам A, B и (реже) DRB1, то в результате поиска регистр указывает тех доноров, которые оказались предварительно совместимы именно по этим локусам. Кроме того, в этот список включаются и те доноры, которые оказались частично совместимыми с реципиентом по одному или двум локусам. Эта информация может быть полезна трансплантационному центру в том случае, когда в результате поиска не удастся найти полностью совместимого донора и встанет вопрос о выполнении трансплантации от частично совместимого донора.

Далее трансплантационный/поисковый центр отбирает из представленного списка заинтересовавших его доноров и просит выполнить им дополнительное скрининговое типирование с низким или средним разрешением по локусу HLA-DRB1 (либо по локусу HLA-DQB1 или HLA-C). Здесь необходимо отметить, что согласно Рекомендациям по совместимости взрослых неродственных доноров и реципиентов (так называемый золотой стандарт поиска совместимых неродственных доноров ГСК), разработанным Национальной программой донорства костного мозга США (National Marrow Donor Program — NMDP), наиболее важна и целесообразна совместимость по 4 локусам (HLA-A, -B, -C, -DRB1), тогда как совместимость по HLA-DQB1 имеет несколько меньшее значение, хотя она не игнорируется [2].

Регистр проводит донорам дополнительное HLA-типирование и высылает результат в запрашивающий трансплантационный/поисковый центр. Вполне очевидно, что в результате исследования дополнительных локусов количество оставшихся совместимых доноров уменьшается, а нередко их не остается вообще. В том случае, если в списке остаются доноры, предварительно совместимые с реципиентом по локусам HLA-A, -B, -DRB1 (или по локусам HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1), трансплантационный центр просит регистр выполнить этим донорам HLA-типирование с высоким разрешением по всем необходимым локусам. Цель такого типирования — установить совместимость донора и реципиента на уровне аллеля (при этом предполагается, что реципиенту предварительно уже было выполнено подобное высокоразрешающее HLA-типирование по всем необходимым локусам). В случае если по результатам данного типирования донор и реципиент оказываются полностью совместимыми (после соответствующего обращения трансплантационного/поискового центра), выполняется исследование на трансмиссивные инфекции, а также группу крови и резус-фактор.

Если у донора не выявляются маркеры инфекционных заболеваний, трансплантационный центр запрашивает у регистра пробы крови донора для выполнения так называемого подтверждающего типирования (confirmatory typing), которое включает в себя повторное выполнение донору HLA-типирования с высоким разрешением по всем локусам, а также повторное исследование на трансмиссивные инфекции и группу крови. Подтверждающее типирование проводится в лаборатории трансплантационного центра или в независимой лаборатории, отобранной трансплантационным центром.

Только после успешного прохождения всех перечисленных выше этапов донор считается предварительно отобранным для донации, о чем трансплантационный центр уведом-

ляет регистр. Регистр организует проведение медицинского обследования отобранного донора для определения его годности к донации, результат которого передается в трансплантационный центр. В случае согласия донора и его годности к донации согласовывается центр, в котором будет осуществляться сбор донорских клеток, дата трансплантации, объем необходимого донорского продукта и способ транспортировки донорских клеток в трансплантационный центр. Следует отметить, что на всех этапах активации и обследования регистр предварительно получает согласие у донора на выполнение каждой манипуляции. При этом донор может отказаться от дальнейших действий без объяснения причин, что закреплено в стандартах WMDA [3]. Однако согласно нашему опыту, это происходит крайне редко (не более чем в 2 % случаев).

После осуществления донором донации ГСК курьер трансплантационного центра доставляет продукт донорских клеток в трансплантационный центр, где и осуществляется трансплантация. В ранний постдонационный период донор остается под медицинским наблюдением центра сбора ГСК, где в случае необходимости ему оказывается медицинская помощь. В последующем медицинское наблюдение за донором организует его регистр.

Необходимо отметить, что приведенные выше этапы по поиску совместимых доноров носят схематичный и несколько условный характер и в реальной жизни могут отличаться, поскольку процесс поиска донора достаточно сложный и индивидуальный. Кроме того, на любом этапе трансплантационный центр имеет возможность изменить тактику поиска донора, что удобно, поскольку не привязывает врачей-трансплантологов к запрограммированной схеме действий.

На каждом этапе поиска донора регистр несет определенные финансовые расходы, которые подлежат возмещению со стороны трансплантационного центра либо иных организаций, финансирующих поиск неродственного донора ГСК. Но поскольку результат поиска до самого конца неизвестен, то Карельский регистр придерживается принципа постепенного возмещения его расходов по поиску по мере прохождения каждого из этапов. Единственным обязательным условием является возмещение расходов по уже начатым процедурам на конкретном этапе, несмотря на возможную ситуацию, когда по каким-либо причинам трансплантационный центр отказывается от дальнейшего поиска донора. Стоимость поиска донора в каждом конкретном случае индивидуальна, поскольку невозможно заранее предположить, какому количеству доноров необходимо будет выполнить дополнительное типирование. Кроме того, в стоимость «поиска донора» входят расходы по обследованию донора на трансмиссивные инфекции, медицинское обследование до и после донации, собственно сбор донорских ГСК,

расходы по возмещению донору его временной потери трудоспособности, страхованию донора, а также возмещение его возможных расходов на проезд к месту сбора донорских ГСК и обратно. Таким образом, итоговая сумма расходов в каждом конкретном случае будет разной и в момент инициации поиска донора она неизвестна. Однако по нашим предварительным расчетам, в целом все указанные выше расходы по поиску донора в Карельском регистре ожидаются на 20–25 % ниже, чем такие же расходы по поиску иностранного донора. Вместе с тем мы исходим прежде всего из того, что главная цель нашего регистра — всеми возможными нам способами постараться найти для реципиента совместимого донора в нашем либо в других регистрах, и потому вопрос стоимости поиска встает на второй план. К сожалению, в нашей стране проблема финансирования поиска неродственного донора до сих пор не урегулирована законодательно, поэтому в подавляющем большинстве случаев она ложится тяжелым бременем на плечи пациентов и их родственников.

Для обмена информацией между регистрами доноров ГСК, трансплантационными центрами и центрами сбора донорских кроветворных клеток WMDA разработала специальные формы документов, которыми Карельский регистр пользуется в своей работе и которые готов предоставить в случае возникновения такой необходимости. Кроме того, нами разработана методичка «Алгоритм поиска совместимого неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток». Электронную версию данной методички мы готовы выслать всем, кто занимается поиском неродственных доноров ГСК. Для этого достаточно прислать запрос на адрес Карельского регистра.

Мы искренне надеемся, что предоставленная выше информация окажется полезной и облегчит работу российских гематологов-трансплантологов, занимающихся поиском неродственных доноров ГСК для своих пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bone Marrow Donors Worldwide — Participating Registries [http://www.bmdw.org/index.php?id=addresses_members&no_cache=1&tx_spdirectory_pi1\[mode\]=detail&tx_spdirectory_pi1\[modifier\]=zip&tx_spdirectory_pi1\[value\]=101&cHash=5c5f92b200](http://www.bmdw.org/index.php?id=addresses_members&no_cache=1&tx_spdirectory_pi1[mode]=detail&tx_spdirectory_pi1[modifier]=zip&tx_spdirectory_pi1[value]=101&cHash=5c5f92b200).
2. Bray R., Hurley C., Kamani N. et al. National Marrow Donor Program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 45–53.
3. WMDA Standards — Current version — 2008 http://www.worldmarrow.org/fileadmin/WorkingGroups_Subcommittees/Accreditation/Documents/standards_history/WMDA_Standards-version_November_2008_01.pdf.

Ответ на письмо в редакцию. Организация мониторинга в интенсивной гематологии и отбор больных для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

С.Н. Абдусаламов, К.Н. Мелкова, Н.В. Горбунова, Т.З. Чернявская, А.А. Афанасенков

Контакты: sergeyhome@mail.ru

Принято в печать: 23 июня 2010 г.

Выражаем благодарность авторам письма в редакцию [1] за внимательное прочтение нашей статьи [2]. Большое количество вопросов и комментариев, которые в интересах читателей нельзя оставить без ответа, укрепили нас в мнении об актуальности затронутой проблемы ведения больных в перитрансплантационный период. К сожалению, при множестве частных вопросов авторы письма не дали оценки либо не затегили основной идеи публикации.

Успех выполнения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) зависит от работы трех ключевых специалистов, осуществляющих ее различные этапы: гематолога, реаниматолога и трансфузиолога. Предложенный в статье принцип организации взаимодействия первых двух специалистов, обеспечивающих качество сопроводительной терапии, ранее просто не обсуждался в русскоязычной литературе. Роль реаниматолога в лечении гематологического больного существенно недооценена, а с практической точки зрения крайне важно определить момент, когда к лечению должен подключиться специалист по неотложной медицине.

Исторически сложилось, что в гематологической практике реаниматолога зачастую вызывают не в ситуации, когда состояние пациента можно достаточно легко стабилизировать рядом рутинных мер, а когда органная (или полиорганная) недостаточность настолько выражена, что даже полный арсенал современных реанимационных методик и оборудования уже бессилён. Поскольку обычно декомпенсация не возникает внезапно (ей предшествуют множественные формальные признаки), речь идет о недооценке всех факторов риска и прогноза на более раннем этапе и, соответственно, о несвоевременности интенсификации сопроводительной терапии. Для улучшения исходов высокодозного лечения критична оптимизация сроков применения реанимационных принципов, наиболее эффективных еще до развития критического состояния («красный» уровень), для чего необходима слаженная работа врачей нескольких специальностей. При этом задачей каждого из специалистов, участвующих в ведении больного, служит именно обеспечение возможности выполнения современных стандартных (для каждой специальности) протоколов лечения, без каких-либо инноваций и патентов, не апробированных в больших клинических исследованиях.

Опыт показывает, что рутинное формализованное проведение мониторинга более важно, чем субъективное восприятие состояния пациента лечащим врачом. Нами были

предложены формальные критерии ухудшения состояния пациента, требующие обязательной интенсификации наблюдения и лечения. В листе наблюдения, простом и доступном для быстрого исполнения как врачом, так и медицинской сестрой, учитываются показатели, оценка которых отражает состояние жизненно важных функций организма человека: дыхания, кровообращения, неврологического статуса и терморегуляции. За каждым из этих показателей стоит теоретическое и практическое обоснование их границ. Однако формат статьи не позволяет описывать их подробно, а алгоритмы действий для их коррекции хорошо знакомы практикующим реаниматологам.

В качестве примера приведем ситуацию, предложенную авторами письма: «... SpO_2 85 % *расценивается авторами как не требующий вмешательства... расчет показывает, что уже SpO_2 90 % при FiO_2 40 % соответствует индексу оксигенации около 200 и диагнозу “острое повреждение легких”... авторам остается указать, как долго, по их мнению, должен задышаться пациент до принятия решения об интенсификации лечения».*

Мы не можем согласиться с тезисом, что уровень базовой интенсивной терапии (ИТ) («зеленый») расценивается авторами письма как «не требующий вмешательства». Мы подчеркивали в статье и еще раз хотели бы повторить, что все пациенты в перитрансплантационный период нуждаются в качественном мониторинге состояния и интенсивной сопроводительной терапии. Это означает, что в пределах критериев «зеленого» уровня пациент также будет нуждаться в ИТ с соответствующей коррекцией возникающих изменений, которые не носят угрожающего жизни характера.

В разделе SpO_2 листа наблюдения [2; рис. 1] предусмотрено три графы соответственно трем уровням интенсивности сопроводительной терапии. Логично предположить, что графа с SpO_2 85–90 % должна быть выделена желтым цветом, подразумевая уровень неотложной терапии. Мы приносим извинения за допущенную авторами в статье [2; рис. 1] техническую опечатку. Тем не менее некоторые умозаключения, приводимые авторами письма, могут ввести читателя, не ориентирующегося в тонкостях интенсивной медицины, в заблуждение. Поэтому остановимся на этом подробнее.

Значение SpO_2 97–100 % считается нормальным, более 88 % — допустимым [3]. Пульс-оксиметрия — прямой метод оценки, не позволяет оценить в полной мере па-

раметры газообмена пациента. Кроме того, на точность измерения влияет ряд факторов. Точность снижена при гипоперфузии (гипотермия, шок), аритмии, тяжелой анемии, в случаях гиперпигментации кожи, присутствия в крови красителей (например, метиленовый синий), а также если ногти пациента покрыты лаком. Если в крови присутствует карбоксигемоглобин, то показания пульс-оксиметра превышают реальные значения, а при метгемоглобинемии (например, при приеме ряда медикаментов) — занижают. Таким образом, оценить только на основании SpO_2 , «задыхается» пациент или нет, не представляется возможным. Снижение SpO_2 — это только основание для дальнейшего диагностического поиска. Для оценки степени гипоксемии используется инвазивный метод определения парциального давления кислорода в артериальной крови — PaO_2 . Респираторный индекс (индекс оксигенации) рассчитывается не на основании SpO_2 , а как отношение PaO_2/FiO_2 , где FiO_2 — концентрация кислорода во вдыхаемом газе, выраженная в десятых долях, нормальное значение которого составляет около 500. При значении индекса менее 300 отмечают признаки дыхательной недостаточности. Респираторный индекс менее 200 — абсолютное показание к началу искусственной вентиляции легких. Этот показатель входит в диагностические критерии острого повреждения легких и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [3].

Конечно, корреляция между показателями SpO_2 и PaO_2 существует: снижение PaO_2 влечет за собой снижение SpO_2 ; однако зависимость носит нелинейный характер, и, как указывалось выше, на ее достоверность влияют многие факторы. Опубликованы единичные исследования, в которых приводятся данные о возможности использования соотношения SpO_2/FiO_2 (вместо PaO_2/FiO_2) для ранней диагностики ОРДС. Тем не менее авторы указывают, что диагностические значения индексов SpO_2/FiO_2 и PaO_2/FiO_2 не совпадают, метод не позволяет оценить другие показатели газового состава крови и необходимы дальнейшие исследования в этом направлении [4]. Следовательно, решение о поражении легких и необходимости вмешательства должно приниматься не на основании данных SpO_2 , а на основании комплексной оценки состояния пациента с последующей коррекцией терапии согласно стандартным алгоритмам.

Специализированные знания, необходимые для дифференциальной диагностики в изложенной ситуации, относятся к базовым для реаниматолога и обычно не входят в «багаж» гематолога или трансфузиолога. Формальный признак служит триггером для дальнейшего диагностического поиска. Трансплантация ГСК (ТГСК) — высокотехнологичный метод лечения в интенсивной гематологии на стыке специальностей, в каждой из которых невозможно одновременно иметь высшую квалификацию, необходимую для успешной работы. Именно поэтому для своевременного грамотного реагирования оправдано привлечение консультанта, переоценка врачом собственных знаний в смежной специальности может оказаться опасной для пациента.

Приведем еще один, также, на наш взгляд, очень показательный пример применения базовых знаний реаниматолога.

Цитата из письма: «Выясняется, что... уровень креатинина определяется не лабораторно (в крови), а на основании простого измерения объема выделенной мочи; олигурией считают выделение менее 40 мл мочи в час, т. е. чуть менее 1000 мл мочи за сутки...» На самом деле в статье [2; табл. 2] говорится о том, что по такому показателю, как диурез (требующий ежедневной клинической и лабораторной оценки), консультация реаниматолога рекомендуется в двух случаях: олигурия (< 40 мл/ч) или

повышение креатинина в плазме. Отвечая на замечание по олигурии, считаем необходимым привести следующие данные. На 2-й Международной консенсус-конференции группы Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) в 2004 г. была принята новая классификация «острого почечного повреждения» (ОПП) — термин, которым предложено заменить понятие «острая почечная недостаточность». Одним из диагностических критериев (достаточно наличия только одного из критериев) является диурез. Величина диуреза менее 0,5 мл/кг/ч — критерий I стадии ОПП, стадии риска. Таким образом, при массе тела пациента 70–80 кг величина диуреза 35–40 мл/ч соответствует стадии риска. А развитие олигурии, резистентной к диуретической терапии (диурез менее 0,5 мл/кг/ч за 12 ч и/или двукратное повышение концентрации креатинина плазмы — соответствие критерию «повреждение»), у критических пациентов, находящихся в ОРИТ, считают признаком серьезного нарушения почечной функции. Критерии «повреждение» и «недостаточность» (II и III стадии ОПП) достоверно коррелируют с высокой госпитальной смертностью и считаются независимыми факторами риска летальных исходов [5, 6]. Из этого следует, что своевременной коррекция будет считаться на стадии риска, т. е. при диурезе 40 мл/ч и менее, а не через 12 ч наблюдения за больным с олигурией, когда риски осложнений значительно повышаются. Таким образом, привлечение реаниматолога на стадии олигоанурии окажется запоздалым и будет снижать общую эффективность лечения. Замечание авторов письма подтверждает распространенность такого подхода и еще раз подчеркивает актуальность и важность предложенных критериев оценки состояния больного с ТГСК.

Цитата из письма: «...отказ от использования профилактической антибиотикотерапии, профилактических трансфузий тромбоцитов... назначения колоние-стимулирующих факторов в посттрансплантационный период и т. д. ...обсуждаются... как путь “оптимизации”. Однако потенциальным результатом их использования может быть оптимизация фармакоэкономических показателей, поскольку эти методы профилактики могут не увеличивать выживаемость больных, увеличивая стоимость лечения. ...не показано, что профилактическое использование... тромбоцитов может приводить к значимому повышению смертности».

Оптимизация фармакоэкономических показателей делает ТГСК более доступным методом лечения, когда за счет экономии средств потенциально излечивающий метод может быть применен в терапии большего числа пациентов. Так, нами в 2009 г. фактически было выполнено 41 ТГСК (в т. ч. 6 аллогенных) при выделенном финансировании на 38 ТГСК.

Приведенные же в статье принципы оптимизации сопроводительной терапии и отказ от полипрагмазии соответствуют современным подходам и международным рекомендациям, когда любое назначение должно иметь строгие показания (а не отсутствовать противопоказания к нему). Лишние назначения не только удорожают стоимость лечения, но и потенциально опасны. Так, например, необоснованное применение антибиотиков ведет к росту рефрактерной госпитальной флоры и сочетанной токсичности (как негематологической, так и гематологической), применение Г-КСФ несет в себе увеличение рисков реакции «трансплантат против хозяина», переливание тромбоцитов — риски серьезных, клинически значимых осложнений, в т. ч. летальных (аллоиммунизация, трансмиссивные инфекции). Внедрение принципов совместного наблюдения с тщательным мониторингом позволяет правильно оценить состояние пациента, грамотно расставить акценты и оптимизировать ведение больного.

Цитата из письма: «Если... до 2007 г. ... не соблюдали правила асептики и антисептики... в то, что подобные проблемы присутствуют и в ведущих зарубежных трансплантационных центрах... верится с трудом. Возможно, конечно, что авторами разработаны какие-либо инновационные подходы, касающиеся асептики и антисептики...»

В качестве примера приведем обработку рук медицинского персонала (мытьё и дезинфекция), которая до настоящего времени служит одним из самых простых и эффективных способов профилактики внутрибольничной инфекции. Но именно из-за своей простоты этот метод часто недооценивается. В среднем, согласно проведенным исследованиям, медицинские работники моют руки примерно в 50 % тех случаев, когда требуется обработка рук, и склонны преувеличивать частоту и качество проведенной ими обработки. Во многих медицинских учреждениях проблема заключается не в том, что медицинский персонал учреждения не знает, как мыть руки, или не знает, в каких ситуациях требуется соответствующая обработка рук, а в том, что медицинский персонал просто не делает того, что положено делать. Другими словами, проблема заключается в соблюдении служебных инструкций [7]. Многочисленные (**зарубежные!**) эпидемиологические исследования практики гигиены рук среди медицинского персонала показали неудовлетворительные результаты: частота соблюдения медперсоналом правил гигиены рук оказалась равной 5–81 % (в среднем 40 %) [8–14]. Наиболее низкий уровень (36 %) гигиены рук был зарегистрирован в отделениях интенсивной терапии, где необходимость в этих мероприятиях возникает наиболее часто [15]. Соблюдение правил асептики и антисептики — только часть всего комплекса профилактических мероприятий ведения больного, значение которого для исхода ТГСК нельзя недооценивать [16].

Мы позволим процитировать собственную статью, поскольку убеждены в важности следующего утверждения: «Безусловно, ни одна из предпринятых мер оптимизации тактики ведения больного в отдельности не играет определяющей роли и не является панацеей. Подход заключается в формализованном, рутинном, ежедневном выполнении всего комплекса мероприятий в сочетании с тщательным ежедневным мониторингом состояния пациента, своевременной коррекцией возникающих нарушений и жестким административным контролем. Такие, на первый взгляд кажущиеся простыми, меры в совокупности приводят к значительному улучшению исходов при проведении ТГСК, хотя и существенно увеличивают трудоемкость и нагрузку на персонал».

Что касается статистических расчетов авторов письма. Одной из задач исследования было сокращение потребности в интенсификации сопроводительной терапии в перитрансплантационный период. Эффективность проводимой ИТ оценивалась по отношению к анализируемой группе в целом, а не на этапах перехода из неотложного состояния в критическое, а из критического в летальный исход, когда весь современный реанимационный арсенал методик и оборудования малоэффективен. Как уже упоминалось, цель работы — своевременная коррекция обратимых осложнений, а не революционное усовершенствование ИТ и реанимационного пособия. Очевидно, что по сравнению с группой исторического контроля наиболее опасные для жизни критические состояния развивались значительно реже — 3 (3 %) из 104 vs 10 (15 %) из 67; была ниже летальность — 1 (1 %) из 104 vs 7 (10 %) из 67, что и подтверждает тест Фишера. Таким образом, мы считаем, что комплекс проводимых мероприятий, в т.ч. и оптимизация сопроводительной терапии (своевременная коррекция ИТ «зеленого» и «желтого» уровней соответственно), был эффективен для группы в це-

лом. Конечно, сравниваемые подгруппы, кроме года выполнения ТГСК, отличаются по ряду факторов (диагноз, режимы кондиционирования и т.д.), правда, не в пользу группы больных с оптимизацией сопроводительной терапии. Поэтому после сбора достаточного количества материала мы планируем проанализировать зависимость целевых параметров от факторов воздействия и исходных факторов риска, используя многофакторные модели статистического анализа, тогда роль фактора года выполнения ТГСК будет определена более корректно. Однако, по некоторым уже опубликованным данным, известно, что год выполнения трансплантации имеет самостоятельное значение. Так, рабочей группой Европейского общества по трансплантации костного мозга (ЕВМТ) проведен анализ результатов 640 трансплантаций у больных острыми лейкозами в Западной Европе в 1990–2006 гг. [17]. Отмечен рост безрецидивной выживаемости в группе больных, получивших трансплантацию в период 2003–2006 гг., по сравнению с 1990–2002 гг. за счет сокращения смертности вне рецидива ($p = 0,02$). Таким образом, улучшение результатов ТГСК с годами — общая тенденция, и наш трансплантационный центр не является исключением.

Тем не менее с учетом увеличения количества трансплантационных центров, разницы в опыте и протоколах лечения показатели летальности в связи с трансплантацией могут существенно различаться. Приведенные нами данные из Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation (2009) являются усредненными, составляя, например, 5–10 % при лимфомах. В современных публикациях летальность после аутологических ТКСК (аутоТГСК) при лимфоме Ходжкина (ЛХ) в крупных исследованиях, включающих более 100 наблюдений, составила от 1 до 16 %. Таким образом, показатель ранней посттрансплантационной летальности 1 % не «в 5–10 раз лучше», а находится на уровне «результатов, достигнутых за рубежом» крупными трансплантационными центрами.

Мнение, что исключительно «изменением критериев отбора» пациентов можно сократить летальность в связи с трансплантацией, не выдерживает критики. Ни в одном из доступных нам источников это не показано. Прогнозирование исходов трансплантации — сложный многофакторный процесс, изучение которого продолжается. А предположение о том, что мы способны с 99%-й вероятностью заранее предсказать благоприятный исход ТГСК, отдает оккультизмом. На самом деле все гораздо прозаичнее; отбор пациентов осуществляется с соблюдением стандартных международных рекомендаций и принципов в три последовательных этапа: определение показаний к конкретному виду ТГСК, включая источник ГСК и режим кондиционирования, выявление абсолютных и относительных противопоказаний, включая возрастной ценз для конкретного вида ТГСК, оценка возможности выполнения трансплантации в оптимальные сроки в данном центре с учетом его мощности и технического обеспечения.

В нашем центре проводятся все типы режимов кондиционирования, в качестве источника ГСК используются костный мозг и стволовые клетки периферической крови. В настоящее время нами выполняется два типа ТГСК: аллогенные от полностью совместимого родственного донора (возраст реципиента до 65 лет, миелоаблятивные режимы — до 55 лет) и аутологичные (возраст до 60 лет, для множественной миеломы (ММ) — до 70 лет). Соответственно пациенты, нуждающиеся в проведении трансплантации другого типа (пуповинная кровь, неродственные, неидентичные доноры), перенаправляются в соответствующие российские или зарубежные центры.

Что касается показаний к трансплантации, то отбор пациентов осуществляется в строгом соответствии с рекомендациями ЕВМТ (2006), представленными в табл. 1.

Показания определяются как:

- 1) *стандартные* — трансплантацию признают стандартом ведения больного в случаях, когда результаты ее использования (на указанном этапе болезни у пациентов с указанными факторами риска) превосходят получаемые другими методами лечения. «Стандартные» не означает, что этот вид лечения оптимален у каждого конкретного пациента;
- 2) *клинические* — трансплантация используется в рамках, которые раньше определялись как клинический протокол. Показания этой категории указывают, что трансплантация является возможным методом лечения конкретного пациента, но требуется внимательная оценка и обсуждение с больным ее рисков и преимуществ;
- 3) *исследовательские* — показания классифицируются как исследовательские из-за отсутствия достаточного количества данных, позволяющих оценить ее эффективность при данных клинических ситуациях;
- 4) *не рекомендуется* — трансплантация не показана пациентам с заболеваниями в ранних стадиях, имеющих хороший прогноз при стандартной медикаментозной терапии, и в ситуациях, когда продвинутая стадия болезни или плохой соматический статус пациента делают шанс успеха ТГСК чрезвычайно малым.

Цитата из письма: «Какую альтернативу, например, можно предложить больному с рецидивом В-клеточной крупноклеточной лимфомы и международным прогностическим индексом (IPI), составляющим 3–4 на момент рецидива? Возможно, если такому пациенту будет трансплантировано менее 2×10^6 CD34/кг, он будет иметь несколько больший шанс на длительное восстановление гемопоэза и даже больший шанс погибнуть от токсичности (что, правда, не показано в большинстве исследований). Однако шанс неблагоприятного исхода трансплантации в любом случае будет меньше, чем близкая к 100 % летальность от прогрессирования заболевания на фоне отказа в проведении высокодозной химиотерапии».

Согласно табл. 1, больной с рецидивом В-крупноклеточной лимфомы в случае химиочувствительности опухоли будет являться кандидатом на проведение аутоТГСК независимо от международного прогностического индекса на момент рецидива. В случае рефрактерности рецидива проведение аутоТГСК не рекомендовано. Неизбежный рост посттрансплантационных рисков в этой ситуации в сочетании с отсутствием преимуществ может привести к досрочной гибели больного, что обычно и служит причиной отказа от ТГСК в группе рефрактерных больных с агрессивными

Таблица 1. Показания к проведению трансплантации ГСК у взрослых

Нозология	Фаза болезни	Показания к трансплантации	
		Аллогенная от HLA-идентичного сиблинга	Аутологичная
ОМЛ	ПР1 (низкий риск)	Клинические	Клинические
	ПР1 (промежуточный и высокий риск)	Стандартные	Стандартные
	ПР2	Стандартные	Стандартные
	ПР3, начало рецидива	Стандартные	Не рекомендуется
	М3, молекулярная персистенция	Стандартные	Не рекомендуется
	М3, молекулярный ПР2	Стандартные	Стандартные
	Рецидив или рефрактерность	Клинические	Не рекомендуется
ОЛЛ	ПР1 (высокий риск)	Стандартные	Исследовательские
	ПР2, начало рецидива	Стандартные	Не рекомендуется
	Рецидив или рефрактерность	Клинические	Не рекомендуется
ХМЛ	1-я хроническая фаза	Стандартные	Исследовательские
	Все другие, кроме БК	Стандартные	Исследовательские
	БК	Не рекомендуется	Не рекомендуется
МДС	РА, РАИБ	Стандартные	Клинические
	РАИБ-т, вторичный ОМЛ в ПР1, ПР2	Стандартные	Клинические
	Более продвинутые стадии	Стандартные	Не рекомендуется
ХЛЛ	Плохой прогноз	Стандартные	Клинические
ММ	В любой фазе	Клинические	Стандартные
ЛХ	ПР1	Не рекомендуется	Не рекомендуется
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Исследовательские	Стандартные
	Рефрактерность	Исследовательские	Клинические
Т-клеточные НХЛ	ПР1	Исследовательские	Клинические
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Исследовательские	Клинические
	Рефрактерность	Исследовательские	Не рекомендуется
В-клеточные НХЛ			
Диффузная крупноклеточная	ПР1 (промежуточный/высокий риск)	Не рекомендуется	Клинические
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Исследовательские	Стандартные
	Рефрактерность	Исследовательские	Не рекомендуется
Мантийной зоны	ПР1	Исследовательские	Стандартные
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Исследовательские	Стандартные
	Рефрактерность	Исследовательские	Не рекомендуется
Лимфобластная и Беркитта	ПР1	Исследовательские	Клинические
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Клинические	Стандартные
	Рефрактерность	Исследовательские	Не рекомендуется
Фолликулярная	ПР1 (промежуточный/высокий риск)	Не рекомендуется	Клинические
	ХЧ-рц, ПР2 и более	Клинические	Стандартные
	Рефрактерность	Исследовательские	Не рекомендуется

Сокращения: БК — бластный криз; НХЛ — неходжкинские лимфомы; ПР — полная ремиссия; ХЧ-рц — химиочувствительный рецидив.

Таблица 2. Индекс сопутствующих заболеваний при трансплантации ТГСК

Сопутствующая патология	Определение	Баллы
Аритмия	Фибрилляция или трепетание предсердий, синдром слабости синусового узла или желудочковые аритмии	1
Сердечно-сосудистые заболевания	Ишемическая болезнь сердца, застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, ФВ $\leq 50\%$	1
Воспалительные заболевания кишечника	Болезнь Крона или язвенный колит	1
Диабет	Необходимо назначение инсулина или пероральных гипогликемических препаратов, не контролируется диетой	1
Цереброваскулярные заболевания	Транзиторные ишемические атаки или инсульт в анамнезе	1
Нарушения психики	Депрессия/тревожность, требующие консультации психиатра и/или лечения в момент проведения ТГСК	1
Печень — легкие нарушения	Хронический гепатит: билирубин $> 1,5$ нормы	1
Ожирение	ИМТ $> 35\%$ у взрослых	1
Инфекция	Документированная инфекция или лихорадка неясной этиологии, требующая антимикробной терапии до, во время и после начала кондиционирования	1
Ревматологические заболевания	Системная красная волчанка, ревматоидный артрит, полимиозит, ревматическая полимиалгия	2
Пептическая язва	Требующая лечения	2
Почки — средние/тяжелые нарушения	Креатинин > 175 мкмоль/л, гемодиализ или трансплантация почки в анамнезе	2
Легкие — умеренные нарушения	Объем форсированного выдоха в 1-ю секунду $66\text{--}80\%$ или диспноэ при легкой нагрузке	2
Солитарные опухоли в анамнезе	Независимо от времени, прошедшего с момента лечения, за исключением немеланомного рака кожи	3
Поражения клапанов сердца	За исключением бессимптомного пролапса митрального клапана	3
Серьезные легочные изменения	Или объем форсированного выдоха в 1-ю секунду $< 65\%$ или диспноэ в покое	3
Печень — средние/тяжелые нарушения	Цирроз печени: билирубин $> 1,5$ нормы или АСТ, АЛТ $> 1,5$ нормы	3
Подсчет баллов		...

НХЛ. Заготовка достаточного количества гемопоэтического материала для трансплантации относится к техническим аспектам выполнения ТГСК и проблемой, ограничивающей выполнение высокодозного лечения, обычно не является. В отдельных случаях, когда никакими способами невозможно получить ГСК в количестве, достаточном для трансплантации, рассматривается вопрос о проведении аллогенной ТГСК (аллоТГСК) от совместимого донора [18].

К сожалению, в России пациент попадает в трансплантационный центр не всегда своевременно. Зачастую к трансплантологу направляют для проведения «терапии спасения», т. е. тогда, когда все другие возможности испробованы и исчерпаны (включая 3 линии химиотерапии и более, лучевую терапию), — 51 % больных в нашем исследовании [2]. Это приводит к тому, что для ТГСК селектируются пациенты с заведомо плохим прогнозом. Так, например, при ЛХ по сравнению с зарубежными данными мы намного чаще проводим трансплантацию у больных, имеющих факторы плохого прогноза для отдаленных результатов ТГСК. Даже если учитывать только три прогностических фактора перед ТГСК при ЛХ (экстра nodальное поражение, В-симптомы в рецидиве и объем опухоли на момент ТГСК), то доля пациентов с тремя факторами существенно выше в нашей группе по сравнению с данными литературы (34 vs 5 %), а без факторов — значительно ниже (11 vs 39 %) [19].

Как указано в статье, доля рефрактерных пациентов в нашем центре с годами не уменьшается (в 2005 г. — 33 %, в 2007–2009 гг. — 35 % всех аутоТГСК). Нам, как и многим другим, приходится работать с этим контингентом больных при наличии хотя бы минимального шанса на успех. Например, мы выполняем аутоТГСК при рефрактерных (в т. ч. в фазе прогрессирования) ЛХ, ММ (см. табл. 1). Как вы справедливо заметили, а «какая альтернатива»?

Противопоказания к проведению ТГСК в нашем центре, как и показания, также основаны на стандартных международных рекомендациях. Критерии пригодности к проведению высокодозной терапии с ТГСК следующие: удовлетворительный соматический статус (индекс Карновского более 40 %), клиренс креатинина более 50 мл/мин, фракция выброса (ФВ) левого желудочка более 40 %, объем форсированного выдоха за 1-ю секунду должен превышать 55 %, биохимические показатели (билирубин, трансаминазы) должны не более чем вдвое превышать нормальный уро-

вень. Дополнительным параметром может служить индекс массы тела (ИМТ, 95–145 % от «идеальной» массы). Перед трансплантацией проводится санация имеющихся очагов хронической инфекции.

При определении трансплантационных рисков нами используется также расчетный индекс сопутствующих заболеваний (модифицировано из Sorror и соавт., 2005), который влияет на прогноз посттрансплантационной летальности и общей выживаемости (табл. 2).

Так, например, по данным литературы известно, что при проведении аллоТГСК при количестве баллов 0, 1–2 и 3 и более летальность вне связи с рецидивом на 2 года составляет 14, 21 и 41 % соответственно. Общая выживаемость на 2 года будет равняться 71, 60 и 34 % соответственно [20].

В анализируемую нами группу входили пациенты с различными сопутствующими заболеваниями, каждый четвертый имел клинически значимую патологию (ишемическая болезнь сердца, нарушения ритма, нарушения психики, инфекции, солидные опухоли в анамнезе, нарушения со стороны печени и почек и др.). Соответственно индексу сопутствующих заболеваний (см. табл. 2) 1–2 балла имели 20 % пациентов в группе, а 3 балла и более — 6 %. Отсрочка потребовалась в 16 случаях (8 — инвазивные микозы, 7 — активный вирусный гепатит, 1 — активный туберкулез), причем у 6 больных ТГСК не выполнена до сих пор, пациенты получают альтернативную терапию. Как известно, «благо-разумный видит беду и укрывается, а неопытные идут вперед и наказываются» (Соломон Мудрый, 1010–932 гг. до н. э.). Окончательное решение о проведении ТГСК принимается индивидуально после анализа всех рисков и потенциальных преимуществ ТГСК и получения информированного согласия пациента на трансплантацию. Выбор каждого конкретного центра, безусловно, может отличаться.

В случае, если пациент оценен нами как кандидат на трансплантацию (наличие показаний, отсутствие противопоказаний), выполняемую в нашем центре, рассматривается техническая возможность своевременного проведения ТГСК. Ввиду малочисленности российских трансплантационных центров (всего 17, из них аллоТГСК — менее 10, тогда как, например, в Германии — 106) неизбежно, что потребность в ТГСК обеспечивается далеко не в 100 % случаев. Наш центр загружен и работает на полную мощность (порядка 40 ТГСК в год).

Очередность определяется прежде всего медицинскими показаниями, приоритет имеют больные:

- с показаниями к проведению режима подготовки, содержащего тотальное терапевтическое облучение тела (наш центр — единственный в России, выполняющий этот тип кондиционирования);
- с острыми лейкозами, для которых минимальная отсрочка может стать фатальной;
- со стандартными показаниями, при которых преимущества от выполнения ТГСК на данном этапе лечения максимальны.

Во всех остальных случаях при длительной очереди пациенту может быть предложена альтернатива перенаправления в другой трансплантационный центр, в т. ч. с качественным гемопоэтическим материалом, заготовленным в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Отбор больных — первый ответственный шаг к проведению ТГСК. Возможность выполнения трансплантации обеспечивают врачи разных специальностей, от эффективности взаимодействия которых во многом зависит успех лечения. Разработка и внедрение правил градации интенсивности наблюдения и сопроводительной терапии на основании формальных критериев оценки витальных функций больного дают возможность привлекать консультантов смежных специальностей на ранних этапах возникновения потенциально обратимых осложнений. А своевременное вмешательство врача-реаниматолога позволяет в большинстве случаев не допустить прогрессирующего утяжеления состояния больного и его смерти от предотвратимых причин [2]. Предложенный нами принцип взаимодействия основан на международной практике и значительном собственном опыте проведения высокодозной химиотерапии (как с поддержкой ГСК, так и без нее) и, соответственно, может представлять практический интерес для всех специалистов, работающих в интенсивной гематологии. Нами были предприняты первые шаги на пути организации взаимодействия ключевых специалистов в интенсивной гематологии. Надеемся также, что развитие и распространение принципов указанного взаимодействия будет способствовать интенсификации лечебных программ в отделениях гематологии.

Что касается других «утверждений, противоречащих не только общепринятым критериям, но и логике», то мы можем представить разъяснения, подробную информацию, а также теоретическое и практическое обоснование каждого тезиса, изложенного в нашей статье. Наш адрес есть в редакции.

Мы готовы к обсуждению и будем рады любым конструктивным замечаниям и предложениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков Н.В., Курмуков И.А. Письмо редактору. Клин. онкогем. 2010; 1: 7–59.
2. Абдусаламов С.Н., Мелкова К.Н. и др. Градация интенсивности и подходы к оптимизации сопроводительной терапии при трансплантации костного мозга. Клин. онкогематол. 2009; 4: 334–42.
3. Интенсивная терапия. Национальное руководство, в 2-х томах. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 431–5.
4. Rice T.W., Wheeler A.P., Bernard G.R. et al. Comparison of the SpO₂/FiO₂ ratio and the PaO₂/FiO₂ ratio in Patients With Acute Lung Injury or ARDS. Chest 2007; 132: 410–7.
5. Bellomo R., Ronco C., Kellum J.A. et al. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure — definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit. Care 2004; 8: 204–12.
6. Интенсивная терапия. Национальное руководство, в 2-х томах. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 856–85.
7. Гажева А.В., Кожевников В.В., Назаров В.И. и др. Инфекционная безопасность в медицинских учреждениях. Руководство для медицинских работников. М.: ФГУ «ЦНИИ организации и информатизации здравоохранения Росздрав», 2005: 70.
8. Pittet D., Higonnet S., Hiirbarth S. et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Lancet 2000; 356: 1307–12.
9. Tibbals J. Teaching hospital medical staff to handwash. Med. J. Aust. 1996; 164: 395–8.
10. Dorsey S.T., Cydulka R.K., Emerman C.L. Is handwashing teachable? Failure to improve handwashing behavior in an urban emergency department. Acad. Emerg. Med. 1996; 3: 360–5.
11. Watanakunakorn C., Wang C., Hazy J. An observational study of hand washing and infection control practices by healthcare workers. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1998; 19: 858–60.
12. Avila-Agiero M.L., Umaña M.A., Jimenez A.L. et al. Handwashing practices in a tertiary-care, pediatric hospital and the effect on an educational program. Clin. Perform. Qual. Health Care 1998; 6: 70–2.
13. Kirdand K.B., Weinstein J.M. Adverse effects of contact isolation. Lancet 1999; 354: 1177–8.
14. Maury E., Alzieu M., Baudel J.L. et al. Availability of an alcohol solution can improve hand disinfection compliance in an intensive care unit. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 162: 324–7.
15. Muto C.A., Sistrom M.G., Farr B.M. Hand hygiene rates unaffected by installation of dispensers of a rapidly acting hand antiseptic. Am. J. Infect. Control 2000; 28: 273–6.
16. Pittet D., Mourouga P., Perneger T.V. et al. Members of the Infection Control Program. Compliance with handwashing in a teaching hospital. Ann. Intern. Med. 1999; 130: 126–30.
17. Абдусаламов С.Н., Мелкова К.Н. и др. Профилактические режимы ведения больных и подходы к оптимизации сопроводительной терапии при трансплантации костного мозга. Клин. онкогематол. 2010; 1: 21–9.
18. EBMT 2008. Bone Marrow Transplant. 2008; 41(1): S103.
19. Munker R., Lasarus H.M., Atkinson K. The BMT Data Book, 2nd edn. Cambridge University Press, 2009: 119.
20. Horning S., Chao N., Negrin R. et al. High-Dose Therapy and Autologous Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation for Recurrent or Refractory Hodgkin's Disease: Analysis of the Stanford University Results and Prognostic Indices. Blood 1997; 89: 801–13.
21. Munker R., Lasarus H.M., Atkinson K. The BMT Data Book, 2nd edn. Cambridge University Press, 2009: 239.

Анализ выживаемости или событийный анализ:
типовые ошибки ретроспективного метода

С.М. Куликов, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

**Survival or time-to-event analysis:
common pitfalls of retrospective
approach**

S.M. Kulikov, E.N. Parovitchnikova, V.G. Savchenko

SUMMARY

Retrospective analysis of the archival clinical data collected outside the controlled trials is the main source of false conclusions due to data manipulation. This flawed method produces common errors especially in case if life duration is used as an endpoint in survival analysis. It is pointed out that the mixing of searching and/or descriptive-promoting goals with the evidence aimed conclusions is incorrect and should be avoided. The main feature of evidence based study is the fact that the design of the study, inclusion/-exclusion criteria, recruitment time and analysis plan are developed and exist before the experimental data will appear.

Special modeling program was written to generate the data and to simulate wrong procedures of data manipulation and analysis. In the paper the examples of late post factum selection of patients are demonstrated and the resulting bias of estimates is discussed.

The main conclusion is that retrospective time to event analysis of the passively collected data is not free of mistakes. Such type of the study and analysis should be used with limitation in discovering and descriptive studies.

Keywords

hematology, clinical trial, time-to-event analysis, survival analysis, overall survival, event-free survival, censoring, endpoints.

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Контакты: kulikov@blood.ru

Принято в печать: 4 июня 2010 г.

РЕФЕРАТ

В статье обсуждаются недостатки исследовательских работ, основанных на ретроспективном анализе архивных клинических данных, собранных вне контролируемых планируемых клинических исследований. Описывается ряд методологических ошибок обработки и анализа данных, когда в исследовании основной конечной точкой (целевым критерием) является продолжительность жизни больного. Обосновывается некорректность совмещения поисковых методов и рекламно-описательных целей с доказательными выводами. В работе утверждается, что обязательной частью доказательных научно-медицинских исследований служит планирование и проспективность, для которых характерно то, что задачи и план исследования существуют до появления любых экспериментальных данных.

В работе приводятся примеры явной и неявной «постфактум» селекции данных и демонстрируются последствия такой обработки информации. Для того чтобы проиллюстрировать статью, были написаны специальные программы для генерации данных и моделирования типовых ошибок процедур ретроспективного событийного анализа.

Основной вывод данной статьи заключается в том, что ретроспективный событийный анализ (анализ выживаемости) пассивно собранных данных не свободен от ошибок, поэтому сфера его применения должна быть очень строго ограничена поисковыми и рекламно-описательными задачами.

Ключевые слова

гематология, клинические исследования, событийный анализ, анализ выживаемости, общая выживаемость, безрецидивная выживаемость, цензурирование, конечные точки.

ВВЕДЕНИЕ

С начала эры современной и прецизионной химиотерапии основным показателем эффективности лечения гемобластозов считался процент достигаемых полных ремиссий и их продолжительность. Но чем большему числу больных удавалось сохранить жизнь в результате совершенствования терапии, тем более очевидным становился тот факт, что эти параметры следует рассматривать как промежуточные, а основной целью противоопухолевого воздействия является увеличение

продолжительности жизни больного. Если ранее публикации ограничивались простыми процентными показателями, то в настоящее время во всех статьях, посвященных эффективности лечения гемобластозов, представлены результаты современного статистического анализа данных, иллюстрированные графиками с кривыми выживаемости Каплана—Мейера. Формальное и необдуманное использование строгих и правильных самих по себе процедур анализа может приводить к сомнительным или смещенным результатам. Ведь суть в том, что, к сожалению, методо-

логическая основа многих клинических работ изменилась за эти годы очень мало. В основном, это публикации-отчеты: вот так мы у себя лечим больных. Формально говоря, приводится ретроспективный анализ архивных данных за определенный период.

В целом статистический анализ экспериментальных данных может преследовать три кардинально различающиеся цели: 1) поисковая (например, поиск факторов риска, влияющих на выживаемость); 2) описательно-рекламная (например, оценка выживаемости по историческим данным); 3) доказательная (примером может служить анализ данных сравнительных проспективных клинических исследований).

В этой работе мы попытаемся продемонстрировать последствия подмены одной цели другой, когда ретроспективные исследования описательно-рекламного характера выдаются за доказательные. Особенно сильно такая подмена сказывается, когда в исследовании основной конечной точкой (целевым критерием) является продолжительность жизни больного.

Обязательная часть доказательных научно-медицинских исследований — планирование и проспективность. Для доказательных исследований характерно то, что задачи исследования, план (дизайн) проведения, даже план статистического анализа разрабатываются и существуют ДО (!) появления любых экспериментальных данных. Статистический анализ не может быть доказательным, если он базируется на данных, уже использованных в поисковых или описательно-рекламных целях. Это не недостаток статистического анализа, это методологическая ошибка проводящего анализ исследователя.

В настоящее время достаточно качественных учебных материалов по биостатистике, и в частности по анализу выживаемости [1, 2]. Конечно, совершенно очевидно, что для получения надежных клинических выводов необходимо использовать качественный программный статистический инструментарий, но это далеко не достаточное условие. В этой статье мы постараемся показать, от чего зависит достоверность заключений, сделанных на основе событийного анализа. В частности, мы продемонстрируем, к чему приводит расширенное и вольное толкование результатов ретроспективного анализа выживаемости.

Кроме того, необходимо подчеркнуть, что если экспериментальный материал собран неверно (вследствие неправильно спланированного исследования, селекции, отсутствия контроля и др.), то даже результаты правильного статистического анализа, выполненного с помощью качественных программ, не могут быть названы доказательными.

МЕТОДЫ

В статье рассматриваются типичные ошибки, встречающиеся в научной медицинской литературе, когда используются методы событийного анализа, в частности в онкогематологии. Хотя нетрудно найти конкретные примеры из реальных работ, мы не стали этого делать из этических соображений. Чтобы проиллюстрировать статью, были написаны специальные программы для генерации данных и моделирования ошибочных процедур. Программа генерирует случайным образом выборку данных, похожих на реальные. Далее эти данные подвергаются обработке и анализу, содержащему типичные ошибки. Выходные результаты такого рода анализа иллюстрируются графиками. Схожесть полученных графиков с рисунками из реальных статей намеренная и неслучайная. Модельная симуляция удобна и полезна тем, что мы знаем истинные характеристики выживаемости, такие как медиана продолжительности жизни или уровень выживае-

мости на определенный момент, т. к. они заложены в модель. Поэтому можно сравнить оценки, полученные по выборке используемым некорректным методом анализа, и истинные.

Программы модельной генерации и обработки данных написаны на макроязыке статистического пакета SAS [3]. Типичное распределение продолжительности жизни онкогематологических больных хорошо описывается распределением, являющимся смесью двух экспоненциальных распределений [4]. Это значит, что группы исследуемых пациентов обычно гетерогенны и состоят по крайней мере из двух субпопуляций с разной прогнозируемой продолжительностью жизни. Визуально это реализуется в характерной форме кривой выживаемости. Она обычно состоит из двух участков: относительно крутого начального участка и более пологого участка, так называемого плато. Данная математико-статистическая модель и положена в основу симуляционной программы. Распределение точек цензурирования моделировалось как равномерное на отрезке времени наблюдения. Это соответствует равномерному по времени включению больных в исследование. В примере с активным/пассивным наблюдением за жизненным статусом больных генерировалось случайное «пропадание» информации о статусе больного в период после выписки из стационара.

ЧТО ТАКОЕ СОБЫТИЙНЫЙ АНАЛИЗ?

В классической биостатистике есть раздел «Анализ выживаемости» (англ. «Survival Analysis») [2]. Цель этого анализа — получить статистические характеристики времени: от какого-то определенного момента до наступления некоторого события (обычно это смерть). Отсюда и название. Основная отличительная черта анализа выживаемости как статистического метода заключается в том, что часть данных, представляемых для анализа, известна неточно. Например, о времени до события (смерти) для части объектов исследования известно лишь то, что оно не меньше некоторой величины. Эти больные либо еще живы на момент анализа, либо умерли, либо вышли из-под наблюдения, поэтому у них неизвестно время наступления события и нет информации, было ли событие вообще. В этих ситуациях объекты (пациенты) цензурируются на момент времени, когда о них было известно, что они живы. Цензурирование — это регистрация факта того, что исследуемое событие еще не наступило к моменту проведения анализа или последнего контакта с больным.

Как метод анализ выживаемости за последние 50 лет существенно обогатился новыми теоретическими статистическими моделями, задачами и вычислительными процедурами. И сейчас при решении конкретных медицинских прикладных задач выясняется, что измерения типа «время до изменения состояния объекта» встречаются значительно чаще, чем просто «время жизни». Значит, и сфера применения анализа выживаемости значительно шире, чем классического анализа данных о выживаемости. Например, такие события, как ремиссия, рецидив, осложнение и инфицирование, вполне могут быть подвергнуты статистическому анализу с использованием процедур анализа выживаемости.

Для того чтобы терминологически разделить метод и его приложение, вводится понятие «событийный анализ» (англоязычный аналог «time to event analysis» дословно переводится как «анализ времени до события»).

Событийный анализ — это статистический анализ, в котором исследуется время события, необязательно являющееся временем жизни объекта. По совокупности математико-статистических методов это классический анализ выживаемости. Слово «выживаемости» заменено на «событийный» для расширения сферы приложения.

СОБЫТИЯ

События — наиболее распространенные параметры изучения в медицине, демографии, социологии, основной из них — летальный исход. Конечность жизни человека, гетерогенность человеческой популяции, ограниченность времени клинических испытаний заставляют исследователей обращаться к изучению других событий в качестве целевых параметров исследования.

События, в отличие от других типов данных, записываются в виде пары значений: индикатор события и время. Индикатор события показывает, произошло ли событие за время исследования. Время — это промежуток времени от начала отсчета до события, если оно произошло, или до конца наблюдения за объектом, если оно не произошло.

Данные, собранные в виде временных рядов (например, температурный лист), часто можно редуцировать в данные типа события. Это оправдывается экономией объема собираемой и хранимой информации, обусловлено удобством анализа данных и их интерпретации. Редукция временного ряда до события может быть сделана, если исследователя интересует момент первого резкого изменения измеряемого параметра, которое и интерпретируется как событие или изменение статуса объекта. Например, динамическое измерение температуры тела может использоваться для обнаружения момента возникновения лихорадки, которая может быть вероятностно связана с другими событиями или результатами лечения. Если число регистрируемых осложнений велико, значителен объем другой собираемой информации, то запись, хранение и анализ всего температурного листа становятся избыточными. В этом случае информация о температурной динамике может быть сжата до двух чисел, описывающих событие «начало лихорадки».

РЕГИСТРАЦИЯ ВРЕМЕНИ НАСТУПЛЕНИЯ СОБЫТИЯ.
ТОЧНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ ВРЕМЕНИ

Когда за объектом ведется непрерывное наблюдение, нет проблем с регистрацией времени наступления события. В этом случае время до наступления события измеряется с точностью, определяемой точностью записи в протоколе исследования, истории болезни и т. п. Например, время смерти известно обычно с точностью до дня (т. е. дата смерти). Есть, однако, события (например, рецидив заболевания), время (дата) наступления которого существенно зависит от периодичности измерения неких параметров, по их значению можно судить, наступило ли это событие или нет, от субъективности критериев оценки события и от объективности эксперта в оценке этих критериев. Точность измерения времени события может и должна учитываться при анализе. Периодичность измерения параметров, определяющих событие, должна быть по возможности одинаковой для изучаемых объектов и не изменяться за время наблюдения. Например, анализ крови для пациентов, включенных в исследование, должен выполняться регулярно и с одинаковой частотой, если по нему предполагается судить о наступлении ремиссии или рецидива. Фактически, когда регистрация события совершается эпизодически, мы всегда имеем дело не с точной фиксацией времени события, а с интервальным цензурированием.

ЦЕНЗУРИРОВАНИЕ

Говоря математическим языком, точка цензурирования — это левая граница временного интервала вероятного наступления случая, т. е. это последний момент времени, для которого точно известно, что исследуемое событие еще не

произошло. Самая распространенная ситуация — это цензурирование текущей датой (сегодняшним днем). Когда у объекта событие еще не произошло и это известно точно, то продолжительность жизни для этого объекта рассчитывается как разница между текущей датой и датой начала исследования, в этом случае наблюдение считается цензурированным. Продолжительность жизни для объекта, у которого произошло событие (смерть), рассчитывается как разница между известной датой события (смерти) и датой начала исследования, и тогда наблюдение считается случаем. Существуют ситуации, когда исследуемое событие не происходит по причине наступления другого конкурирующего события.

Примеры цензурирования, вызванного конкурирующим событием, и связанные с этим ошибки событийного анализа.

1. Старое цензурирование. Точкой цензурирования во многих исследованиях является дата последнего контакта с пациентом. Если больной вышел из-под наблюдения или поддерживает очень редкие контакты с исследователями, при этом последний контакт был давно, то это с большой вероятностью свидетельствует о низкой активности в отслеживании статуса больного. Такое, не очень тщательное наблюдение, отличающееся относительно редкими контактами с пациентом, — одна из самых распространенных причин вероятного смещения оценок выживаемости в сторону их улучшения.

2. Смерть как цензурирование. При оценке вероятности сохранения ремиссии или вероятности развития рецидива длительность ремиссии у больных, умерших в полной ремиссии, цензурируется датой смерти. Здесь очень часто могут возникать так называемые ошибки пропуска, НЕрегистрации целевого события (рецидива), когда случай-событие (рецидив) и случай-цензурирование (смерть) следуют один за другим в коротком временном интервале. Так, момент рецидива просто может быть пропущен ввиду относительной редкости лабораторных измерений. В этом случае возможна недооценка вероятности наступления рецидива, т. к. фактически точка события ошибочно рассматривается как точка цензурирования.

3. Резистентность как событие и как цензурирование. Недостижение полной ремиссии или эффекта терапии, т. е. резистентность, вообще сложно трактовать как событие, независимо от того, фигурирует ли оно в списке конечных точек (бессобытийная выживаемость) или является точкой цензурирования в оценке вероятности ответа на терапию. Если резистентность оценивается косвенно, как длительное ожидание ответа или отсутствие ответа на терапию к какому-то определенному моменту времени, это вообще не событие. В этом случае резистентность — это состояние, и регистрация этого состояния — это не объективное, а субъективное событие, т. е. принятое врачом-исследователем решение о смене терапии. В любом случае момент возникновения этого состояния неизвестен и отличается от времени регистрации этого состояния. При анализе резистентности как события необходима осторожность и четкость дефиниций, при этом точность времени ее регистрации может быть высокой при достаточной частоте измерений объективных лабораторных индикаторов резистентности.

4. Выполнение трансплантации костного мозга как конечное постоянное цензурирование. Это один из очень эффективных способов изменить показатели выживаемости у исследуемой когорты больных в сторону значительного их увеличения, поскольку все последующие за процедурой события уже не будут регистрироваться.

КТО, КАК И ЗАЧЕМ СТРОИТ КРИВЫЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ?

Строго говоря, кривая выживаемости — это график математической функции. Эта функция характеризует вероятность того, что событие не произойдет до указанного времени. Если событие — летальный исход, то вертикальная координата точки на кривой выживаемости — это численное значение **вероятности** объекта дожить до момента времени, соответствующего горизонтальной координате этой точки. То, что мы видим в статьях и презентациях, — это экспериментальная **оценка** этой математической функции, полученной в результате анализа данных о продолжительности жизни группы исследуемых пациентов. Эта оценка сделана с некоторой точностью. Точность оценки функции выживаемости зависит от количества объектов, по которым вычислена эта статистика, и процентного соотношения числа пациентов с известной продолжительностью (умерших) и цензурированных пациентов (живых). Чем больше в процентном соотношении в исследуемой группе умерших больных, тем точнее оценка.

Оценки выживаемости, полученные по 10–20 пациентам при 1–5 числе случаев, очень неточны и имеют незначительную научную и практическую ценность. Нередко можно видеть даже в крупнейших международных журналах кривые выживаемости, построенные для двух или трех больных. Такой метод представления данных методически некорректен и бессодержателен.

Важно понимать также, что основное предназначение событийного анализа вообще и кривых выживаемости в частности — сравнительный анализ, например сравнение результатов лечения больных по разным протоколам или сравнение результатов лечения разных вариантов одного заболевания. Использование кривых выживаемости для индивидуального прогноза продолжительности жизни крайне неоднозначно и должно применяться с осторожностью.

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ КАК ОСНОВА «МЕМУАРНОЙ СТАТИСТИКИ»

Отчеты о ретроспективных исследованиях еще пока очень распространены в научной литературе. Использование событийного анализа в таких работах наиболее подвержено риску получения ненадежных и смещенных результатов и, как следствие, риску ошибочного толкования. Две главные причины этих ошибок — это селекция объектов исследования задним числом и неоднородность условий наблюдения за больным в течение исследования.

Формально говоря, любой статистический анализ ретроспективен, т. к. проводится на данных, уже полученных. Но характер исследования и способ сбора экспериментального материала могут быть как ретроспективными, так и проспективными. В чем же заключается главное, существенное, отличие проспективного метода от ретроспективного? Оно не в правилах формирования целей, задач и планов, а в том, что в проспективном исследовании экспериментальных данных попросту НЕТ на момент формулирования цели, а главное, выборка объектов (пациентов) формируется ДО появления результатов воздействия на объекты, т. е. результатов лечения больных. В этом смысле проспективные исследования являются слепыми по отношению к будущим результатам, следовательно, свободными от осознанных или неосознанных манипуляций с данными и селекции объектов.

Особенно сильно искажение истинных результатов происходит при выполнении **ретроспективного** событийного анализа. Когда исследователь анализирует свой архивный

материал, свои «клинические мемуары», он формирует выборку и группы сравнения, уже зная исходы, конечные точки пациентов. Избежать субъективности при этом очень сложно.

Например, сформулирована задача: оценить выживаемость пациентов с конкретным заболеванием, лечение которым было проведено в определенной клинике за какой-то определенный период, скажем, за 10 лет, и сравнить ее либо с литературными данными, либо с данными какой-то контрольной выборки. Естественно, конечной целью, даже если она и не сформулирована, является демонстрация высокой эффективности терапии в указанной клинике в отчетный период. Даже искреннего и честного исследователя подстерегают минимум три типа ошибок, приводящих к смещенным статистическим оценкам характеристик выживаемости и связанным с этим выводам.

Ошибка номер один. Это последовательный, пошаговый анализ, выполняемый путем последовательной оптимизации критериев включения. На первом этапе строится кривая выживаемости по всем пациентам, госпитализированным в клинику за 10 лет. Затем смотрят на «ступеньки» — события. Врач чаще всего помнит поименно больных, с которым связана конкретная «ступенька» (смерть) на кривой выживания. Замечает, например, что многие из них — это пациенты, лечение которым уже было начато на этапе до госпитализации в конкретную клинику. Вот вам и готовый первый пункт в критериях селекции — предшествующее лечение. Как правило, список потенциальных причин для не включения больных в анализ достаточно широк. Выбор всегда есть: неточно доказанный диагноз, низкая эффективность предшествующего воздействия, неблагоприятный социальный статус, сопутствующие тяжелые заболевания и т. д. Тот факт, что критерии включения формируются не до, а после получения данных и зависят от них, — грубейшая ошибка анализа.

Ошибка номер два. Когда возможности селекции задним числом исчерпаны или исследователь хочет выглядеть честным, он пытается рассортировать пациентов с целью выделить подгруппы с относительно удачными результатами лечения. При этом происходит подмена анализа или поиска факторов риска категоризацией, т. е. разбиением на группы и «открытием» новых нозологий. Один известный врач, глядя на кривую выживаемости, сказал, что все неудачи должны быть тщательно проанализированы. Если результатом такого «тщательного» анализа задним числом будет «уточнение» диагноза у больных с неудачным исходом лечения, то в следующих презентациях кривая выживаемости для этой группы, конечно, будет выглядеть значительно лучше, поскольку больные с «уточненным диагнозом» будут просто исключены из анализа.

Как поступить по-другому? Можно разделить всю группу на две: с удачами и неудачами лечения; «покопаться» и найти признаки, которые дифференцируют эти подгруппы лучше всего. В принципе это нормальная поисковая эвристическая процедура. Но в корректной научной методологии это всего лишь метод генерации гипотезы, которая в дальнейшем должна быть подтверждена на независимой группе пациентов в ходе нового проспективного исследования. В распространенной практике «мемуарного» статистического анализа этим этапом пренебрегают: **что нашел, то и доказал.**

На рис. 1 приведен смоделированный пример такой ситуации. Параметры модели подобраны таким образом, что 5-летняя общая выживаемость составляет 50 %. На рис. 1, А представлена истинная кривая (кривая 2) и кривая выживаемости, построенная по случайно сге-

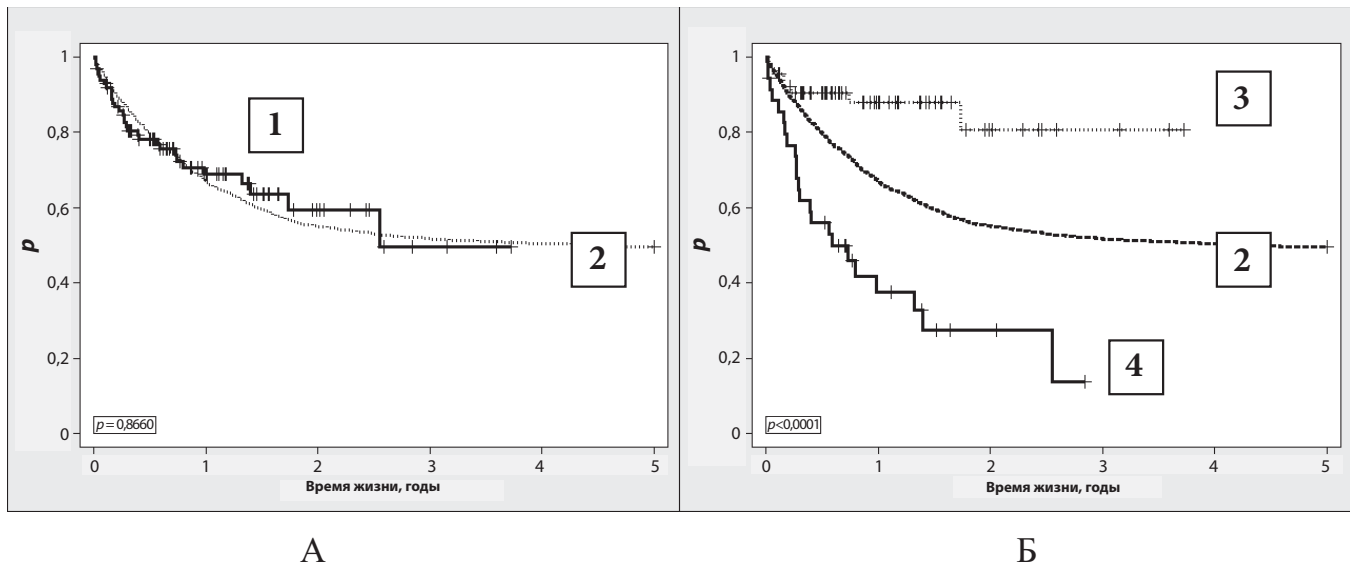


Рис. 1. Результат ретроспективной категоризации группы больных (модельная симуляция):

А — выживаемость в общей группе больных; Б — выживаемость после разбиения на подгруппы; кривая 1 — оценка общей выживаемости по всей группе из 100 больных; кривая 2 — истинная выживаемость; кривая 3 — оценка общей выживаемости 65 больных, отобранных после «анализа неудач» в подгруппу 1-й категории (удачная терапия); кривая 4 — оценка общей выживаемости 35 больных, отобранных в группу 2-й категории (неудачная терапия)

нерированным данным о продолжительности жизни для 100 больных (кривая 1). Предполагается, что исследователь поработал с данными и постфактум разделил выборку на две категории с целью выделить подгруппы больных, удачно и неудачно пролеченных. При этом исследователь, естественно, не был «слеп» и знал конечные результаты терапии всех больных. Поэтому умерших пациентов (случаи) с большей вероятностью (80 %) он относил в первую категорию, а с вероятностью 20 % — во вторую, живых больных он с большей вероятностью (80 %) относил во вторую категорию, а с меньшей (20 %) — в первую. Компьютерная программа смоделировала эту сортировку и разделила группу на две подгруппы в соответствии с этим правилом, в группу «удачная терапия» попало 65 пациентов, в группу «неудачная терапия» — 35. Затем было проведено обычное сравнение оценок выживаемости в этих подгруппах, как будто бы мы имеем дело с обычным классифицирующим фактором. В результате получились кривые выживаемости, изображенные на рис. 1, Б, где выделены две категории: «удачная терапия» (кривая 3) и «неудачная терапия» (кривая 4).

Как видно на рис. 1, выживаемость больных из группы «удачной терапии» (первая категория) составила около 80 % при истинной 50 %. Приведенный анализ — пример исследовательского лукавства или, если хотите, лжи, когда больные с плохой эффективностью исследуемого метода лечения исключаются из общей анализируемой популяции (мол, если у них не получен эффект, значит, болезнь у них другая), а вывод об эффективности исследуемого метода лечения делается на основании выживаемости больных из группы «удачной терапии».

Ошибка номер три. Пассивный мониторинг статуса пациента. Очевидно, что наблюдение за больным во время госпитализации и после нее существенно отличается. Строго говоря, событийный анализ может и должен распространяться только на тот отрезок времени, в течение которого не изменяются условия получения информации о статусе пациента. После выписки из стационара, во-первых, сильно изменяется временной регламент получения информации о жизненном статусе больного: информация поступает значительно реже. Интервал между контактами с пациентом или его родственниками может достигать многих меся-

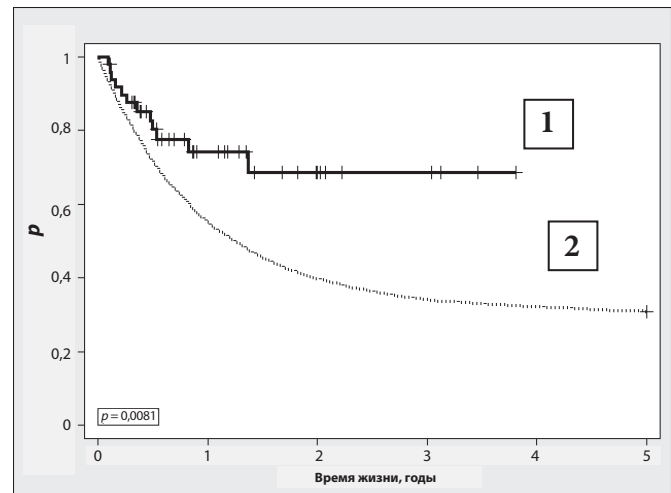


Рис. 2. Результат ретроспективного анализа общей выживаемости больных, у которых есть фазы активного и пассивного наблюдения за жизненным статусом (модельная симуляция):

1 — общая выживаемость 100 больных в условиях вероятной потери информации о летальных исходах; 2 — истинная выживаемость при постоянном эффективном наблюдении

цев. Во-вторых, если не проводится специального клинического исследования, после выписки активное наблюдение за статусом больного часто просто прекращается. При этом существует вероятность, что информация о конечной точке (смерти больного) не доходит до врача и больной в информационной базе остается «вечно живым» на момент последнего контакта. Чем выше вероятность потери информации о смерти, тем, естественно, больше смещение оценки выживаемости.

На рис. 2 приведен модельный пример такой ситуации. В модели предполагается, что истинная 4-летняя выживаемость у данной популяции больных составляет 32 %. Если предположить, что активное наблюдение за больным осуществляют только в течение 4 мес., после которых информация о смерти пациента не приходит (случайно) в среднем в 50 % случаев, то в результате моделирования указанной ситуации 4-летняя выживаемость, полученная в условиях вероятной потери информации о летальных исходах, будет сильно завышена (68 %).

ЗАМЕНИТЕЛИ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ

Общая выживаемость считается основным критерием эффективности в клинических исследованиях в онкологии и гематологии [5, 6]. Однако ввиду ограниченности времени наблюдения в клинических исследованиях для увеличения вероятности наступления событий в рассмотрение вводят другие конечные точки, которые можно считать аналогами или заменителями (англ. *surrogates*) общей выживаемости.

Характеристики ответа на терапию, такие как ремиссия или потеря ответа (рецидив), часто применяют в качестве дополнительных или вторичных точек. При их использовании в качестве критериев эффективности главной проблемой становится вопрос об их корреляции с отдаленными результатами — общей выживаемостью.

Много методологических трудностей и ошибок связано с использованием и интерпретацией таких параметров анализа, как безрецидивная или бессобытийная выживаемость. Если для построения кривых общей выживаемости применяется одна конечная точка — смерть больного, то для построения безрецидивной или бессобытийной выживаемости используют смешанные конечные точки: в список исследуемых событий кроме летального исхода вводят другие неблагоприятные события, такие как рецидив, прогрессия, развитие другого онкологического заболевания, которые, несомненно, имеют корреляцию с продолжительностью жизни больного, но не сиюминутную и не всегда однозначную. Кроме того, следует подчеркнуть, что уж если используется анализ выживаемости со смешанными конечными точками (безрецидивная и/или бессобытийная выживаемость), необходимо всегда давать четкие определения этим конечным точкам и времени начала отсчета. И конечно, эти определения должны быть сформулированы до начала исследования, т. е. до появления первых данных.

В значительной части работ по онкогематологии приводится и общая, и безрецидивная выживаемость. Можно спорить о целесообразности и информативности одновременного представления обеих этих оценок. Гораздо более информативно, по нашему мнению, вместо кривых безрецидивной выживаемости представить анализ вероятности достижения ремиссии и/или развития рецидива. Однако многие авторы, по-видимому, для экономии места изображают общую и безрецидивную выживаемость на одном графике. Это уже большая методологическая ошибка по нескольким причинам.

Причина первая и главная. Общая выживаемость оценивается для **всей** исследуемой группы, и точкой начала отсчета считается дата начала лечения (например, дата трансплантации). Безрецидивная выживаемость оценивается для подгруппы больных, у которых была достигнута ремиссия, и точкой начала отсчета считается дата ремиссии. На одном графике не могут без специальных ухищрений изображаться функции, у которых аргументы разные, т. е. то, что откладывается по горизонтальной оси.

Причина вторая. Некорректно сравнивать две разные характеристики, полученные на разных группах: на всей группе и подгруппе. При этом часто возникает наивно глупый вопрос: «Какая из выживаемостей должна быть выше: общая или безрецидивная?» Правильного ответа на этот вопрос нет. С одной стороны, т. к. наблюдаются два типа событий — смерть и рецидив, кривая безрецидивной выживаемости должна идти ниже. С другой стороны, группа пациентов, у которых получен ответ (ремиссия), — это отобранная более благополучная подгруппа. В ней любой неблагоприятный исход может быть менее вероятным, чем смерть в общей группе. Поэтому не следует изображать кривые общей

и безрецидивной (бессобытийной) выживаемости на одном графике, чтобы не провоцировать бессмысленные сравнения и спорные интерпретации.

Вообще ретроспективный событийный анализ пассивно собранных данных, т. е. данных, собранных вне контролируемого планируемого исследования, должен быть исключен из списка корректных научных методов исследования и рекомендован к использованию в сильно ограниченных задачах поискового анализа или рекламно-описательных целях. Селекция задним числом, когда результаты терапии известны, может быть вполне искренней и необязательно сознательной фальсификацией. Несмотря на это, такое использование событийного анализа является грубой ошибкой и значительно искажает истинную картину.

Еще одна опасность ретроспективного анализа архивов — это не только искажение реальной картины для читателя, потребителя суррогатной научной информации. Сами исследователи могут вполне искренно верить в свои результаты и выводы и продолжать двигаться к недостижимым целям.

«КВАДРАТНЫЕ» КРИВЫЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ, ИЛИ КРИВЫЕ «КАТАСТРОФ»

Если просматривать статьи с «картинками» выживаемости в таких уважаемых журналах, как «Blood» или «Leukemia», то редко можно найти кривые с ярко выраженным изломом. Излом, или, выражаясь математическим языком, резкое изменение производной на кривой выживаемости, свидетельствует о резком изменении функции риска. Функция риска характеризует интенсивность наступления случаев, т. е. вероятность наступления события в ближайшем к данному моменту малом интервале времени, при условии что события раньше не было. Если говорить о выживаемости, то функция риска — это вероятность больного умереть в течение данного дня при условии, что он до этого дожил. Скачок функции риска свидетельствует либо о резком изменении объективного состояния пациента (например, окончание рискованного периода агранулоцитоза), либо о значительном изменении состава группы (естественном выбывании пациентов с высоким риском ранней летальности, т. е. об исходной гетерогенности исследуемой группы). Анализ скрытой гетерогенности и переменного во времени риска — сложная математико-статистическая задача [7]. Но хотелось бы остановиться на странном, необычном виде кривых выживаемости, имеющем не объективные природные причины, а являющемся следствием методологических особенностей и погрешностей анализа данных. На следующем рисунке изображена типичная картинка, которую любят приводить в своих работах некоторые врачи-исследователи. Обычно это следствие «прецедентной» практики некоторых научных журналов. Авторы рисуют картинки в одной манере для простоты сравнения результатов.

Например, в некоторых сообществах исследователей есть обычай изображать безрецидивную выживаемость, включая в список конечных точек не только смерть и рецидив, но и раннюю летальность, т. е. в анализ включаются все пациенты (а не только те, у кого получена полная ремиссия), и отсчет времени ведется от начала лечения (а не от момента достижения ремиссии). В принципе, если не искажается временная шкала (что тоже бывает, когда ранняя летальность регистрируется для всех больных одним днем — точкой О на горизонтальной оси времени) и отсчет времени действительно ведется от начала терапии, а не от момента ремиссии, то формально с точки зрения статистики все правильно. На графике изображается оценка вероятности на-

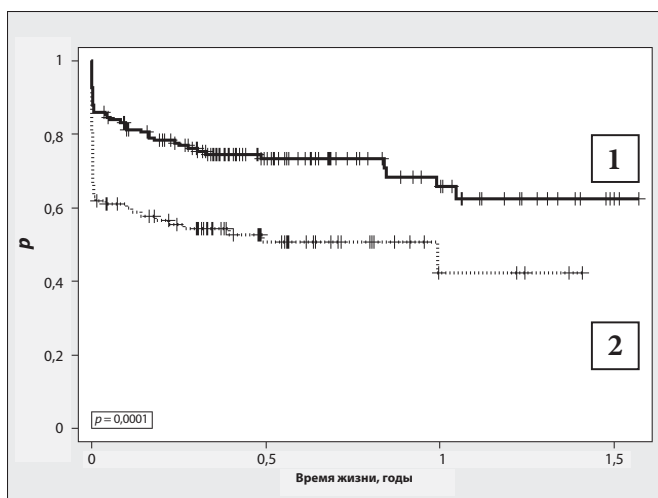


Рис. 3. Результаты симуляционного моделирования анализа безрецидивной выживаемости больных в двух группах, при котором отсчет идет от начала лечения:

1 — группа с ранней летальностью 15%; 2 — группа с ранней летальностью 30 %

бора случаев: смерть и рецидив. Некорректность подхода в том, что в анализ объединяются разные по статистической природе случаи — рецидив и смерть. Если смерть может наступить в любое время, то рецидивы в начальный период (до ремиссии) по определению не могут произойти. Эта некорректность может приводить к явной ошибке, когда сравниваются кривые. Примером могут служить кривые выживаемости, приведенные на рис. 3.

Как видно на представленном графике, вероятность наступления случаев (смерть + рецидив) в постремиссионный период в двух группах абсолютно одинакова — кривые параллельны. При этом оценки безрецидивной выживаемости статистически сильно различаются ($p = 0,0001$), что и фиксируется в выводах. Но на самом деле отличаются они только за счет разной ранней летальности (15 и 30 % — так заложено в модели), в то же время вероятность сохранения ремиссии в двух группах совершенно одинаковая.

Идеологически безрецидивная выживаемость — это характеристика безрецидивного течения постремиссионного периода заболевания, и включение в анализ эффекта ранней летальности (события, предшествующего возможному наступлению ремиссии) может привести к ошибочной интерпретации результатов, что и продемонстрировано в этом модельном примере.

Есть бесспорный математический принцип: кривая выживаемости должна начинаться из точки на графике с координатами $t = 0, P = 100\%$ (где t — время отсчета, P — доля больных), а для вероятности наступления события — из точки с характеристикой $t = 0, P = 0\%$. Это означает, что плотность вероятности в начальный момент — величина больше нуля. Из этого следует, что на кривой выживаемости нет вертикального или горизонтального продолжительного участка в начальной точке. Если на графике есть начальный вертикальный участок, т. е. кривая начинается на уровне ниже 100 %, то это значит, что в начальный момент происходит какая-то катастрофа, приводящая к **одномоментной** потере части пациентов. Если же кривая какое-то время идет горизонтально на уровне 100 %, а затем уходит вниз, это выглядит как 100%-я искусственно обеспеченная гарантия отсутствия летальных исходов в этот конкретный промежуток времени и отмена гарантии после него.

Таким образом, если график выживаемости или других конечных точек имеет необычную форму (резкие изменения наклона, горизонтальные и вертикальные продолжительные

участки), это всегда должно вызывать подозрения. Причины этого, скорее всего, искусственные и связаны с методологией сбора и обработки данных.

АНАЛИЗ «РЕСПОНДЕР-НЕРЕСПОНДЕР». ПРОДЛЕВАЕТ ЛИ ЖИЗНЬ ВЫИГРЫШ В ЛОТЕРЕЮ?

В свое время был достаточно популярным сравнительный анализ выживаемости тех, у кого был получен ответ на лечение (респондеры), и тех, у кого его не было (нереспондеры). О некорректности данного вида анализа еще четверть века назад в авторитетном медицинском журнале «Journal of Clinical Oncology» была написана специальная методологическая статья [8, 9]. В статье однозначно показано, что постфактум разбиение исследуемой группы на ответивших и не ответивших на лечение и сравнение их оценок выживаемости с отсчетом от начала лечения является некорректным методом анализа. Статья J. Anderson и соавт. [8] процитирована за эти 20 лет около 400 раз, и данный тип анализа почти исчез со страниц авторитетных журналов. Несмотря на это, статьи, в которых этот псевдометод используется, появляются с завидным постоянством, поскольку он очень привлекателен своей кажущейся простотой и наглядностью. По сути, этот метод вполне соответствует принципам ретроспективной «мемуарной» статистики, когда сортировка пациентов осуществляется после получения информации о результате воздействия.

Идея этого псевдоанализа проста: пациентов делят на две подгруппы в зависимости от того, был ли достигнут эффект при лечении или нет; затем строят и сравнивают кривые выживаемости; продолжительность жизни отсчитывается от начала терапии. Математическое доказательство ошибочности метода приведено в упомянутой статье [8]. Основная идеологическая некорректность метода в том, что на момент начала терапии, от которой ведется наблюдение за жизненным статусом пациента, информация о возможном эффекте у конкретного пациента, конечно, отсутствует. Для анализа выживаемости или других конечных точек у больных в зависимости от эффективности проведенного им лечения используются более сложные математико-статистические методы анализа с применением регрессионных моделей с переменными во времени ковариатами, описание которых выходит за рамки данной статьи.

Проиллюстрируем некорректность метода «респондер-нереспондер» на следующем модельном примере. Возьмем группу пожилых пациентов с онкологическим заболеванием. Для 80 % больных средняя продолжительность жизни 1 год, а для остальных 20 % — 10 лет. Предположим, что разыгрывается некая социальная лотерея для таких пациентов. Тиражи проводятся регулярно и часто, скажем, каждый день. Средняя длительность ожидания пациентом выигрыша лотереи — 1 год. Спрашивается, продлевает ли жизнь больного выигрыш в лотерею? Ответ очевиден: поскольку события (смерть и выигрыш) независимы, то ответ — нет, не продлевает. В модели генерируется два типа событий: смерть и выигрыш лотереи. Пациенты, которые выиграли, относились в категорию «выигравших», те же, у кого смерть наступила раньше выигрыша, — в другую категорию. Для тех и других построены оценки выживаемости, изображенные на рис. 4.

В результате анализа выживаемости мы «неожиданно» получаем вывод, что выигравшие живут дольше... Разве не очевидно? Медиана продолжительности жизни больных в группе выигравших составляет 1,3 года, а в группе проигравших — 0,68 года (почти в 2 раза меньше!). При этом истинная медиана для всей группы составляет 0,9 года. Результат «анализа» — сильно значимый, судя по графикам

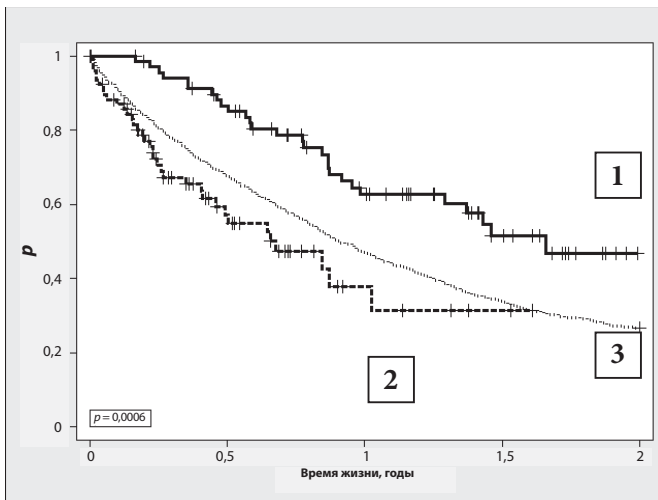


Рис. 4. Выживаемость пожилых больных, участвующих в розыгрыше лотереи (модельная симуляция). Результат ретроспективного псевдоанализа по сравнению группы выигравших в лотерею (1) и невыигравших (2); 3 — истинная выживаемость

и цифрам, и, очевидно, абсурдный по сути. Суть ошибки в распространенной путанице причины и следствия: выигрывают (ждут выигрыша) те, кто живет дольше.

ВЫВОДЫ

Основной вывод данной статьи заключается в том, что ретроспективный событийный анализ (анализ выживаемости) пассивно собранных данных не свободен от ошибок как результат поздней селекции и манипуляции данными, поэтому сфера его применения должна быть очень строго ограничена поисковыми и рекламно-описательными задачами.

Для получения фактов, которые могут быть использованы в доказательных целях, необходимы проспективные контролируемые исследования. Дизайн исследования, селекция объектов, технология и инструменты сбора данных, план анализа должны разрабатываться и фиксироваться до появления экспериментальных данных. Это обязательные условия получения несмещенных результатов и объективных выводов.

Кроме того, пусть ни у кого не вызывает сомнения, что для профессионалов представляемые в статьях и презентациях кривые выживаемости или событийного анализа являются своего рода детектором лжи — по ним всегда можно судить о чистоте эксперимента и экспериментатора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Электронный учебник по статистике Statsoft. Анализ выживаемости. <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm>.
2. Lee E.T. Statistical methods for survival data analysis. Belmont, CA: Lifetime Learning, 1980.
3. SAS Institute Inc. 2004. SAS® 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc.
4. Lambert P., Thompson J. Estimating and modeling the cure fraction in population-based cancer survival analysis. *Biostatistics* 2007; 8(3): 576–94.
5. Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics. Guidance for Industry U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, May 2007.
6. Куликов С., Савченко В., Маслова Е., Паровичникова Е., Гудилина Ю. Клинические экспериментальные исследования в гематологии: планирование, управление данными, представление результатов. *Тер. арх.* 1996; 7: 65–72.
7. Wienke A. Frailty Models, Max Planck Institute for Demographic Research, MPIDR Working Paper WP 2003–032, September 2003, <http://www.demogr.mpg.de/>.
8. Anderson J.R., Cain K.C., Gelber R.D. Analysis of survival by tumor response. *J. Clin. Oncol.* 1983; 1: 710–9.
9. Anderson J.R., Cain K.C., Gelber R.D. Analysis of Survival by Tumor Response and Other Comparisons of Time-to-Event by Outcome Variables. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(24): 3913–5.

Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья

Е.Е. Егоров

Telomeres, telomerase, oncogenesis and measure of health

Y.E. Yegorov

SUMMARY

Review includes broad spectrum of data concerning telomeres and telomerase. Along with description of telomere length and telomerase activity alterations in the process of development there are data about telomere and telomerase roles in the oncogenesis, the consequences of hereditary decreasing of telomerase activity, and principles of cancer treatment in the context of telomerase. Some attention paid to recent discoveries of nontelomeric functions of telomerase, the history of Nobel prize awarding in 2009 and to linkage of peripheral blood leucocytes telomere length with the development of various pathologies associated with aging. Some data are presented concerning telomere biology of stem cells and forced expression of telomerase in human cells (telomerization).

Keywords

telomerase, telomeres, oncogenesis, leucosis, cancer therapy, telomerization, telomeres length.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow

Контакты: yegorov58@mail.ru

Принято в печать: 13 мая 2010 г.

РЕФЕРАТ

В обзоре представлен широкий спектр данных о теломерах и теломеразе. Наряду с описанием изменений теломер и теломеразной активности в процессе развития показаны роль теломер и теломеразы в процессах канцерогенеза, последствия наследуемого снижения теломеразной активности, принципы опосредованного теломеразой лечения рака. Уделено внимание недавно обнаруженным внетеломерным функциям теломеразы, истории присуждения Нобелевской премии 2009 г. и связи длины теломер в клетках периферической крови с развитием различных, прежде всего связанных со старением, заболеваний. Дан обзор данных о биологии теломер в стволовых клетках, а также последствия принудительной экспрессии теломеразы (теломеризации) в клетках человека.

Ключевые слова

теломераза, теломеры, канцерогенез, лейкоз, терапия опухолей, теломеризация, длина теломер.

ТЕЛОМЕРЫ

Теломерами называют концевые участки хромосом, образованные специфической теломерной ДНК и белками. У человека и всех позвоночных теломерная ДНК на всех хромосомах представлена в виде монотонного повтора TTAGGG, общей длиной в сотни и тысячи оснований. Теломерная ДНК большинства соматических клеток укорачивается при пролиферации клеток вследствие неполной репликации концевых участков (концевой недорепликации), когда новосинтезированная копия оказывается короче оригинала. Короткие (однако содержащие несколько тысяч оснований ДНК) теломеры вызывают явление репликативного старения, когда пролиферация клеток останавливается и клетка надолго переходит в неделящееся состояние.

Теломерная ДНК замыкается в кольцо и таким образом получает конформацию, отличающую ее от обрыва хромосомы. Это объясняет также, почему репликативное старение клеток начинается при достаточно большой длине теломерного повтора. Учитывая определенную гибкость ДНК, при укорочении теломер свыше некой критической величины образование кольца становится невозможным (рис. 1).

Теломерная ДНК вместе с теломерсвязывающими белками может формировать петли. В силу ограничения свободного вращения ДНК и взаимодействия с разнообразными белками ДНК в петле имеет напряженную конформацию. При укорочении теломерной ДНК наступает момент, когда длина теломерного повтора не позволяет образоваться петле. Теломерный конец ДНК приобретает свободную конформацию, которая воспринимается клет-

Рис. 1. Гипотеза петлевого строения теломер (по Е. Егорову и др. [1] с изменениями)



кой как сигнал повреждения. В результате запускается механизм репликативного старения клеток.

Если клетка снижает контроль за конформацией ДНК (например, допускает наличие разрывов), то отрицательные сигналы, идущие от «неправильной» (непетлевой) теломеры, не учитываются и клетка может пролиферировать дальше. Репликативное старение отменяется, или даже клетка теряет к нему способность. В этом случае, поскольку недорепликация продолжается, возможна лишь ограниченная пролиферация, в пределах нескольких десятков делений.

Такой сюжет может развиваться при заражении клетки онкогенными вирусами. Продолжающаяся недорепликация «съедает» остатки теломер, начинаются потери существенного генетического материала, и клетки в основной своей массе гибнут. Наблюдается так называемое состояние кризиса, когда, несмотря на непрекращающуюся митотическую активность, клеточная популяция не растет. Это состояние объясняется тем, что недорепликация укорачивает теломеры лишь в одной из дочерних клеток, а исходная клетка, имеющая полную последовательность, повторно вступает в деление.

Особый интерес в структуре теломер представляет их самая дистальная часть. Двойная спираль ДНК не доходит до самого конца, 5'-цепь обрывается, и остается одноцепочечный G-богатый участок. Длина одноцепочечного 3'-конца у человека составляет 100–150 нуклеотидов [2]. Для образования теломерной петли свободный 3'-конец ДНК в комплексе с белками вступает во взаимодействие с двойной спиралью теломерной ДНК. Белки, связывающиеся вдоль повторяющегося тракта теломерной ДНК, присоединяют дополнительные белки и формируют нуклеопротеиновый комплекс высокого порядка, который получил название шелтерин [3].

В регуляции длины теломер участвует множество факторов. Помимо комплекса разнообразных белков, взаимодействующих с теломерами, необходимо упомянуть различные эпигенетические механизмы (метилирование ДНК

и гистонов, ацетилирование гистонов), а также транскрипцию теломерной ДНК. Продукт гена *MLL*, который часто перестраивается при лейкозах, ассоциирован с теломерами и регулирует транскрипцию теломерной ДНК [4].

В заключение этого раздела можно уверенно сказать, что регуляция длины теломер, по большому счету, до сих пор составляет тайну, несмотря на сотни исследований на эту тему.

ТЕЛОМЕРАЗА

В бессмертных клетках (делящихся предшественниках половых клеток, в ряде стволовых и в раковых клетках) работает фермент, противостоящий концевой недорепликации ДНК. Он удлиняет теломеры, и его называют теломеразой. Основу фермента составляют два компонента: РНК-компонент и белковая часть. Известно, что РНК-компонент теломеразы (*hTR*, human telomerase RNA) синтезируется в большинстве клеток человека независимо от теломеразной активности. Для гена белковой субъединицы теломеразы с 1998 г. принято обозначение *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase).

Внутри РНК-компонента теломеразы имеется короткий район, который служит матрицей для синтеза теломерной ДНК. Таким образом, с химической точки зрения теломераза является обратной транскриптазой, а ингибиторы обратной транскриптазы, применяемые для борьбы с вирусными инфекциями, могут подавлять ее функцию [5].

Механизм работы теломеразы — это повторное копирование матрицы, включающее этап связывания фермента с теломерной ДНК, этап элонгации, когда дезоксирибонуклеотиды последовательно добавляются к 3'-концу G-богатой цепи теломеры, и этап транслокации фермента на конец новообразованной цепи (рис. 2). Активно работающий фермент из клеток человека представляет собой димер.

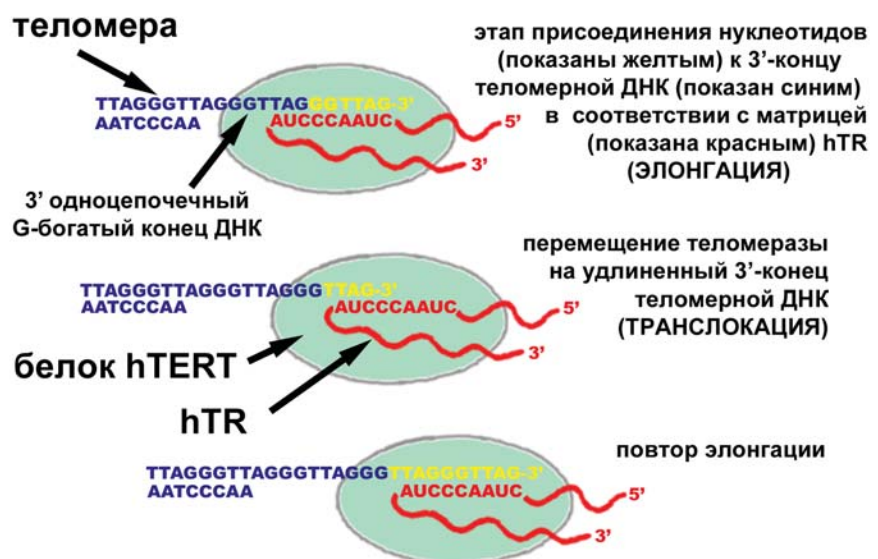


Рис. 2. Этапы работы теломеразы

О НОБЕЛЕВСКОЙ ПРЕМИИ 2009 г.

В прошлом году за исследование теломер и теломеразы трем американским ученым была присуждена Нобелевская премия. В России было много разговоров на эту тему, связанных с недооценкой роли А. М. Оловникова в открытии теломеразы. Автору представляется целесообразным уделить некоторое внимание истории этого вопроса.

Если бросить ретроспективный взгляд на развитие науки о теломерах и теломеразе, то, безусловно, можно выделить двух человек, вклад которых в развитие этой области недооценен. Это Л. Хейфлик и А. М. Оловников. Работа Л. Хейfliка 1961 г. [6], одна из самых цитируемых в биологии, помимо всего прочего и прежде всего пробудила творческую энергию многих ученых для попыток объяснить, каким образом клетки подсчитывают свои деления. Л. Хейfliку с трудом удалось опубликовать результаты, показывающие, что клетки человека делятся в культуре лишь ограниченное число раз. В общественном мнении того времени господствовало убеждение, что в руках умелого исследователя клетки бессмертны.

Статья получила большой общественный резонанс. Возникло и вошло в словари понятие «предел Хейfliка». Основную роль в процессе «заинтересовывания» широких масс сыграла не сама статья, а ее бесчисленные комментарии, упростившие результаты до пресловутых 50 делений, свойственных клеткам человека, хотя непосредственно в статье были приведены многочисленные данные о количестве удвоений популяции клеток человека, варьирующие от 30 до 70. Автор данной работы помнит, как в начале 1970-х годов впервые познакомился с работой Л. Хейfliка на последней странице газеты «За рубежом».

Известную работу А. М. Оловникова 1971 г. [7] можно оценивать прежде всего как ответ на работу Л. Хейfliка. А. М. Оловников объяснил, как работает счетчик делений. В этой работе было совершенно гениально предсказано, что при матричном синтезе линейного полинуклеотида (репликации хромосомы) копия должна быть короче и с этим связа-

но ограничение количества клеточных делений. Также было предсказано существование специального фермента, удлиняющего концы хромосом в бессмертных клетках.

Исследования Э. Блэкберн, К. Грейдер и Д. Шостака, которые удостоились Нобелевской премии, поначалу были разнонаправленными и объясняли различные феномены. Э. Блэкберн, изучая последовательности на концах хромосом, предполагала, что странные теломерные последовательности, возможно, имеют какой-то особый механизм репликации, который и был открыт (при участии К. Грейдер) в 1984 г. Д. Шостак в сотрудничестве с Э. Блэкберн фактически нашли молекулярные подтверждения идей Г. Меллера и Б. Макклиток 1938 г. о необходимости теломер для стабилизации хромосом.

Только в 1988 г., когда идея А. М. Оловникова соединилась с находками Блэкберн—Грейдер, начался стремительный рывок в этом направлении науки. Сами нобелевские лауреаты Э. Блэкберн и К. Грейдер так описывают эти события: «Мы не знали об идеях Оловникова до 1988 г., когда Кальвин Харли рассказал о них Грейдер. Заинтригованные, Грейдер, Харли и их коллеги решили посмотреть, а происходит ли со временем укорочение хромосом в клетках человека» [8].

В 1989 г. обнаружено укорочение теломер у человека; в 1990 г., прежде всего для изучения теломеразы, была создана корпорация «Герон» (Geron), объединившая очень многих первоклассных ученых. В 1994 г. в корпорации был разработан чувствительный метод для детекции теломеразной активности, в 1998 г. было доказано, что принудительная экспрессия теломеразы ведет к иммортализации клеток.

Таким образом, помимо гениального предвидения 1971 г., якобы оставшегося на страницах никому не интересных журналов, можно утверждать, что идеи А. М. Оловникова непосредственно участвовали во всемирном научном процессе (рис. 3), давшем прекрасный результат, достойный Нобелевской премии. И эти факты должны оставаться в истории науки.

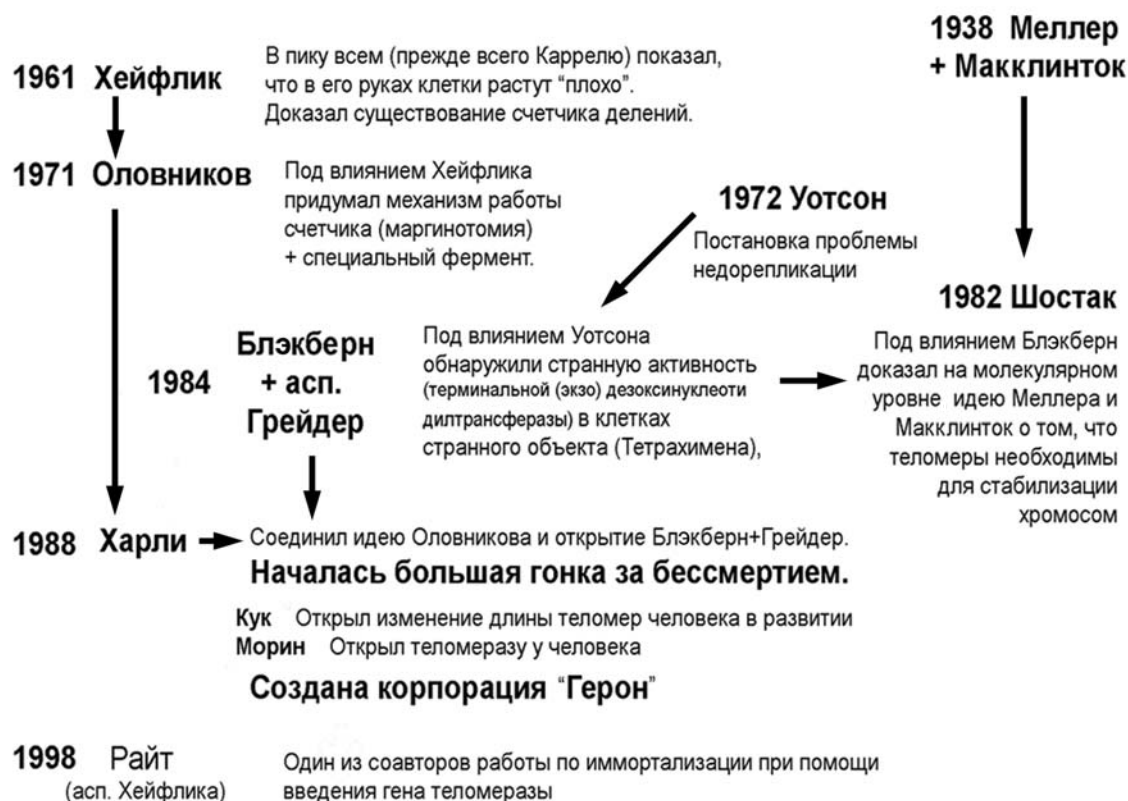


Рис. 3. Взаимосвязь открытий в области теломер и теломеразы

ALT — АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СПОСОБЫ УДЛИНЕНИЯ ТЕЛОМЕР У ЧЕЛОВЕКА

Не все бессмертные клетки обладают теломеразной активностью. Существуют и другие способы поддержания длины теломер. Их обычно называют альтернативными способами удлинения теломер (ALT — alternative lengthening of telomeres). Считается, что примерно в 10 % опухолей теломеры поддерживаются без участия теломеразы. Механизм ALT основан на генетической рекомбинации [9]. Вероятно, существует несколько вариантов ALT.

Опухоли разного происхождения имеют различную вероятность возникновения ALT, и само по себе наличие или отсутствие ALT могут иметь различное прогностическое значение. Чаще всего ALT возникает (активируется) в опухолях нейроэпителиального (астроцитомы) и мезенхимального происхождения (остеосаркомы). В злокачественных гистиоцитах частоту ALT оценивают в 77 % [10].

Механизмы ALT могут работать не только при канцерогенезе, но и участвовать в удлинении теломер соматических клеток, а также определять удлинение теломер в раннем эмбриогенезе. Недавно было показано, что на ранних стадиях развития (в период от ооцита до бластоцисты) у человека и мыши происходит значительное удлинение теломер (на несколько тысяч нуклеотидов). Только частично это удлинение можно объяснить деятельностью теломеразы. Оно происходит и в партеногенетически развивающихся ооцитах, и у мышей, лишенных теломеразной активности [11].

Удлинение теломер на этапе дробления — необходимое событие, поскольку длина теломер в ооцитах человека иногда составляет около 7 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) [12], что значительно меньше, чем длина теломер в большинстве соматических тканей. Интересно, что длина теломер в ооците является величиной, определяющей возможность наступления беременности при экстракорпоральном оплодотворении. Когда средняя длина теломер уменьшается до менее 6,32 т.п.н., беременность невозможна [12].

Удлинение теломер на этапе дробления совпадает по времени с резким падением уровня метилирования ДНК. Следует отметить, что на стадии бластоцисты устанавливается длина теломер, необходимая для всего дальнейшего развития, в т.ч. в процессе клонирования организма из соматических клеток [13].

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Соматические клетки в основном лишены теломеразной активности. Их теломеры укорачиваются как в процессе онтогенеза, так и при культивировании клеток *in vitro*. Теломеразная активность (если она есть в клетках) обычно не успевает уменьшиться на протяжении клеточного цикла, поскольку время полураспада теломеразы близко к 24 ч. При выходе клеток из клеточного цикла теломеразная активность постепенно падает и через несколько дней не определяется. При дифференцировке клеток может происходить быстрое снижение теломеразной активности. Скорее всего, теломераза в каждом клеточном цикле работает только на части теломер, преимущественно коротких [14].

Теломеразная активность имеется в делящихся клетках половой линии человека и в развивающихся эмбриональных тканях. Однако на стадии от зиготы до морулы теломеразная активность у человека и мыши незначительна. Теломераза экспрессируется на высоком уровне, начиная со стадии бластоцисты, и найдена во всех тканях плода человека в течение I триместра беременности. Далее теломеразная активность сохраняется в ряде тканей эмбриона (печень, кишечник, лег-

кие, кожа, мышцы, надпочечники и почки), но исчезает после 16 нед. беременности в мозге и костях, несмотря на продолжающиеся активные клеточные деления в этих тканях.

В некоторых случаях довольно высокая теломеразная активность может сохраняться в обычных соматических клетках. Недавно было показано, что мезотелиальные клетки человека обладают ею [15]. При этом клетки содержат довольно короткие теломеры (средняя длина около 3,5 т.п.н.) и обладают очень малым пролиферативным потенциалом в культуре. После нескольких удвоений популяции теломеразная активность в клетках исчезает. Примечательно, что в клетках этих стареющих культур длина теломер несколько больше, чем при начале культивирования. Также особенностью этих клеток служит нарушенная функция митохондрий, проявляющаяся в снижении мембранного потенциала и увеличении продукции активных форм кислорода (АФК), повреждающих ДНК.

Хотя теломераза репрессируется в большинстве тканей в процессе развития, многие стволовые клетки во взрослом организме человека коммитированы к теломеразной активности, т.е. теломеразная активность в них появляется после стимуляции пролиферации. Уровень этой теломеразной активности, видимо, недостаточен для предотвращения укорочения теломер, поскольку теломеры потомков стволовых клеток укорачиваются с возрастом человека.

ВНЕТЕЛОМЕРНЫЕ ФУНКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

В последние несколько лет стало ясно, что теломераза обладает рядом совершенно не связанных с теломерами функций. Многие данные, накапливающиеся ранее, с трудом находили объяснение в традиционных рамках. Теперь очевидно, что теломераза способна влиять (в обе стороны) на процесс запуска апоптоза посредством прямого взаимодействия с митохондриями. Более того, вероятно, что теломераза во взаимодействии с митохондриями может регулировать продукцию АФК в клетках.

В 2004 г. обнаружили, что белок hTERT имеет на N-конце лидирующую последовательность для транспорта в митохондрии, состоящую из 20 аминокислот и имеющую также сайт разрезания, который срабатывает при импорте белка в митохондрии. Было показано, что эта последовательность присуща белковым компонентам теломераз только высших эукариот [16].

Требуется время, чтобы разрешить вопрос о возможном анти- или проапоптозном действии теломеразы. На данный момент доминируют работы, демонстрирующие защитное (антиапоптозное) действие теломеразы на уровне модификации митохондриальных функций. За последние годы разными авторами показано, что теломераза предотвращает зависимость от митохондрий апоптоз посредством взаимодействия с белками семейства BCL-2 [17–19].

Учитывая митохондриальную локализацию теломеразы, можно по-новому взглянуть на работу [20], показавшую, что экспрессия *TERT* способна увеличивать потенциал митохондриальных мембран и кальций-аккумулирующую способность митохондрий, тем самым уменьшая зону ишемического повреждения в мозге.

Видимо, истинная роль теломеразы более сложная, чем это казалось в 90-е годы прошлого века. Несмотря на сильное пролиферативное влияние теломеразы, позволяющее клеткам становиться бессмертными, теломеризованные фибробласты отличаются от исходных ослабленной способностью к колониеобразованию [21], что явно свидетельствует о каких-то изменениях на уровне чувствительности клеток к факторам роста.

Возможным объяснением полученных результатов может быть вызванное теломеразой изменение редокс-регуляции в клетке. Редокс-регуляция (изменение вероятностей прохождения окислительно-восстановительных реакций) является давно известной, но по большому счету независимо существующей областью биологии. В нашем случае достаточно подчеркнуть, что прохождение в клетке любого сигнала от фактора роста зависит от окислительно-восстановительных реакций. Поэтому избыточное окисление или восстановление среды в клетках способны усилить, ослабить или вовсе отменить действие цитокина.

В теломеризованных клетках снижено содержание АФК [22] и уменьшена экспрессия обеих форм супероксиддисмутаза (ферментов, инактивирующих супероксид-анион — один из видов АФК) [23]. Поскольку основным источником АФК в клетках служат митохондрии, можно предположить, что теломераза уменьшает продукцию АФК в митохондриях и тем самым восстанавливает внутриклеточную среду, что должно уменьшать чувствительность клеток к факторам роста и способствовать сохранности генетического материала. Область редокс-регуляции выходит далеко за рамки данной работы. Заинтересованному читателю можно предложить следующие обзоры [24–26].

ОСОБЕННОСТИ ТЕЛОМЕРНОЙ БИОЛОГИИ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

Большинство стволовых клеток человека характеризуется довольно медленным темпом пролиферации. Математическое моделирование оценило скорость деления гемопоэтических стволовых клеток как одно деление за 1–2 года [27]. В промежутках между делениями клетки пребывают в пролиферативном покое. В этом состоянии теломеразная активность отсутствует, появляясь на короткое время при стимуляции пролиферации. Однако, даже если принять эти оценки интенсивности пролиферации, ясно, что стволовые клетки должны иметь пролиферативный потенциал заведомо больший, чем предел Хейфлика.

Теломеры стволовых клеток человека укорачиваются, несмотря на индуцируемую теломеразу (табл. 1). При определенных допущениях репликативную историю гемопоэтических стволовых клеток можно проследить, измеряя длину теломер в лейкоцитах периферической крови. Известно, что скорость укорочения теломер в гранулоцитах и лимфоцитах взрослого человека составляет примерно 39 и 59 пар оснований в год [28]. При этом в первые 2 года жизни потери существенно выше и достигают 1000–3000 пар оснований в год, что может отражать экспансию стволовых клеток в растущем организме. С возрастом (после 60 лет) потери ДНК снова возрастают [29], что можно объяснить снижением числа стволовых клеток, ухудшением их антиоксидантной защиты или увеличением окислительного стресса в тканях.

Таблица 1. Теломеры и теломераза в стволовых клетках человека [30]

Тип клеток	Пролиферация	Теломеразная активность	Теломеры
Эмбриональные	Неограниченная	Высокая	Поддерживаются
Гемопоэтические	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Мезенхимные	Ограничена	Низкая или отсутствует	Укорачиваются
Эпидермис	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Волосной фолликул	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Крипта кишечника	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Нервные	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Панкреатические	Ограничена	Нет	Укорачиваются
Печени	Ограничена	Низкая	Укорачиваются
Раковые	Неограниченная	Высокая	Поддерживаются

Наиболее ярко укорочение теломер проявляется при пересадках костного мозга. Наблюдают обратную корреляцию между количеством пересаженных моноклеарных клеток и степенью укорочения теломер. Пересадка костного мозга приводит к укорочению, эквивалентному периоду 15 лет жизни. Описан ряд неудачных трансплантаций, сопровождающихся очень сильным укорочением теломер [31]. Донорство может удалять из организма количество клеток, эквивалентное нескольким годам нормального гемопоэза. При этом, однако, не наблюдают каких-либо достоверных изменений длины теломер [32].

Лимфоидные клетки способны к очень интенсивному клональному размножению при антигенной стимуляции. Несмотря на индукцию теломеразы, в них происходит более значительное укорочение теломер по сравнению с гранулоцитами. Соответственно клетки памяти имеют значительно более короткие теломеры, чем наивные лимфоциты [33].

Существует много нерешенных вопросов в теломерной биологии стволовых клеток. По-видимому, различные стволовые клетки взрослого организма весьма различаются по роли теломер и теломеразы в поддержании пролиферации. Рассмотрим для примера самые изученные стволовые клетки. Это гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и мезенхимные стволовые клетки из костного мозга человека (МСК).

МСК не обладают определяемой теломеразной активностью. Также в них не найдены признаки альтернативных механизмов поддержания длины теломер [34]. Их теломеры укорачиваются *in vivo* и *in vitro*. МСК в культуре сохраняют нормальный кариотип и обычно не подвержены кризису, т. е. по мере укорочения теломер переходят в состояние репликативного старения. Они способны к дифференцировке на любой стадии культивирования. Особенность этих клеток заключается в очень большой гетерогенности по пролиферативному потенциалу. По этому признаку среди здоровых нестарых лиц существуют десятикратные различия [34].

ГСК обладают теломеразной активностью, которая может быть еще более стимулирована различными цитокинами. Однако теломеры ГСК укорачиваются *in vivo* и *in vitro* [35]. Потомки ГСК Т-лимфоциты обладают теломеразной активностью, но их теломеры также укорачиваются. ГСК с более длинными теломерами имеют репликативное преимущество при трансплантациях [36]. По не совсем понятным причинам повышенная теломеразная активность не способна увеличить репликативные возможности этих клеток [35] в отличие от МСК.

ПРИНУДИТЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ (ТЕЛОМЕРИЗАЦИЯ КЛЕТОК)

Наиболее ярко особенности различных клеток относительно зависимости от теломер и теломеразной активности проявляются после принудительной экспрессии гена *hTERT*, так называемой теломеризации.

Уже давно известно, что РНК-компонент теломеразы экспрессируется в большинстве клеток человека независимо от теломеразной активности, поэтому после трансфекции клеток человека геном *hTERT* в них появляется теломеразная активность. Клетки получают способность поддерживать длину теломер. Такие клетки стали называть теломеризованными. Всевозможные тесты показали, что теломеризованные клетки не приобретают свойств злокачественных клеток [37]. Само по себе наличие теломеразной активности не нарушает механизмы регуляции роста клеток. Теломераза при этом способствует стабильности генома, предотвращая хромосомные перестройки.

Теломеризация фибробластов не только иммортализирует клетки, но и меняет экспрессию ряда генов, не связанных прямо с клеточным циклом. Было показано, что в теломеризованных фибробластах независимо от срока их пребывания в культуре может восстанавливаться экспрессия генов, специфичных для молодых клеток. Бывают и другие результаты. Исследователи не знают механизма изменения экспрессии генов при теломеризации. Рассматриваются три основные возможности: влияние длины теломер, непосредственное влияние теломеразы и взаимодействие теломеразы с митохондриями.

Теломеризация фибробластов ведет к снижению в клетках уровня АФК [22]. Вероятно, это связано с изменениями митохондрий, которые служат основными источниками АФК в клетке. В теломеризованных клетках снижается их число и повышается мембранный потенциал митохондрий. Эти изменения могут быть обусловлены как селекцией в процессе становления бессмертных клеток, так и прямым влиянием теломеразы на митохондрии.

Довольно интересный результат был получен после введения гена *hTERT* в клетки пациента, страдающего болезнью Ниманна—Пика. Это разновидность наследственного липидоза, при котором нарушается транспорт холестерина и гликофинголипидов из лизосом. Экспрессия *hTERT* приводила к нормализации клеточного фенотипа. Эффект ускорения транспорта малых молекул из лизосом при экспрессии *hTERT* имеет место и в нормальных клетках [38].

В противоположность скелетным миобластам гладкомышечные клетки человека легко поддаются иммортализации с помощью введения гена *hTERT* [39]. Клетки миометрия после иммортализации сохраняют большинство маркеров дифференцировки. С помощью теломеризованных гладкомышечных клеток были созданы аналоги мелких кровеносных сосудов [40], затем и достаточно крупные сосуды (диаметром 3 мм, длиной 5 см) [41]. Клетки сохраняли кардиологическую стабильность, не вызывали роста опухоли у иммунодефицитных мышей.

ТЕЛОМЕРИЗАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Было показано, что теломеризация усиливает остеогенный потенциал МСК человека [42]. При трансплантации теломеризованных МСК образование кости шло быстрее, а эксплантат содержал большее количество клеток [43]. Были получены бессмертные теломеризованные МСК человека, которые поддерживали гемопоэз значительно лучше первичных клеток [44], хотя по этому признаку наблюдали большую гетерогенность среди клонов. Свойства теломеризованных МСК сохраняются при длительной пролиферации, вплоть до 290 удвоений популяции [45]. Показано сохранение поверхностных маркеров и способности к дифференцировке в производные мезодермы вплоть до уровня 417 удвоений популяции [46]. При этом в течение 3 лет сохранялась постоянная скорость пролиферации клеток, зависящая от плотности посева: чем ниже плотность посева, тем выше скорость пролиферации.

Стромальные клетки из липоаспирата по своему дифференцировочному потенциалу напоминают МСК. Их теломеризация приводит к иммортализации с сохранением или даже усилением, как и в случае МСК, способности к остеогенной дифференцировке [47, 48]. Неудачей закончилась попытка иммортализации с помощью введения *hTERT* гемопоэтических (CD34+) предшественников из пуповинной крови человека. Иммортализации удалось достичь только при совместном введении *hTERT*, *E6* и *E7* онкогенов вируса па-

пилломы человека 16-го типа [49]. Мезенхимные стволовые клетки из пуповинной крови были успешно иммортализованы введением только *hTERT*. Клетки при этом сохраняли все свои свойства [50].

Успехом увенчались попытки иммортализовать эмбриональные предшественники нервных клеток человека из спинного мозга [51] и из субвентрикулярной области [52]. В обоих случаях клетки были способны к разнонаправленной (глиальной и нейрональной) дифференцировке. При этом клетки из спинного мозга были способны созреть до электрофизиологической компетентности и при пересадке в пораженный спинной мозг крыс (в условиях иммуносупрессии) выживать до 6 мес., экспрессируя синаптические белки и медиаторы.

Нами также была получена бессмертная культура нервных стволовых клеток человека [53]. Клетки годами сохраняют скорость роста, способность к дифференцировке, способность образовывать нейросферы, в них синтезируются специфические РНК и белки, сохраняется диплоидный кариотип.

Экспансия β -клеток островков Лангерганса в культуре ограничена примерно 10–15 удвоениями. За это время клетки приобретают стареющую морфологию, в них возрастает экспрессия ингибитора пролиферации p16, укорачиваются теломеры и появляется экспрессия β -галактозидазы — типичного маркера стареющих клеток. Введение гена *hTERT*, хотя и вызывает появление теломеразной активности, но не способно увеличить пролиферативный потенциал клеток [54].

Используя специальную самовырезающуюся конструкцию в β -клетки человека были последовательно введены два гена, кодирующие большой антиген вируса *SV40* и *hTERT*. Как и следовало ожидать, трансфицированные клетки обладали хорошей способностью к росту. Эти клетки были проверены на склонность к злокачественному перерождению и экспрессию специфических генов, связанных с регулированием продукции инсулина. Из 271 клона был выбран один, который удовлетворял всем критериям. В клетки этого клона с помощью вирусной трансфекции был введен ген Срекомбиназы и выполнено вырезание введенных генов. Полученные таким образом клетки оказались способными при введении иммунодефицитным мышам с искусственно индуцированным диабетом поддерживать нормальный уровень глюкозы крови в течение 30 нед. [55].

Подобным же образом были созданы культуры, содержащие большое количество фенотипически молодых и бессмертных клеток печени, способных выполнять свои функции в организме [56], эндотелиальных клеток [57] и клеток печеночного эндотелия [58].

НАСЛЕДСТВЕННОЕ СНИЖЕНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Существует ряд заболеваний человека, связанных со снижением теломеразной активности и изначальным укорочением теломер в клетках половой линии в результате мутаций *hTR*, *hTERT* или белков, с ними взаимодействующих [59].

При этом сходные (с нашей точки зрения) нарушения теломерного гомеостаза способны вызывать различные патологии в разных органах. Причина этого, видимо, кроется в тканеспецифических различиях экспрессии теломеразы и особенностях поддержания клеточного гомеостаза, разных вредных факторах среды и, возможно, в каких-то нетеломерных функциях теломеразы. В какой-то степени эти нарушения можно считать вариантами сегментарных (частичных) прогерий.

Общим в патогенезе является уменьшение длины теломер (рис. 4) за счет снижения теломеразной активности,

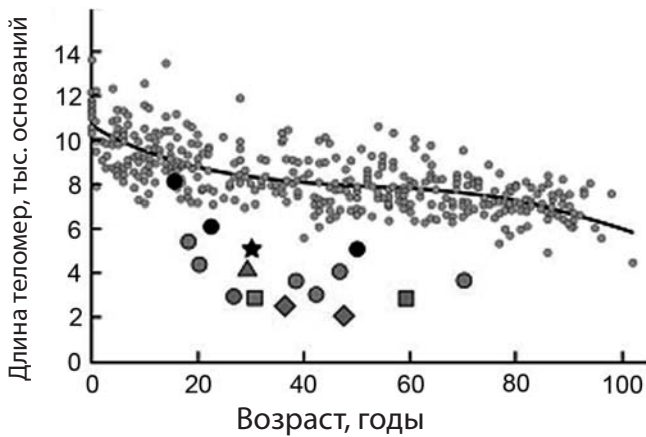


Рис. 4. Длина теломер лейкоцитов периферической крови человека как функция возраста. Мелкие серые значки — здоровые лица, крупные значки — пациенты и их родственники с мутациями гена *hTERT* или без мутаций [61]

которое проявляется рядом признаков, связанных прежде всего с повышенным риском развития опухолей, фиброзов и гипоплазий [60]. В ряду поколений наблюдают антиципацию признаков.

Впервые диагноз наследственного дискератоза был поставлен в 1910 г. двум братьям, которые имели триаду признаков: дистрофия концевых фаланг пальцев, ненормальная пигментация кожи шеи и лейкоплакия в ротовой полости (рис. 5). С тех пор описано более 500 случаев [62].

Формально среди признаков наследственного дискератоза должны наблюдаться по крайней мере два из триады. В добавление к этому у больных встречаются самые разнообразные нарушения: аплазия костного мозга, миелодиспластический синдром, лейкоз, рак кожи, эпифора в результате стеноза носослезного канала, блефарит, преждевременное поседение, алопеция, задержка развития, низкий рост, гипоплазия мозжечка, микроцефалия, стеноз пищевода, стеноз уретры, легочный фиброз, фиброз печени, гипогонадизм и аваскулярный некроз шейки бедренной или плечевой кости. По способу наследования различают три вида этой патологии [63]. Известны мутации шести генов, ведущих к развитию наследственного дискератоза: *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *TINF2*, *NOLA2* и *NOLA3* [64].

В 50 % случаев постановки клинического диагноза мутации этих генов не находят. Таким образом, наследственным дискератозом в настоящее время называют большую группу различных заболеваний, объединенную прежде всего впервые описанными клиническими признаками.

При исследовании случаев идиопатического легочного фиброза часто находят мутации генов *hTERT* и *hTR*. Этиология этих болезней может состоять в уменьшении теломер, которое ведет к ускоренному старению легочной ткани как

ткани, подвергаемой постоянному вредному воздействию окружающей среды. Болезнь проявляется сравнительно поздно (после 50 лет) и характеризуется фокальными поражениями. Предполагают, что в патогенезе участвует окислительный стресс [65, 66].

Аналогично легочному фиброзу описаны теломерно-теломеразные нарушения, ведущие к фиброзу печени, часто без нарушений в костном мозге [61].

Этиология приобретенной апластической анемии в большинстве случаев неизвестна, однако ясно, что основным звеном патогенеза является нарушение гомеостаза стволовых клеток или клеток-предшественников. Болезнь может быть следствием аутоиммунного поражения стволовых клеток или предшественников. При иммуносупрессии наблюдается гематологическое восстановление, но при сниженном числе стволовых клеток [67].

При апластической анемии общее уменьшение количества клеток сопровождается также укорочением теломер [68]. Описаны случаи апластических анемий с мутациями генов *hTR* и *hTERT* [69].

АКТИВАЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Все варианты развития опухоли можно разделить на два больших класса в отношении стадии, на которой происходит активация теломеразы. Первый вариант, особенно свойственный лейкозам, состоит в том, что теломеразная активность может присутствовать в клетках с самого начала. Другой вариант заключается в том, что клетка-предшественник раковой опухоли не обладает теломеразной активностью, а обретает ее в ходе опухолевой прогрессии.

Частота спонтанной реактивации теломеразы в фибробластах человека чрезвычайно низка. Все воспроизводимые случаи иммортализации фибробластов человека в культуре происходят после того, как клетки преодолевают механизм репликативного старения, пройдут дополнительные раунды репликации и связанное с этим чрезмерное укорочение теломер. Возможной причиной увеличения вероятности реактивации теломеразы при чрезмерном укорочении теломер служит резкое увеличение генетической нестабильности хромосом с короткими теломерами [70–72].

На рис. 6 представлена типичная последовательность событий, происходящих при развитии рака кишечника.

Видно, что активация теломеразы не является ранним событием, а возникает на стадии, когда теломеразная активность действительно становится необходима для пролиферации раковых клеток. Увеличение надежности репрессии теломеразы в соматических клетках должно резко уменьшать вероятность развития уже появившейся ранней опухоли.

В последние годы появляется все больше информации о раковых стволовых клетках. В отношении теломера-



Рис. 5. Триада признаков наследственного дискератоза [64]

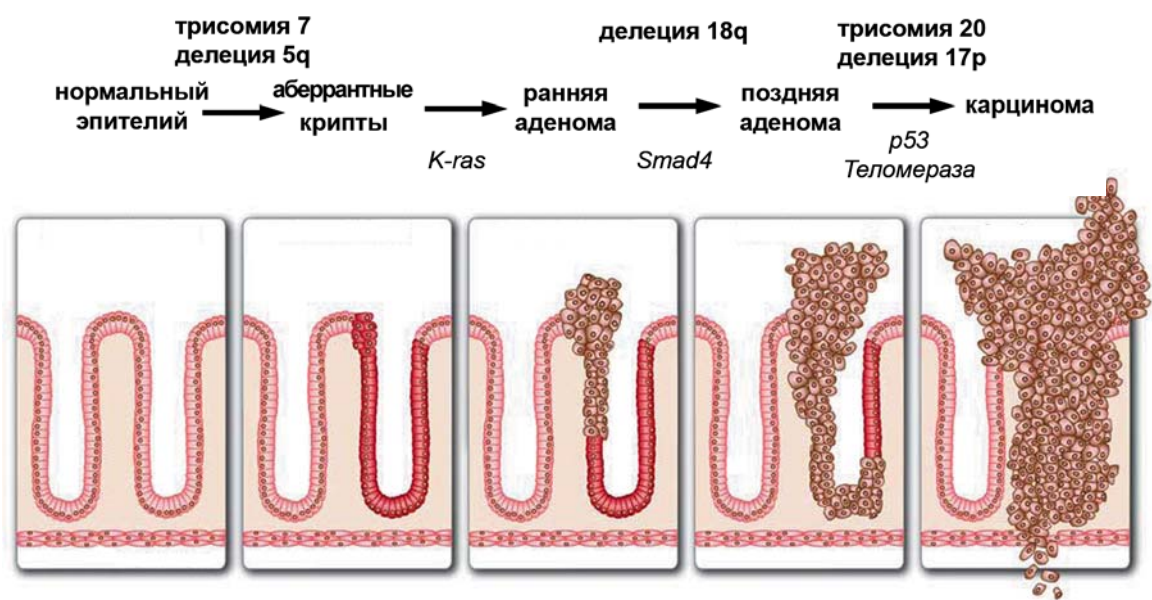


Рис. 6. Типичная последовательность событий при развитии рака кишечника [73]

зы и понимания путей возникновения опухоли необходимо различать два варианта событий. Для ряда случаев (многие лейкозы) строго доказано происхождение опухоли из стволовой клетки. Сценарий развития такой опухоли начинается с нарушения регуляции стволовой клетки, обладающей теломеразной активностью. В дальнейшем у таких клеток сохраняется большой запас пролиферативного потенциала, достаточный для приобретения различных злокачественных признаков. Вероятно, похожие пути развития свойственны и другим опухолям, в частности опухолям мозга и некоторым солидным [74].

В последнее десятилетие стало окончательно ясно, что многие клетки организма способны к дедифференцировке и даже к трансдифференцировке. Поэтому обнаруживаемые в опухолях признаки стволовых клеток могут быть вторичными и не являться доказательством происхождения опухоли из стволовых клеток.

Теломеразная активность различных опухолей

Поскольку клетки примерно 90 % опухолей человека обладают теломеразной активностью, можно утверждать, что теломеразная активность — наиболее общий маркер рака и реактивация теломеразы участвует в онкогенезе. Важно осознавать, что теломераза не является причинным фактором в канцерогенезе, а лишь позволяет опухолевым клеткам достигать поздних злокачественных стадий.

Прежде всего стоит отметить, что в большинстве случаев теломеразная активность растет по мере развития опухоли (табл. 2). Корреляция теломеразной активности со злокачественностью показана при раке желудка и толстой кишки, раке печени, опухолях простаты, почек и кожи [75].

Таблица 2. Рост теломеразной активности по мере прогрессирования опухоли [76]

Вид ткани	Случаи обнаружения теломеразной активности	В среднем
Нормальная ткань, прилегающая к опухоли	367 из 2350	15,5 % (0–100)
Преинвазивные опухоли	410 из 1391	29,5 % (0–67)
Злокачественные опухоли	3615 из 4304	84 % (9–100)

Доля опухолей, обладающих теломеразной активностью, зависит от типа клеток (табл. 3). Например, теломеразной активностью обладает около 10 % анапластических

астроцитом, 75 % глиобластом и 100 % олигодендроглиом, 93 % случаев рака молочной железы, 80 % рака легких. При мелкоклеточном раке легкого в 100 % случаев обнаруживается высокую теломеразную активность [75].

Таблица 3. Теломеразная активность опухолей различного происхождения [76]

Локализация опухоли	Ежегодная смертность	Случаи обнаружения теломеразной активности
Респираторный тракт	165 600	431 из 541 (80 %)
Желудочно-кишечный тракт	130 000	1136 из 1330 (85 %)
Репродуктивная система	66 900	709 из 801 (89 %)
Кровотворная система	59 200	117 из 157 (75 %)
Молочная железа	43 900	777 из 896 (87 %)
Выделительная система	24 700	392 из 443 (89 %)

ТЕЛОМЕРАЗА И ТЕЛОМЕРЫ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

Многие нормальные клетки крови и костного мозга обладают теломеразной активностью, что затрудняет интерпретацию результатов ее измерения при онкогематологических заболеваниях. Уровень теломеразной активности зависит от возраста пациента — с возрастом она уменьшается. Стоит подчеркнуть, что современный способ измерения теломеразной активности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) не вполне количественный. Он не позволяет зафиксировать различия в 2 раза (а только в несколько раз). При этом нельзя узнать, обусловлена ли эта активность малым количеством клеток с большой активностью или большим количеством клеток — с малой. Поскольку в измерении участвует ПЦР, осуществляемая с одинаковой последовательностью ДНК, возможны ложноположительные результаты. Кроме того, теломеразная активность клеток зависит от их пролиферативного состояния, при переходе в состояние покоя или при индукции дифференцировки теломеразная активность может значительно снижаться [77].

В силу перечисленных выше трудностей теломеразную активность определяют вместе с измерением длины теломер. Комбинация двух тестов (теломеразная активность и длина теломер) значительно более информативна. Длину теломер измеряют с помощью Саузерн-анализа как длину концевых рестрикционных фрагментов либо проводят количественную флуоресцентную гибридизацию *in situ*. В последнее время для оценки средней длины теломер стали применять мето-

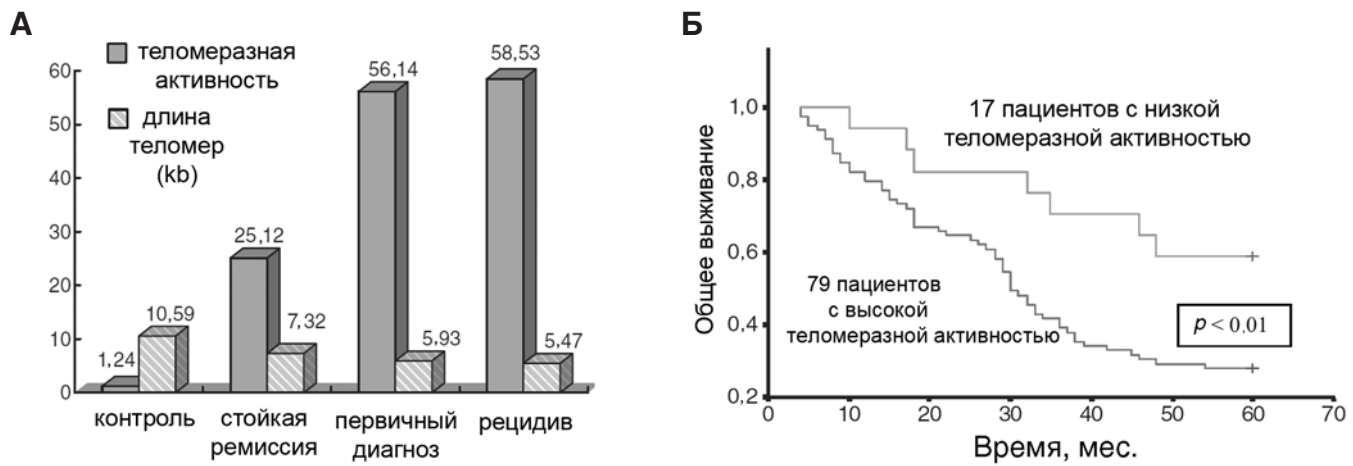


Рис. 7. (А) Теломеразная активность и длина теломер у здоровых лиц и пациентов в разных фазах острого лейкоза. (Б) Кривые выживания пациентов с острым лейкозом в зависимости от теломеразной активности [87]

дики количественной ПЦР в реальном времени либо анализ гибридизации клеток в потоке.

Гематологические неоплазии на начальной стадии можно рассматривать как случай усиленной пролиферации клеток. Длина теломер уменьшается при пролиферации клеток *in vivo*, что находит свое отражение в уменьшении длины теломер с возрастом. Существуют формулы для расчета длины теломер с поправкой на возраст пациента [78]. Длина теломер мононуклеарных клеток крови очень мало отличается от таковой в костном мозге [79].

Уменьшение длины теломер ниже критической ведет к дестабилизации теломер, появляются теломерные слияния, образуются дицентрики, начинает работать механизм слияние—мост—разрыв, который генерирует клетки с новым кариотипом. Генетическая изменчивость многократно возрастает, повышается вероятность образования более злокачественных и устойчивых к терапии клеток. Поскольку в клинической практике мы имеем дело с результатом клональной селекции неопластических клеток, а дицентрики плохо выживают, их количество кажется заниженным [80].

Острые лейкозы

В большинстве случаев при острых лейкозах происходит уменьшение длины теломер как результат усиленной пролиферации. Теломеразная активность и длина теломер обратно пропорциональны друг другу. При рецидиве теломеразная активность достигает высших значений при минимальной длине теломер. Во время ремиссии теломеразная активность снижается и наблюдают нормализацию длины теломер [81].

В некоторых случаях острых лейкозов не происходит укорочения теломер из-за сильной индукции теломеразы. 70–86 % пациентов с острым лейкозом имеют повышенную теломеразную активность в момент постановки диагноза [82]. Высокая теломеразная активность обычно наблюдается у пациентов с потерей 7/7q и с изменениями 11q23. Вместе с высокой теломеразной активностью это очень плохой прогностический признак [83]. Высокая теломеразная активность вместе с короткими теломерами является очень плохим прогностическим признаком при острых Т-клеточных лейкозах у взрослых (время выживания 0,47 года против 4,21 года у пациентов с низкой теломеразной активностью и нормальной длиной теломер) [84].

Повышенная теломеразная активность может быть плохим прогностическим признаком при остром миелоидном лейкозе у детей и относительно хорошим — у взрослых (в зависимости от других критериев) [85]. У пациентов с острым лейкозом повышена частота мутаций гена белко-

вого компонента теломеразы [86]. На рис. 7 приведены данные, наглядно показывающие соотношение длины теломер и теломеразной активности, а также прогностическое значение высокой теломеразной активности при острых лейкозах.

Хронические лейкозы

При **хроническом миелолейкозе** динамика теломеразной активности и длины теломер напоминает острый лейкоз. Как показано на рис. 8, средняя длина теломер в лейкоцитах периферической крови, несущих филадельфийскую хромосому, в среднем на 1000 нуклеотидов меньше контрольных.

Во время бластного кризиса теломеры резко укорачиваются (примерно на 1000 нуклеотидов), а теломеразная активность растет. В ответ на успешную терапию ингибитором тирозинкиназы (иматиниб) длина теломер в клетках периферической крови возрастает примерно на 500 оснований [88].

Для **хронического лимфолейкоза** длина теломер может служить независимым показателем прогноза и тяжести течения заболевания (вероятность развития синдрома Рихтера). В работе [89], проведенной на сотнях пациентов и охватывающей срок до 10 лет, в качестве показателя была выбрана средняя длина теломер в лимфоцитах крови 5000 нуклеотидов. Разделив всех пациентов на группы, имеющие теломеры больше или меньше этой величины, авторы показали чрезвычайно значимые прогностические отличия. В аналогичной работе показано, что резистентные к терапии формы хронического лимфолейкоза имеют чрезвычайно короткие теломеры — около 3000–4000 нуклеотидов (рис. 9).

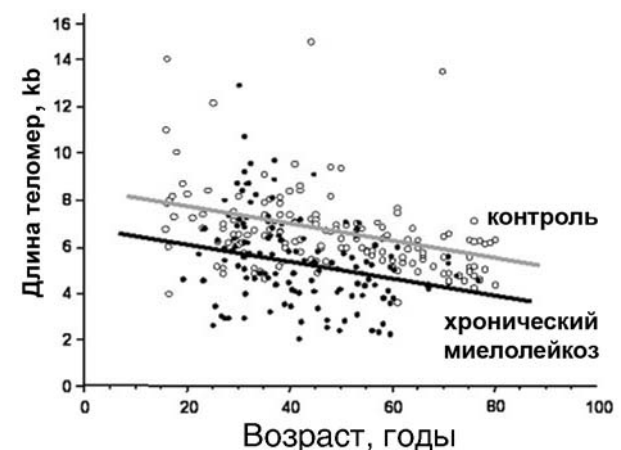


Рис. 8. Средняя длина теломер в лейкоцитах периферической крови при хроническом миелолейкозе [88]

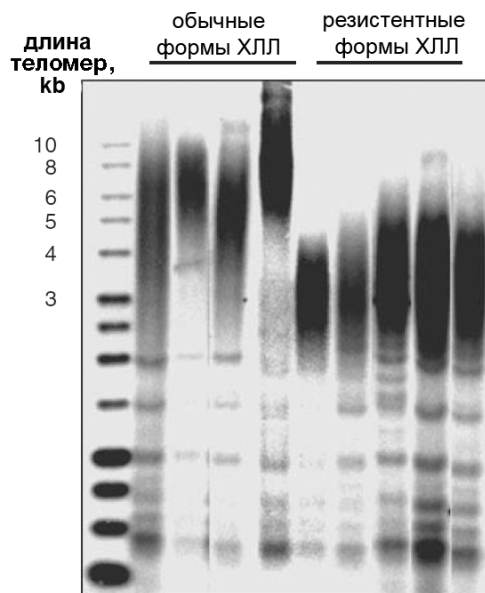


Рис. 9. Длина теломер лейкоцитов периферической крови больных хроническим лимфолейкозом, измеренная по Саузерну [90]

Миелодиспластические синдромы

Миелодиспластические синдромы (МДС), несмотря на различия в этиологии, обычно сопровождаются укорочением теломер [91]. Укорочение теломер коррелирует с цитогенетическими изменениями и изменениями микросателлитной ДНК. При МДС, как и в случае лейкозов вообще и апластических состояний, часто находят мутации в генах теломеразы [92].

МДС, по современным представлениям, начинаются с нарушений гемопоэза, которые преодолеваются опухолевыми клетками путем увеличения устойчивости к апоптозу и последующим выходом из-под контроля иммунной системы (рис. 10).

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ТЕЛОМЕРАЗой

Иммунотерапия

Поскольку теломераза присутствует в большинстве опухолевых клеток, она является хорошим кандидатом на роль антигена, связанного с опухолями. При функционировании теломеразы в клетке фрагменты теломеразной обратной

транскриптазы экспонируются на клеточной поверхности и могут служить мишенью для иммунного ответа. Возможно усиление иммунного ответа, если фрагменты белка hTERT будут появляться на поверхности антигенпредставляющих клеток пациента, прежде всего на дендритических клетках и макрофагах. Выделен ряд пептидов (кусков белка hTERT), которые связываются с антигенами главного комплекса гистосовместимости I класса (HLA-A2.1), представленными на поверхности значительной доли лимфоцитов [94]. Происходит специфическое усиление иммунитета против антигенного пептида. Потенциальное достоинство такой процедуры заключается в отсутствии длительного периода ожидания, как при различных методиках подавления теломеразы. Клинические испытания по специфическому усилению иммунного ответа против белка hTERT были проведены для опухолей простаты [95], рака поджелудочной железы [96] и гепатоцеллюлярной карциномы [97].

Все эти вакцины показывают усиление иммунного ответа против опухоли. Неясно, насколько могут пострадать здоровые стволовые клетки, которые также обладают теломеразной активностью.

Использование промоторов теломеразы (hTERT и hTR)

Пока не найдены препараты, способные эффективно подавлять экспрессию генов теломеразы, зато разработаны подходы, использующие сам факт активной работы промоторов теломеразы в опухолевых клетках.

До клинических испытаний дошли конструкции в составе онколитического аденовируса, который инъецируется непосредственно в опухоль [97, 98]. В составе вируса имеются гены, повышающие чувствительность клеток к предложенной терапии. Поскольку эти гены регулируются промоторами генов теломеразы, то их действие распространяется только на клетки с работающей теломеразой.

Методы подавления теломеразы

Все методы подавления теломеразы страдают одним серьезным недостатком: эффект наступает с большой задержкой, поскольку должно пройти достаточно времени для того, чтобы в отсутствие теломеразы теломеры укоротились за счет недорепликации. Это время может составлять десятки клеточных циклов.

Антисмысловые стратегии основаны на взаимном узнавании (гибридации) нуклеиновых кислот внутри клетки.

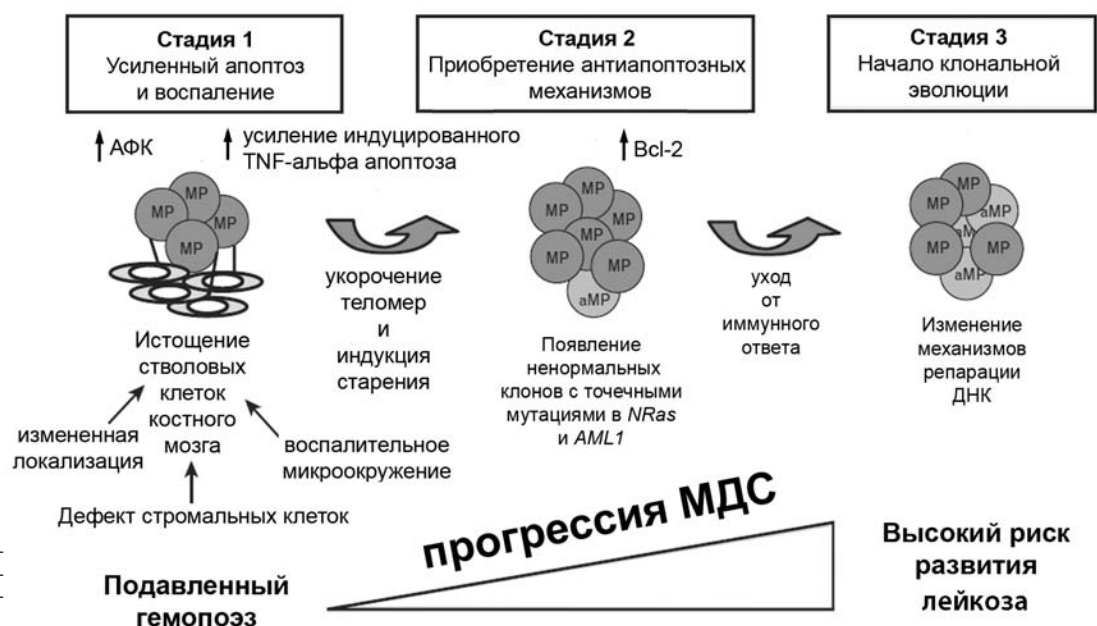


Рис. 10. Возможные молекулярные события при прогрессии миелодиспластического синдрома [93]

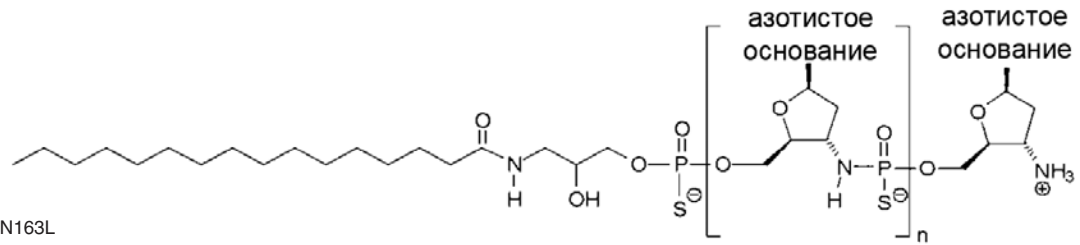


Рис. 11. Структурная схема GRN163L

Вводимые антисмысловые последовательности соединяются со смысловыми (необходимыми для функционирования теломеразы) и блокируют их.

Практически эффективным может быть введение в клетки олигонуклеотидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы. Обычно применяют олигонуклеотиды, направленные против матричного района теломеразной РНК. Используют олигонуклеотиды с фосфоротиоатными связями (для увеличения устойчивости к нуклеазам), пептидные нуклеиновые кислоты (для увеличения стабильности гибрида), 2'-О-метил-РНК и 2'-метоксиэтокси-РНК [75]. Эти соединения характеризуются повышенной устойчивостью к нуклеазам и повышенной специфичностью. Самым успешным соединением этого типа является GRN163L (рис. 11). К устойчивому к деградации олигонуклеотиду добавлен жирнокислотный хвост, способствующий проникновению в клетку. С этим соединением был проведен ряд клинических испытаний по терапии хронического лимфолейкоза, некоторых солидных опухолей и немелкоклеточного рака легкого [97, 99].

Опосредованное теломеразой лечение рака — охота за раковыми стволовыми клетками

Часть опухолевых клеток способна переходить в длительно неделящееся состояние и тем самым избегать действия большинства химиотерапевтических агентов. С другой стороны, если полностью подавить действие теломеразы, то 90 % опухолей не смогут развиваться. Однако, как говорилось выше, подавляя лишь теломеразу, нельзя получить быстрого эффекта, необходимого для лечения. Ингибиторы теломеразы могут быть эффективны только при малом количестве клеток. Значит, если лечение будет сочетать в себе традиционные методы, действующие немедленно и уничто-

жающие основную массу опухоли, и антителомеразную терапию, не позволяющую длительно размножаться отдельным способным к этому клеткам (например, раковым, стволовым), то результат, особенно в длительной перспективе, будет неизмеримо лучше [98] (рис. 12).

КОРРЕЛЯЦИЯ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК И РАЗВИТИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ

На сегодняшний день ясно, что старение клеток — процесс более сложный, чем репликативное старение клеток, а укорочение теломер определяется не только недорепликацией, но и недорепарацией, а возможно, и другими процессами. Старение клеток включает в себя любые процессы, ведущие к нарушению клеточных функций. Для длительно неделящихся клеток (мышечных, нервных) это преимущественно нарушения в работе митохондрий, повреждения внутренних районов ДНК, для делящихся клеток — укорочение теломер. Известно, что окислительный стресс способен существенно (на порядок) увеличивать размер потерь концевой ДНК, связанных с клеточным размножением. В неделящихся клетках активные формы кислорода и азота также вызывают повреждения ДНК, которые накапливаются со временем. Практически все патологии, так или иначе, приводят к увеличению окислительного стресса. Окислительный стресс может иметь локальное воздействие, но способен распространяться практически по всему организму. Результатом этих процессов служит чрезмерное укорочение теломер, которое на каком-то этапе становится не только следствием патологии, но и ее движущей силой, препятствующей клеточному размножению, а значит, регенерации. Клетки с короткими теломерами теряют генетическую стабильность и могут становиться родоначальниками опухолей.

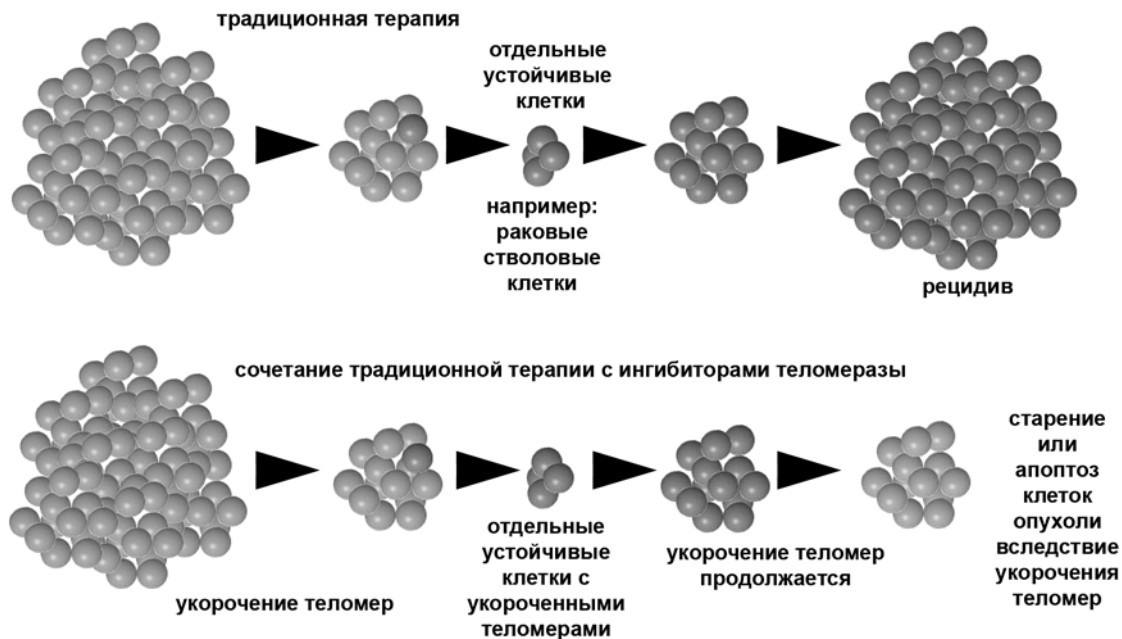


Рис. 12. Схема сочетания традиционной терапии с ингибиторами теломеразы

При циррозе печени, независимо от этиологии болезни (вирусный гепатит, аутоиммунный гепатит, алкоголизм, склерозирующий холангит, первичный билиарный цирроз) и возраста пациента, наблюдают укорочение теломер в гепатоцитах, но не в клетках крови и не в звездчатых клетках. Таким образом, усиленное повреждение и пролиферация гепатоцитов вызывают их преждевременное старение и замещение соединительной тканью [100].

В зонах атеросклеротических повреждений клетки эндотелия аорты имеют укороченные теломеры [101]. Также при болезнях коронарных сосудов теломеры эндотелиальных клеток становятся существенно короче [102]. Ряд случаев диабета типа 2 объясняют старением и недостаточностью пролиферации β -клеток [103]. Снижение плотности костей и остеопороз связаны с укорочением теломер [104] и репликативным старением остеобластов [105]. Причиной поседения волос может быть старение меланобластов [106]. Ухудшение с возрастом работы иммунной системы объясняют старением ГСК и т.д. В список патологий при желании можно включить практически все болезни, связанные с возрастом [107].

В 2007 г. появились первые прямые доказательства того, что стволовые клетки меняются с возрастом, стареют. Было показано, что ГСК мыши с возрастом накапливают повреждения ДНК, что определили по уровню фосфорилирования гистона H2AX (γ -H2AX), который накапливается при разрывах ДНК. У старых животных до 70 % стволовых клеток имеют множественные районы, содержащие этот гистон, у молодых он практически отсутствует [108]. Одновременно с этими данными появилась работа, показавшая, что старение стромальных клеток костного мозга, но не ГСК определяет возрастные нарушения функций ГСК [109]. При этом старение стромальных клеток прямо коррелирует с укорочением их теломер. Таким образом, снижение функциональности стволовых клеток может определяться как накоплением повреждения в самих стволовых клетках, так и репликативным старением окружения этих клеток.

К такому же выводу ранее пришли ученые, изучавшие мышечные стволовые клетки. С возрастом резко снижается их способность к регенерации, опосредованной окружением. Иными словами, стареющие ниши стволовых клеток снижают функциональные способности самих стволовых клеток. При этом действие ниши, как и в случае ГСК, включает в себя гуморальные факторы [110].

Гуморальные факторы способны объединить весь организм в одну большую супернишу для всех стволовых клеток и не только. Такая ниша способна одновременно влиять на самые разнообразные клетки. Имеет смысл рассмотреть два примера того, как взаимосвязаны отдельные клетки с состоянием всего организма. Известно, что теломеры клеток периферической крови укорачиваются с возрастом. Но также известно, что они преждевременно укорачиваются у пациентов с инфарктом миокарда, развитым атеросклерозом, болезнью Альцгеймера, васкулярной деменцией, при развитии солидных опухолей, действии эмоционального стресса [111].

Другой пример. В. J. Cristofalo в своей замечательной работе 1998 г. [112] установил, что хотя с возрастом сокращается пролиферативный потенциал фибробластов кожи человека, однако если из выборки исключить лиц, страдающих атеросклерозом, гипертензией и диабетом, то зависимость пролиферативного потенциала фибробластов кожи от возраста исчезает!

Если в случае клеток периферической крови мы можем предположить, что эти клетки, перемещаясь по организму, подвергаются самым разнообразным стрессовым воздействиям и таким образом как бы накапливают сумму повреждений, прежде всего опосредованных различными воспа-

лительными процессами (окислительный стресс), а также в связи с избыточной пролиферацией, то в случае фибробластов кожи мы должны принять, что только гуморальные воздействия способны передать действие различных патологий (атеросклероза, гипертензии и диабета) на эти клетки.

Длина теломер в клетках периферической крови имеет четкую корреляцию с прогнозом восстановления после инсульта [113]. В определенном смысле можно утверждать, что длина теломер может служить мерой здоровья человека. Соответственно изменения длины теломер могут отражать эффективность предложенной терапии. Поскольку длина теломер крайне гетерогенна, требуются дополнительные исследования, чтобы установить, какие из параметров длины наиболее значимы: средняя длина, длина минимальных теломер, распределение теломер по длине и т. п.

Работа автора получила поддержку Федерального агентства по образованию (госконтракт № П1293) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-01071а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Е.Е., Чернов Д.Н., Акимов С.С. и др. Подавление функции теломеразы аналогами нуклеозидов. Биохимия 1997; 62: 1516–27.
2. Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. Cell 1997; 88: 657–66.
3. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev. 2005; 19: 2100–10.
4. Caslini C., Connelly J.A., Serna A. et al. MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. Mol. Cell. Biol. 2009; 29: 4519–26.
5. Yegorov Y.E., Akimov S.S., Akhmalisheva A.K. et al. Blockade of telomerase function in various cells. Anti-Cancer Drug Design. 1999; 14: 305–16.
6. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 1961; 25: 585–621.
7. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. Докл. Акад. наук 1971; 201: 1496–9.
8. Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, telomerase and cancer. Sci. Am. 1996; 274: 92–7.
9. Muntori A., Reddel R.R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. Hum. Mol. Genet. 2005; 14: R191–R196.
10. Henson J.D., Hannay J.A., McCarthy S.W. et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 217–25.
11. Liu L., Bailey S.M., Okuka M. et al. Telomere lengthening early in development. Nat. Cell. Biol. 2007; 9: 1436–41.
12. Keefe D.L., Liu L., Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. Cell. Mol. Life Sci. 2007; 64: 139–43.
13. Schaetzlein S., Lucas-Hahn A., Lemme E. et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2004; 101: 8034–8.
14. Tomlinson R.L., Ziegler T.D., Supakorndej T. et al. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. Molec. Biol. Cell. 2006; 17: 955–65.
15. Ksiązek K., Passos J.F., Olijslagers S. et al. Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 362: 707–11.
16. Santos J.H., Meyer J.N., Skovvaga M. et al. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. Aging Cell 2004; 3: 399–411.
17. Bermudez Y., Erasso D., Johnson N.C. et al. Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis. Clin. Interv. Aging 2006; 1: 155–67.
18. Del Bufalo D., Rizzo A., Trisciuglio D. et al. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. Cell Death Different. 2005; 12: 1429–38.
19. Massard C., Zermati Y., Pauleau A.-L. et al. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. Oncogene 2006; 25: 4505–14.
20. Kang H.J., Choi Y.S., Hong S.-B. et al. Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. J. Neurosci. 2004; 24: 1280–7.
21. Егоров Е.Е., Молдавер М.Б., Терехов С.М. и др. Теломеризация не увеличивает способность фибробластов человека к колониеобразованию. Биол. мембраны 2004; 21: 298–305.
22. Saretzki G., Walter T., Atkinson S. et al. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells 2008; 26: 455–64.

23. Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С. и др. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках. Онтогенез 2007; 38: 105–19.
24. Go Y.-M., Jones D.P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Biochim. Biophys. Acta 2008; 1780: 1273–90.
25. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 2002; 82: 47–95.
26. Valko M., Leibfriz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2007; 39: 44–84.
27. Vickers M., Brown G.C., Cologne J.B. et al. Modelling haemopoietic stem cell division by analysis of mutant red cells. Br. J. Haematol. 2000; 110: 54–62.
28. Rufer N., Brummendorf T.H., Kolvraa S. et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. J. Exp. Med. 1999; 190: 157–67.
29. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Stem cells: hype and reality. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2002: 369–91.
30. Hiyama E., Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. Br. J. Cancer 2007; 96: 1020–4.
31. Wynn R.F., Cross M.A., Hatton C. et al. Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. Lancet 1998; 351: 178–81.
32. Scheding S., Ersoz I., Hartmann U. et al. Peripheral blood cell telomere length measurements indicate that hematopoietic stem cell turnover is not significantly increased in whole blood and apheresis PLT donors. Transfusion 2003; 43: 1089–95.
33. Weng N.P., Levine B.L., June C.H. et al. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1995; 92: 11091–4.
34. Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res. 2007; 67: 9142–9.
35. Zimmermann S., Martens U.M. Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. Cell Tissue Res. 2008; 331: 79–90.
36. Pipes B.L., Tsang T., Peng S.X. et al. Telomere length changes after umbilical cord blood transplant. Transfusion 2006; 46: 1038–43.
37. Егоров Е.Е. Теломеры, теломеразы и стволовые клетки в механизмах патологии человека. В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2009: 233–72.
38. Walter M., Davies J.P., Ioannou Y.A. Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes. J. Lipid Res. 2003; 44: 243–53.
39. Condon J., Yin S., Mayhew B. et al. Telomerase immortalization of human myometrial cells. Biol. Reprod. 2002; 67: 506–14.
40. McKee J.A., Banik S.S., Boyer M.J. et al. Human arteries engineered in vitro. EMBO Rep. 2003; 4: 633–8.
41. Klinger R.Y., Blum J.L., Hearn B. et al. Relevance and safety of telomerase for human tissue engineering. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2006; 103: 2500–5.
42. Shi S., Grontos S., Chen S. et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal cells is enhanced by telomerase expression. Nat. Biotechnol. 2002; 20: 587–91.
43. Gronthos S., Chen S., Wang C.Y. et al. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. J. Bone Miner. Res. 2003; 18: 716–22.
44. Mihara K., Imai C., Coustan-Smith E. et al. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. Br. J. Haematol. 2003; 120: 846–9.
45. Huang G., Zheng Q., Sun J. et al. Stabilization of cellular properties and differentiation multipotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture. J. Cell. Biochem. 2008; 103: 1256–69.
46. Abdallah B.M., Haack-Sorensen M., Burns J.S. et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene in despite of extensive proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 326: 527–38.
47. Jun E.S., Lee T.H., Cho H.H. et al. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. Cell. Physiol. Biochem. 2004; 14: 261–8.
48. Kang S.K., Putnam, Dufour J. et al. Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells. Stem Cells 2004; 22: 1356–72.
49. Akimov S.S., Ramezani A., Hawley T.S. et al. Bypass of senescence, immortalization, and transformation of human hematopoietic progenitor cells. Stem Cells 2005; 23: 1423–33.
50. Terai M., Uyama T., Sugiki T. et al. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16ink4a/RB braking pathway. Molec. Biol. Cell. 2005; 16: 1491–9.
51. Roy N.S., Nakano T., Keyoung H.M. et al. Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord. Nat. Biotechnol. 2004; 3: 297–305.
52. Bai Y., Hu Q., Li X. et al. Telomerase immortalization of human neural progenitor cells. Molec. Neurosci. 2004; 15: 245–9.
53. Dashinimaev E.B., Vishnyakova K.S., Popov K.V. et al. Stable culture of hTERT-transduced human embryonic neural stem cells holds all the features of primary culture. Electronic J. Biol. 2008; 4: 93–7.
54. Halvorsen T.L., Beattie G.M., Lopez A.D. et al. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro. J. Endocrinol. 2000; 166: 103–9.
55. Narushima M., Kobayashi N., Okitsu T. et al. A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. Nat. Biotechnol. 2005; 23: 1274–82.
56. Kobayashi N., Fujiwara T., Westerman K.A. et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science 2000; 287: 1258–62.
57. Noguchi H., Kobayashi N., Westerman K.A. et al. Controlled expansion of human endothelial cell populations by Cre/loxP-based reversible immortalization. Hum. Gene Ther. 2002; 13: 321–34.
58. Matsumura T., Takesue M., Westerman K.A. et al. Establishment of an immortalized human liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. Transplantation 2004; 77: 1357–65.
59. Garcia C.K., Wright W.E., Shay J.W. Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. Nucl. Acids Res. 2007; 35: 7406–16.
60. Hills M., Lansdorp P.M. Short telomeres resulting from heritable mutations in the telomerase reverse transcriptase gene predispose for a variety of malignancies. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009; 1176: 178–90.
61. Calado R.T., Regal J.A., Kleiner D.E. et al. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. PLoS ONE 2009; 4: e7926.
62. Alter B.P., Giri N., Savage S.A. et al. Cancer in dyskeratosis congenita. Blood 2009; 113: 6549–57.
63. Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. Br. J. Haematol. 2000; 110: 768–79.
64. Savage S.A., Alter B.P. Dyskeratosis congenita. Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2009; 23: 215–31.
65. Tsakiri K.D., Cronkhite J.T., Kuan P.J. et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2007; 104: 7552–7.
66. Armanios M.Y., Chen J.J.L., Cogan J.D. et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. N. Eng. J. Med. 2007; 356: 1317–26.
67. Podesta M., Piaggio G., Frassonni F. et al. The assessment of the hematopoietic reservoir after immunosuppressive therapy or bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. Blood 1998; 91: 1959–65.
68. Brummendorf T.H., Maciejewski J.P., Mak J. et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. Blood 2001; 97: 895–900.
69. Yamaguchi H., Calado R.T., Ly H. et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. N. Engl. J. Med. 2005; 352: 1413–24.
70. Finley J.C., Reid B.J., Odze R.D. et al. Chromosomal instability in Barrett's esophagus is related to telomere shortening. Canc. Epidemiol. Biomarkers Prev. 2006; 15: 1451–7.
71. Meeker A.K., Hicks J.L., Platz E.A. et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. Canc. Res. 2002; 62: 6405–9.
72. O'Sullivan J.N., Bronner M.P., Brentnall T.A. et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. Nat. Genet. 2002; 32: 280–4.
73. Roig A.I., Wright W.E., Shay J.W. Is telomerase a novel target for metastatic colon cancer? Curr. Colorect. Canc. Reports 2009; 5: 203–8.
74. Rahman R., Heath R., Grundy R. Cellular immortality in brain tumours: an integration of the cancer stem cell paradigm. Biochim. Biophys. Acta 2009; 1792: 280–8.
75. Егоров Е.Е. Теломеразы и канцерогенез. В кн.: Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007: 126–40.
76. Shay J.W., Wright W.E. Hallmarks of telomeres in ageing research. J. Pathol. 2007; 211: 114–23.
77. Егоров Е.Е., Чернов Д.Н., Акимов С.С. и др. Теломеразная активность клеток при изменениях их пролиферативного состояния. Биол. мембраны 1998; 15: 630–8.
78. Ohyashiki J.H., Ohyashiki K., Fujimura T. et al. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. Cancer Res. 1994; 54: 3557–60.
79. Yamada O., Oshimi K., Motoji T., Mizoguchi H. Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. J. Clin. Invest. 1995; 95: 1117–23.
80. Counter C.M., Avilion A.A., Lefeuve C.E. et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. 1992; 11: 1921–9.
81. Ohyashiki J.H., Ohyashiki K., Iwama H. et al. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. Clin. Cancer Res. 1997; 4: 619–25.
82. Xu D., Gruber A., Peterson C., Pisa P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. Br. J. Haematol. 1998; 102: 1367–75.
83. Zhang W., Piatyszek M.A., Kobayashi T. et al. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. Clin. Cancer Res. 1996; 2: 799–803.
84. Kubuki Y., Suzuki M., Sasaki H., Toyama T. et al. Telomerase activity and telomere length as prognostic factors of adult T-cell leukemia. Leuk. Lymphoma 2005; 46: 393–9.
85. Verstovsek S., Manshouri T., Smith F.O. et al. Telomerase activity is prognostic in pediatric patients with acute myeloid leukemia: comparison with adult acute myeloid leukemia. Cancer 2003; 97: 2212–7.

86. Calado R.T., Regal J.A., Hills M. *et al.* Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 1187–92.
87. Wang Y., Fang M., Sun X. *et al.* Telomerase activity and telomere length in acute leukemia: correlations with disease progression, subtypes and overall survival. *Inter. J. Lab. Hematol.* 2010; 32: 230–8.
88. Keller G., Brassat U., Braig M. *et al.* Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol. Oncol.* 2009; 27: 123–9.
89. Rossi D., Bodoni C.L., Genuard E. *et al.* Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1062–72.
90. Brugat T., Gault N., Baccelli I. *et al.* Aberrant telomere structure is characteristic of resistant chronic lymphocytic leukaemia Cells. *Leukemia* 2010; 24: 246–51.
91. Lange K., Holm L., Nielsen K.V. *et al.* Telomere shortening and chromosomal instability in myelodysplastic syndromes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2010; 49: 260–9.
92. Kirwan M., Vulliamy T., Marrone A. *et al.* Defining the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Hum. Mutation* 2009; 30: 1567–73.
93. Epling-Burnette P.K., List A.F. Advancements in the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* 2009; 16: 70–6.
94. Arai J., Yasukawa M., Ohminami H. *et al.* Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted anti-leukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001; 97: 2903–7.
95. Su Z., Dannull J., Yang B.K. *et al.* Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J. Immunol.* 2005; 174: 3798–807.
96. Bernhardt S.L., Gjertsen M.K., Trachsel S. *et al.* Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *Br. J. Cancer* 2006; 95: 1474–82.
97. Shay J.W., Keith W.N. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br. J. Cancer* 2008; 98: 677–83.
98. Keith W.N., Thomson C.M., Howcroft J. *et al.* Seeding drug discovery: integrating telomerase cancer biology and cellular senescence to uncover new therapeutic opportunities in targeting cancer stem cells. *Drug Discov. Today* 2007; 12: 611–21.
99. Gellert G.C., Dikmen Z.G., Wright W.E. *et al.* Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Canc. Res. Treat.* 2006; 96: 73–81.
100. Wiemann S.U., Satyanarayana A., Tshuridi M. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 2002; 16: 935–42.
101. Okuda K., Khan M.Y., Skurnick J. *et al.* Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2000; 152: 391–8.
102. Ogami M., Ikura Y., Ohsawa M. *et al.* Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 3: 546–50.
103. Yoon K.H., Ko S.H., Cho J.H. *et al.* Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 5: 2300–8.
104. Valdes A.M., Richards J.B., Gardner J.P. *et al.* Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 2007; 9: 1203–10.
105. Pignolo R.J., Suda R.K., McMillan E.A. *et al.* Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis. *Aging Cell* 2007; 7: 23–31.
106. Nishimura E.K., Granter S.R., Fisher D.E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 2005; 307: 720–4.
107. Babizhayev M.A., Savel'yeva E.L., Moskvina S.N. *et al.* Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biological age and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. *Am. J. Ther.* 2010 Mar 29. [Epub ahead of print.]
108. Rossi D.J., Bryder D., Seita J. *et al.* Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007; 447: 725–9.
109. Ju Z., Jiang H., Jaworski M. *et al.* Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat. Med.* 2007; 13: 742–7.
110. Carlson M.E., Conboy I.M. Loss of stem cell regenerative capacity with aged niches. *Aging Cell* 2007; 6: 371–82.
111. von Zglinicki T., Martin-Ruiz C.M. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Molec. Med.* 2005; 5: 197–203.
112. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J. *et al.* Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 10614–9.
113. Martin-Ruiz C., Dickinson H.O., Keys B. *et al.* Telomere length predicts post-stroke mortality, dementia, and cognitive decline. *Ann. Neurol.* 2006; 60: 174–80.



Уважаемые коллеги, для ознакомления с направлением фундаментальных исследований в онкогематологии в журнале будут периодически публиковаться рефераты отдельных статей из ведущих зарубежных изданий.

Подготовил чл.-корр. РАМН Ф.Л. Киселев



DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПОЗВОЛЯЕТ РАЗЛИЧАТЬ СУБТИПЫ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Maria E. Figueroa, Sanne Lugthart, Yushan Li et al.

Cancer Cell 2010; 17: 13–27

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — выраженно гетерогенное заболевание с биологической и клинической точек зрения. Это создает серьезные сложности для разработки эффективных терапевтических подходов и создания таргетных препаратов. В последнее время четко доказано, что в регуляции экспрессии генов важную роль играют эпигенетические изменения, при которых нарушается уровень экспрессии генов без дополнительных мутаций. Одним из таких эпигенетических механизмов является метилирование цитозина в ДНК, которое может изменять экспрессию генов, способствовать появлению новых сайтов связывания на белках-репрессорах, зависимых от метилирования, или нарушать способность транскрипционных факторов связываться с их последовательностями-мишенями. В нормальном развитии метилирование ДНК играет основную роль в дифференцировке тканей и гомеостазе. Нарушение метилирования ДНК — один из маркеров опухолевого роста. В частности, гиперметилирование супрессорного гена *p15* характерно для миелоидных неоплазм. Авторы высказывают гипотезу, что для разных форм ОМЛ существует своя специфическая картина (паттерн) метилирования.

Для доказательства этого проведен анализ профиля метилирования более 50 000 динуклеотидов CpG, которые локализованы в 14 000 уникальных локусов у 344 больных ОМЛ. Был использован разработанный специально для этой цели вариант полимеразной цепной реакции. В результате такого скрининга выявлено 16 участков (кластеров) в структуре ДНК, часть из которых коррелировала с существующими субтипами ОМЛ, в то время как другие кластеры метилирования выпадали из этой схемы. Каждый из этих субтипов ОМЛ, сегрегированный на

основании паттерна метилирования, обладал уникальной картиной метилирования по сравнению с нормальными клетками CD34+ костного мозга. Это свидетельствовало о том, что метилирование ДНК распределено не случайным образом в кластерах при ОМЛ, а имеет хорошо координированный и четко определяемый тип распределения. Выявлено также, что, хотя основной мишенью служит гиперметилирование промоторов генов, встречаются варианты, при которых происходит гипометилирование регуляторных областей генов.

Для трех вариантов ОМЛ, различающихся цитогенетически, характерен свой уникальный профиль метилирования. Для кластера 1 типичны варианты с мутациями *inv(16)* или *t(16;16)* либо наличие слитного гена *CBFB-MYH11*. Кластер метилирования 3 существенно обогащен случаями, позитивными по *t(8;21)*. Все случаи в кластере метилирования 6 содержат *t(15;17)* либо слитный ген *PML-RARA*.

В остальных 13 кластерах выявлены эпигенетические различия в вариантах с мутациями в *NPM1*, *CEBPA* и в вариантах с неэкспрессируемым геном *CEBPA*.

Специфические варианты метилирования в ОМЛ могут быть как общими, которые встречаются в различных субтипах, так и уникальными, присутствующими в каком-то одном цитогенетически верифицированном субтипе ОМЛ. Удалось идентифицировать общий aberrантный вариант метилирования, состоящий из 45 генов, большинство из которых гиперметилировано. Этот тип распределения метилирования обнаружен в 10 из 16 кластеров, и он присутствовал у 75 % больных ОМЛ. Выявлены некоторые варианты распределения метилирования, которые, возможно, могут быть использованы как факторы прогноза, но данное предположение требует дополнительной проверки.

The DLEU2/mir4-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia

КЛАСТЕР DLEU2/miR4-15A/16-1 КОНТРОЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ В-КЛЕТОК, ДЕЛЕЦИИ ВНУТРИ ЭТОГО КЛАСТЕРА ПРИВОДЯТ К ХРОНИЧЕСКОМУ ЛИМФОЛЕЙКОЗУ

U. Klein, M. Lia, M. Crespo et al.

Cancer Cells 2010; 17: 28–40

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественное поражение В-клеток с неизвестной этиологией. Наиболее характерна для этого типа лейкоза, который выявляется в большинстве случаев, потеря одного из фрагментов в локусе 13q14.3, дистального по отношению к локусу ретинобластомы. Исследование клональной эволюции при ХЛЛ показало, что гетерозиготная делеция в участке 13q14 — событие раннее, в то время как делеция второй копии этого участка происходит на более поздних стадиях и с меньшей частотой. Инактивации в белоккодирующих генах, локализованных в этом локусе, обнаружено не было. В связи с этим высказано предположение об эпигенетической регуляции данного локуса. Показано, что делеция в 13q14 связана с down-регуляцией (снижением транскрипции двух микроРНК: miR-15a и miR-16-1 в так называемом минимально делетированном участке (MDR) внутри 13q14). Поскольку известно, что микроРНК способны регулировать экспрессию сотен генов, в настоящей работе проведена попытка идентификации мишеней этих двух микроРНК. Эта работа выполнена на мышиной модели. MDR в 13q14 имеет ген *DLEU2*, содержащий кластеры miR-15a и miR-16-1 внутри интрона 4. С помощью молекулярно-генетических манипуляций были получены мыши, имеющие делеции в разных участках гена *DLEU2*. Оказалось, что через 18 мес. у 5 % животных развился моноклональный В-клеточный лимфоцитоз, предполагаемый предшественник ХЛЛ. Представляет большой интерес тот факт, что $1/5$ мышей с MDR и $1/8$ мышей с делецией в miR-

15a/16-1 имели развитую форму ХЛЛ или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому. Кроме того, у 9 % MDR и у 2 % miR-15a/16-1 был выявлен фенотип, напоминающий диффузную В-крупноклеточную лимфому — заболевание, которое с низкой частотой способно прогрессировать из ХЛЛ. Следовательно, делеции в MDR могут вызывать В-клеточные лимфопролиферативные нарушения.

Продолжительность жизни мышей с MDR была существенно ниже, чем у мышей дикого типа, в то время как делеция только по miR-15a/16-1 не оказывала влияния на продолжительность жизни. Следовательно, в составе MDR имеется как минимум еще один генетический элемент, который контролирует злокачественность заболевания. Представлены также данные, что последовательности, достаточно далекие от локуса MDR на хромосоме 13, могут оказывать серьезное влияние на клинические проявления заболевания. При реэкспрессии miR-15a/16-1 и *DLEU-2* в клеточной линии, происходящей из ХЛЛ, показано, что экспрессия *DLEU-2* не имеет воздействия на клеточную пролиферацию, в то время как miR-15a/16-1 существенно подавляет пролиферацию клеток и снижает экспрессию многих генов, участвующих в фазах G_0/G_1 -S клеточного цикла. Возможно, некоторые из этих генов служат мишенями для miR-15a/16-1. Указанные гены не участвуют в регуляции генов, связанных с апоптозом. Из полученных данных следует, что два вида микроРНК, локализованных в участке 13q14, могут выполнять контролирующие функции при развитии ХЛЛ.

The LMO2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal

ОНКОГЕН LMO2 ИНИЦИИРУЕТ ЛЕЙКОЗ У МЫШЕЙ ПУТЕМ ИНДУКЦИИ САМООБНОВЛЕНИЯ ТИМОЦИТОВ

M.P. McCormack, L.F. Young, S. Vasudevan et al.

Science 2010; 327: 879–83

Около 20 % детей и большинство взрослых с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ) обладают устойчивостью к химиопрепаратам, или у них возникают рецидивы. Основной причиной Т-ОЛЛ служит резко повышенная экспрессия транскрипционных факторов в тимусе, активация которых возникает в результате хромосомных транслокаций или делеций. Один из таких онкогенов — *LMO2*, активация экспрессии которого наблюдается у 9 % детей с Т-ОЛЛ. Прямая связь *LMO2* с ДНК отсутствует, но активация или репрессия происходят за счет его взаимодействия с другими транскрипционными факторами с образованием многомерных комплексов. Кроме того, выявлено,

что онкоген *LMO2* активируется при ретровирусном инсерционном мутагенезе. Этот феномен лежал в основе лечения 4 пациентов с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, связанным с аномалиями в X-хромосоме. Этот вид лейкоза возникает после длительной генной терапии (в среднем 31 мес.) и сопровождается дополнительными генетическими нарушениями. Такая селекция возможна только в том случае, если клетки костного мозга хозяина приобретают способность к самообновлению, которая потенциально зарезервирована в кроветворных стволовых клетках (КСК) костного мозга. Для выяснения природы этого явления отслеживали судьбу клеток у мышей, в которых он-

коген *LMO2* конститутивно (постоянно) экспрессировался в тимусе. Установлено, что *LMO2* индуцировал самообновление коммитированных Т-клеток у мышей уже за более чем 8 мес. до появления развернутой формы Т-ОЛЛ. Эти КСК сохраняли способность к дифференцировке Т-клеток и экспрессировали несколько генов, характерных для КСК. Полученные данные позволяют предполагать, что *LMO2* способен реактивировать транскрипционную программу,

специфичную для КСК. Повышенная экспрессия одного из этой группы генов (*Hhex*) оказалась достаточной для инициации самообновления тимоцитов *in vivo*. Следовательно, *LMO2* направляет самообновление предлейкозных тимоцитов. Это позволяет предполагать наличие механизма, по которому коммитированные Т-клетки могут затем накапливать дополнительные генетические мутации, что становится причиной возникновения лейкоза.

Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients

УДЛИНЕНИЕ ТЕЛОМЕР В ИНДУЦИРУЕМЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ОТ БОЛЬНЫХ С ВРОЖДЕННЫМ ДИСКЕРАТОЗОМ

S. Agrawal, Y.-H. Loh, E. McLoughlin et al.

Nature 2010; 464: 292–8

Больные с врожденным дискератозом (ВДК) страдают от многих патологических состояний. Причиной этого заболевания являются нарушения в поддержании размера теломер (повторяющихся последовательностей на концах молекулы ДНК). Индуцируемые плюрипотентные клетки (иПК), которые специфичны для каждого больного, могут представлять собой удобную модель *in vitro* для изучения таких дегенеративных заболеваний, как ВДК. Основным свойством иПК является приобретение ими способности к неограниченному самообновлению, которое сопровождается индукцией активности гена теломеразной обратной транскриптазы (*TERT*), контролирующего длину теломер. Это приводит к поддержанию размера теломер в опреде-

ленных границах. Исследовали влияние дефектов в функции теломеразы, которые могут ограничивать поддержание иПК, у больных ВДК. Показано, что репрограммирование клеток ВДК (трансфекция функционально активного гена теломеразы) способно преодолеть ограничения в уровне РНК-компонента теломеразы (TERC), поддержании размера теломер и в самообновлении. Полученные данные свидетельствуют о том, что репрограммирование восстанавливает удлинение теломер в клетках ВДК, несмотря на генетические нарушения гена теломеразы. Это позволяет предположить, что стратегия увеличения экспрессии TERC может быть терапевтически эффективной у больных ВДК и с другими заболеваниями.

Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development

КРОВЕТВОРНЫЕ СТОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПРОИСХОДЯТ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ЭНДОТЕЛИЯ АОРТЫ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

J. Y. Bertrand, N. C. Chi, B. Santoso et al.

Nature 2010; 464: 108–11

Важная задача восстановительной медицины — создать условия для образования мультипотентных тканеспецифических стволовых клеток из индуцируемых плюрипотентных клеток (иППК) для замещающей терапии. Генерация кроветворных стволовых клеток (КСК) из иППК или эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в настоящее время невозможна. Необходимо понимать механизмы возникновения КСК в процессе эмбрионального развития. Ранее показано, что гемопоэз может идти по четырем различным путям в процессе развития рыбки из семейства карповых *Danio rerio* (zebrafish) с формированием КСК на финальной стадии в тесной ассоциации с дорсальной частью аорты. Последние данные позволяют предполагать, что КСК мышей, проис-

ходящие из гемопоэтических эндотелиальных клеток (ЭК), находятся в эндотелии аорты. Данные, полученные на модельных системах, также свидетельствуют о том, что гемопоэтическое потомство ЭК возникает из предшественников с эндотелиальным потенциалом. С помощью методов визуализации в эмбрионах zebrafish исследовали образование КСК из стенки дорсальной части аорты. Используя комбинацию трех методов (флуоресцирующие трансгенные конструкции, конфокальная микроскопия и проточная цитометрия), удалось идентифицировать и выделить формы между гематогенным эндотелием и созревшими КСК. Именно эти КСК являются основными клетками в системе гемопоэза взрослых.

Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition

КРОВЕТВОРНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВОЗНИКАЮТ ИЗ ЭНДОТЕЛИЯ АОРТЫ ПУТЕМ КЛЕТОЧНОГО ПЕРЕХОДА НОВОГО ТИПА

K. Kissa, P. Herbomel

Nature 2010; 464: 112–5

Онтогенез кроветворных стволовых клеток (КСК) и его возможная связь с васкулярными эндотелиальными клетками активно обсуждаются в последнее время. Первым анатомическим органом, из которого были выделены долгоживущие клетки с потенциалом КСК, был аортогонадный мезонефрос, локализованный в эмбрионе рядом с дорсальным участком эндотелиального слоя аорты (floor). Высказывалось также предположение, что КСК впервые возникают внутри выстилающей мезенхимы аорты, мигрируя затем в дорсальную ее часть, или они могут происходить непосредственно из выстилающей мезенхимы. С помощью неинвазивного высокоразрешающего сканирования на 5 эмбри-

онах полосатой рыбки из семейства карповых (zebrafish) показано, что КСК возникают непосредственно из эндотелиального слоя аорты с помощью механизма, исключающего деление клеток из вентральной стенки аорты, но способствующего миграции через субаортальное пространство с последующей трансформацией в кроветворные клетки. Этот процесс поляризован в пространстве и зависит от экспрессии гена *Runx1*. В эмбрионах, дефицитных по этому гену, этот процесс имеет сходный характер, но происходит с меньшей частотой и сопровождается гибелью клеток. Авторы считают, что ими описан новый тип клеточного поведения, который они назвали «эндотелиальный кроветворный переход».

In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ *IN VIVO* КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК, ВОЗНИКАЮЩИХ ИЗ ЭНДОТЕЛИЯ АОРТЫ У МЫШЕЙ

J.-C. Boisset, W. van Cappelen, C. Andrieu et al.

Nature 2010; 464: 116–20

Кроветворные стволовые клетки (КСК), ответственные за продукцию зрелых клеток крови, впервые обнаруживаются в дорсальной аорте в 10,5-дневных эмбрионах мышей. Присутствие кластеров кроветворных клеток, прикрепленных к эндотелию аорты, где могут быть локализованы КСК, показано с помощью иммуногистохимических методов на фиксированных срезах эмбрионов. О природе КСК существовали противоречивые мнения, и предлагались различные кандидаты на роль прямых предшественников, включая специализированную попу-

ляцию эндотелиальных клеток с гематогенным потенциалом. Такие клетки были описаны *in vitro* в системе эмбриональных стволовых клеток и ретроспективно *in vivo* при прослеживании эндотелиального ряда. Для выяснения возможных переходов в эндотелиальном ряду при эмбриогенезе использовали конфокальную визуализацию и новый вариант процедуры диссекции. Показано динамическое возникновение фенотипически верифицированных КСК непосредственно из гематогенных эндотелиальных клеток вентральной аорты.

СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Подготовил канд. биол. наук В.Н. Агушев

Реферат подготовлен на основании анализа шести зарубежных публикаций.

A.M. Eiring, J.G. Harb, P. Neviani et al.

Согласно современной классификации ВОЗ [1], хронический миелолейкоз (ХМЛ) — одно из миелопролиферативных новообразований, вызываемых неконтролируемой пролиферацией гемопоэтических стволовых клеток. Ключевым событием для возникновения данной болезни служит хромосомная транслокация t(9;22)(q34;q11), ведущая к образованию так называемой филадельфийской (Ph) хромосомы. В результате данной транслокации, обнаруживаемой у 95 % больных ХМЛ, появляется химерный ген *BCR-ABL1*,

в большинстве случаев кодирующий белок с массой около 210 кДа. Этот белок (обозначаемый p210 BCR-ABL) обладает выраженной тирозинкиназной активностью, влияющей на целый ряд клеточных сигнальных путей, в т.ч. стимуляцию пролиферации, подавление апоптоза и нарушение дифференцировки клеток.

Молекулярные механизмы развития и прогрессии ХМЛ являются в настоящее время предметом пристального изучения многих исследовательских групп. В частности, дан-

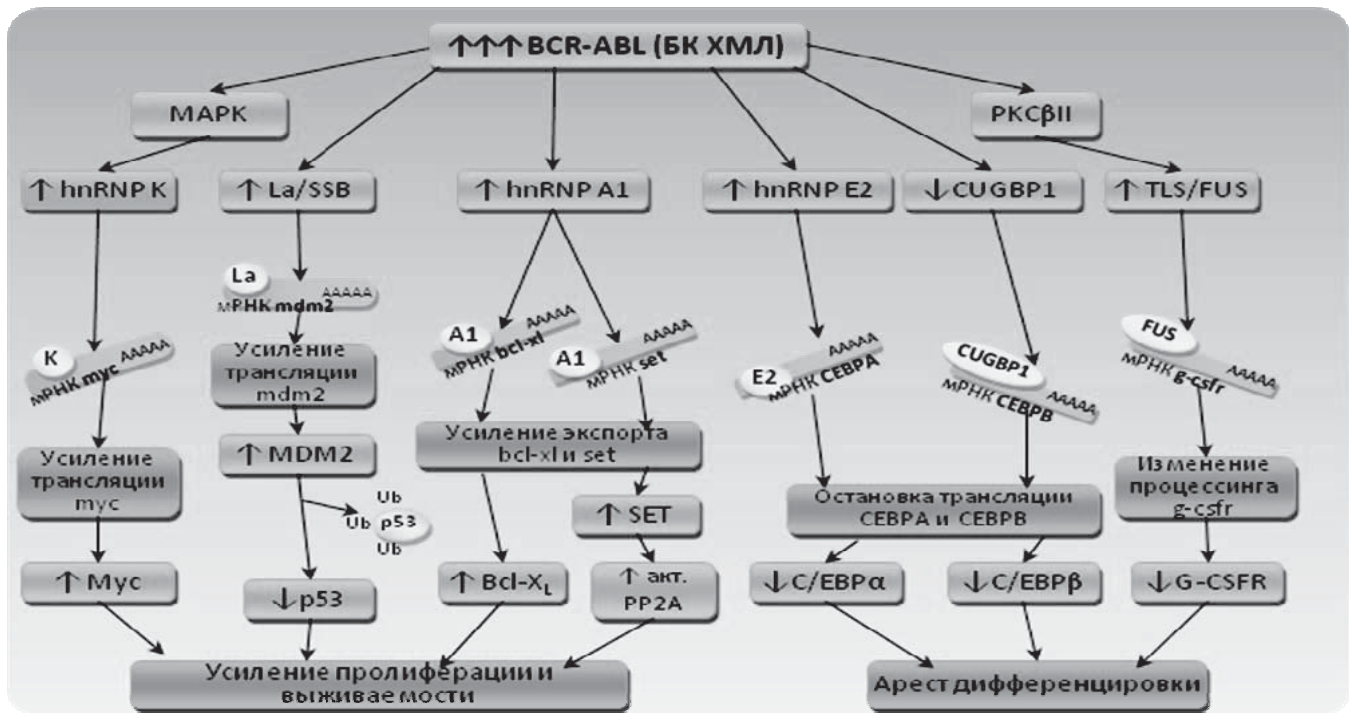


Рис. 1. Роль РНК-связывающих белков в прогрессии хронического миелолейкоза [2]

ной тематике посвящен целый ряд работ, выполненных по Программе генетики рака в Университете Огайо под руководством д-ра Данило Перротти (Dr. Danilo Perrotti, Human Cancer Genetics Program, Ohio State University). Они продемонстрировали, что ключевую роль в прогрессии ХМЛ может играть изменение экспрессии ряда РНК-связывающих белков, в т. ч. гетерогенных ядерных рибонуклеопротеидов К и Е2 (hnRNP К, hnRNP Е2) (рис. 1) [2]. Например, было показано [3], что экспрессия р210 BCR-ABL посредством активации пути MAPK (ERK1/2) ведет к повышению уровня рибонуклеопротеида hnRNP К. Этот белок связывается с мРНК онкогена *Мус*, усиливая его трансляцию; повышение уровня онкобелка *Мус*, в свою очередь, стимулирует пролиферацию и выживание клеток. В работе [4] авторы показали, что еще одной мишенью пути BCR/ABL-MAPK служит hnRNP Е2. Этот рибонуклеопротеид связывается с мРНК другого белка — транскрипционного фактора *С/ЕВР α* , но в отличие от hnRNP К не усиливает, а подавляет трансляцию этой мРНК. *С/ЕВР α* — фактор дифференцировки миелоидных предшественников, и его подавление играет важную роль в прогрессии ХМЛ [5].

Изучению деталей регуляции пути BCR/ABL-MAPK-hnRNP Е2-*С/ЕВР α* посвящена работа, опубликованная в мартовском номере «Cell», группы авторов из нескольких институтов США, Канады и Дании под общим руководством Д. Перротти [6].

В поисках молекулярных компонентов, участвующих в прогрессии хронического миелолейкоза (ХМЛ) от хронической фазы к бластному кризу (БК), авторы сравнивали экспрессию микроРНК в клетках пациентов на соответствующих стадиях болезни, а также в клеточных линиях с разным уровнем активности BCR/ABL. Среди 505 исследованных микроРНК было обнаружено 34 микроРНК, уровень экспрессии которых повышался при переходе в бластную стадию, и 14 микроРНК, уровень которых снижался. Ко второй группе относилась, в частности, микроРНК miR-328, которая и стала объектом описываемого исследования.

Оказалось, что экспрессия miR-328 действительно падает в фазе БК ХМЛ и восстанавливается при подавлении BCR/ABL с помощью иматиниба. Дальнейшие исследования показали, что по своей структуре данная микроРНК сходна с мРНК белка *С/ЕВР α* — одного из ключевых факторов дифференцировки миелоидных клеток. Авторы обнаружили, что miR-328 связывается с белком hnRNP Е2, тем самым вытесняя его из комплекса с мРНК *С/ЕВР α* , что приводит к восстановлению трансляции *С/ЕВР α* , потерянной в ходе прогрессии ХМЛ. Введение miR-328 в BCR/ABL-трансформированные клетки (в т. ч. клетки CD34+ у пациентов с БК ХМЛ) стимулировало их дифференцировку. Кроме того, у miR-328 обнаружилась и классическая мишень — онкобелок PIM1, стимулирующий выживаемость клеток BCR/ABL+.

Таким образом, в данной работе авторы не только подтвердили ключевую роль рибонуклеопротеидов hnRNP К и hnRNP Е2 в прогрессии ХМЛ, но и продемонстрировали участие микроРНК miR-328 в реализации этих сигнальных путей. Примечательно, что для miR-328 показано наличие как канонической мишени (онкобелка PIM1), так и неклассического пути воздействия за счет мимикрирования последовательности мРНК *СЕВР α* .

ЛИТЕРАТУРА

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (eds.) WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC-press, 2008.
2. Perrotti D., Neviani P. From mRNA metabolism to cancer therapy: chronic myelogenous leukemia shows the way. Clin. Cancer Res. 2007; 13(6): 1638–42.
3. Notari M., Neviani P., Santhanam R. et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. Blood 2006; 107(6): 2507–16.
4. Chang J.S., Santhanam R., Trotta R. et al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBP α -driven myeloid differentiation. Blood 2007; 110(3): 994–1003.
5. Ferrari-Amorotti G., Keeshan K., Zattoni M. et al. Leukemogenesis induced by wild-type and STI571-resistant BCR/ABL is potently suppressed by C/EBP α . Blood 2006; 108(4): 1353–62.
6. Eiring A.M., Harb J.G., Neviani P. et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. Cell 2010; 140(5): 652–65.

Симпозиум по хроническому миелолейкозу (апрель 2010 г., Санкт-Петербург)

Подготовил С. В. Кузнецов

ИНГИБИТОРЫ ТИРОЗИНКИНАЗ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Огромные изменения, которые на глазах всего одного поколения врачей перенесло лечение хронического миелолейкоза (ХМЛ), заставили в течение последнего десятилетия радикально пересмотреть не только стандарты лечения, но и методы лабораторного контроля за его ходом, критерии успеха и само понятие о его эффективности, а также прогностические факторы. Появились новые, незнакомые прежде гематологам проблемы с токсичностью терапии, в то время как значимость предыдущих — уменьшилась. Перестали казаться немыслимыми слова «беременность при ХМЛ», и начал задаваться вопрос: «А нельзя ли снять больного с лечения?». Вошли в жизнь и заняли в ней неотъемлемое (как кажется сегодня) место представлявшие раньше сугубо научный интерес методы молекулярно-генетического анализа.

Данный обзор написан по материалам докладов проф. Giuseppe Saglio (Туринский университет, Турин, Италия); иллюстрации были любезно предоставлены фирмой Novartis.

Виды ответов на лечение ХМЛ

Современные взгляды на лечение ХМЛ, критерии его эффективности и методы ее оценки наиболее полно отражены в рекомендациях финансируемой Евросоюзом некоммерческой организации European LeukemiaNet (ELN), впервые опубликованных в 2006 г. и дополненных в 2009 г. Эти рекомендации выделяют три вида ответа на лечение: 1) неэффективность (достижение успеха маловероятно, больной нуждается в переходе на другую терапию); 2) недостаточный, или субоптимальный, ответ (при продолжении лечения ответ может сохраняться

долго, но шансы на достижение успеха снижены, возможен перевод больного на другую терапию); 3) оптимальный ответ (нет указаний на то, что изменение лечения может улучшить его результаты, перевод на другую терапию не показан). Кроме того, было введено понятие «настороженности», оно относится к тем изменениям, которые могут быть прогностически неблагоприятны и требуют более пристального контроля со стороны врача. Критерии каждого из этих ответов приведены на рис. 1 (цветом выделены изменения, внесенные в Рекомендации 2009 г.).

Оптимальным в настоящее время признается достижение полного гематологического ответа (ПГО) после 3 мес., большого цитогенетического ответа (БЦО) — после 6 мес., полного цитогенетического ответа (ПЦО) — после 12 мес. и большого молекулярного ответа (БМО) — после 18 мес. терапии иматинибом. Исследования группы GIMEMA, исследование IRIS и другие показали, что отсутствие ПГО, любого ЦО (> 95 % Ph+ метафаз) или минимальный ЦО (> 65 % Ph+ метафаз) после 3 мес. терапии снижали шансы достичь в последующем ПЦО при терапии иматинибом до менее 10, 13 и 50 % соответственно. Поэтому к этому сроку оптимальным ответом будет достижение ПГО и, по крайней мере, малого ЦО (< 65 % Ph+ метафаз). После 6 мес. оптимальным считается достижение БЦО, а через 12 мес. — ПЦО. Анализ кри- вых выживаемости на рис. 2 показывает, что отсутствие ПЦО (> 1 % BCR-ABL) значительно снижает выживаемость. Различия в выживаемости больных, достигших БМО и только ПЦО (без БМО) к 18 мес., не столь

велики, тем не менее высоко достоверны ($p = 0,01$), что подтверждает практическую значимость достижения БМО (рис. 3). Сама же выживаемость без прогрессирования у больных с БМО к 12 и 18 мес. достигает 100 и 98 % соответственно, доказывая огромную значимость этого уровня ответа. В то же время риск трансформации в фазу акселерации (ФА) или бластный криз (БК) обусловлены прежде всего достижением ПЦО, независимо от его срока (рис. 4).

Контроль ответа на лечение

Рекомендуемая частота проведения контрольных исследований приведена на рис. 5. Стоит обратить внимание на то, что основу контроля за терапией постепенно начинает составлять молекулярно-генетическое исследование. Если ранее цитогенетическое исследование предполагалось проводить в обязательном порядке каждые полгода всем больным, то теперь при ПЦО и доступности количественной ПЦР его проводить уже необязательно. В то же время стандартное цитогенетическое исследование остается необходимым при потере ответа на лечение для исключения дополнительных хромосомных аномалий.

С внедрением количественной ПЦР и стандартизацией методики стало возможным сопоставление остаточной массы лейкозных клеток и различных видов ответа. Так, достижение БЦО означает уменьшение массы опухоли примерно на 1 порядок от исходной (> 10¹² клеток), ПЦО — на 2 порядка, БМО — на 3 порядка, ПМО — на 5 порядков (предел чувствительности метода). Чуть более чувствительной (6 порядков) считается ка-

чественная ПЦР. Выявление меньшей массы лейкозных клеток имеющимися методами невозможно. Схематически соотношение массы лейкозных клеток с различными уровнями ответа показано на рис. 6.

Преимущества молекулярно-генетических методов контроля суммированы на рис. 7. В прошлом применение этих методов существенно осложнялось расхождением результатов исследований, проведенных в разных лабораториях. Прежде всего, они были вызваны использованием разных контрольных генов. В последние 5 лет была проведена большая работа по стандартизации методики, которая завершилась созданием стандартных образцов РНК и построенной на этой основе международной шкалы (International Scale, IS). С ее внедрением была достигнута высокая степень совпадения результатов, получаемых различными лабораториями, что позволяет достоверно оценивать результаты лечения больных в различных странах.

Наблюдение за молекулярным ответом у больных в исследовании IRIS обнаружило, что с годами он постепенно нарастает. На рис. 8 показано значительное нарастание уровня молекулярных ответов после 4 лет терапии. Появившаяся ныне возможность с большой точностью оценивать остаточную болезнь позволила задаться вопросом о судьбе больных с ПМО и даже о принципиальной возможности выздоровления при терапии ингибиторами тирозинкиназ. Группа французских исследователей (F.-X. Mahon и соавт.) провела исследование STIM (STop IMatinib). В нем была предпринята попытка отменить иматиниб у больных, получавших его не менее 3 лет и не менее 2 лет имевших ПМО. На рис. 9 показана кривая выживаемости; видно, что 41 % больных сохраняют ПМО, несмотря на полную отмену терапии. Судьбу отдельных больных можно проследить на рис. 10. Показательно, что практически все молекулярные рецидивы случались в первые 6 мес. после отмены иматиниба и повторное его назначение вело к восстановлению ответа.

Резистентность и непереносимость иматиниба

Иматиниб хорошо переносится и помогает в большинстве случаев. Однако части больных требуется иная терапия в связи с побочными эффектами или неэффективностью лечения. Под непереносимостью имеют в виду в первую очередь негематологическую ток-

сичность III–IV степени по шкале СТС, несмотря на оптимальную сопроводительную терапию, либо токсичность II степени, сохраняющуюся на фоне этой сопроводительной терапии в течение месяца и более, либо требующую более 3 перерывов в лечении. В отношении гематологической токсичности, особенно в поздних стадиях болезни, критерии непереносимости менее жесткие. Резистентностью называется отсутствие ПГО после 3 мес., минимального ЦО после 6 мес. и БЦО после 12 мес. терапии (первичная резистентность), либо утрата достигнутого ранее ответа, либо появление дополнительных хромосомных аномалий (клональная эволюция), сохраняющихся при терапии иматинибом в дозе 600 мг/сут и выше или при дозе менее 600 мг/сут при одновременном обнаружении мутаций L248, G250, Q252, Y253, E255, T315, F317 и H396 киназного домена BCR-ABL. По данным исследования IRIS (8 лет наблюдения), первичная резистентность наблюдалась в 3 % случаев, вторичная — в 12 % и непереносимость — в 6 %.

Еще 5 лет назад единственным выходом для подобных больных (не считая возможности повышения дозы до 600–800 мг/сут при развитии резистентности) было возвращение к интерферону- α или химиотерапии. Однако сегодня, с появлением ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) II поколения, ситуация значительно изменилась. На сегодняшний день в России зарегистрировано два подобных препарата: дазатиниб и нилотиниб.

Сравнительная активность *in vitro* всех трех разрешенных к применению ИТК при ХМЛ представлена на рис. 11. На нем показано, что иматиниб, будучи препаратом, предназначенным прежде всего для лечения ХМЛ, обладает максимальной активностью против c-Kit и рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) (что позволяет, например, использовать его в малых дозах при лечении гиперэозинофильного синдрома), а два других препарата — более высокой активностью против BCR-ABL. Если спектр действия нилотиниба весьма узок (он наиболее активен против BCR-ABL), что позволяет иметь при тех же дозах, что и у иматиниба, меньше побочных эффектов, то у дазатиниба весьма широкий спектр действия (благодаря преимущественному действию на Src-киназы), что делает его особенно полезным при поздних стадиях болезни, когда в геноме могут появляться иные, отличные от BCR-ABL, поломки. Кроме того, весьма существенно, что оба препарата об-

ладают высокой активностью против большинства мутантных форм BCR-ABL, что делает их пригодными при резистентности к иматинибу. Примером могут служить результаты применения нилотиниба во II фазе клинических испытаний у больных с непереносимостью иматиниба или резистентностью к нему (рис. 12). Как видно на рис. 12, даже у резистентных больных препарат позволял получить 56 % БЦО (в т.ч. 41 % ПЦО); при непереносимости иматиниба результаты терапии были еще выше. Важно подчеркнуть, что эти достижения были получены без увеличения токсичности лечения. В действительности, как показало последующее исследование ENESTnd (в котором нилотиниб сравнивали с иматинибом уже в качестве первой линии терапии), за исключением некоторых лабораторных отклонений и кожных изменений, которые в большинстве случаев не доходили до III–IV степени токсичности, препарат переносился лучше иматиниба.

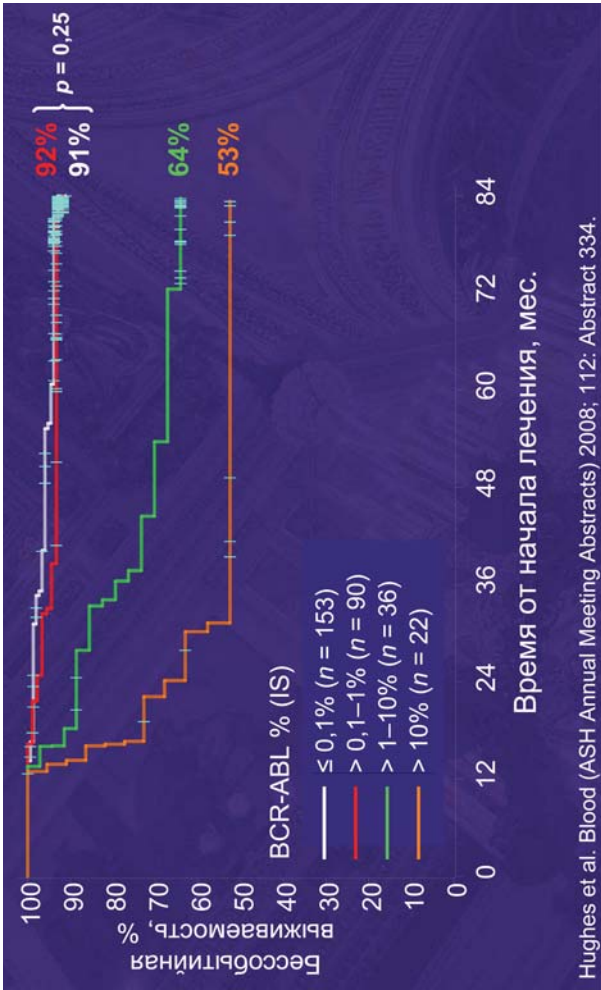
Перспективы

Несмотря на то что попытки снять с лечения некоторых больных по прошествии нескольких лет успешной терапии иматинибом нельзя назвать безуспешными, отдаленные результаты наблюдений за ними пока недоступны. Имеющиеся на сегодняшний день лабораторные исследования показывают, что ИТК не обладают активностью против лейкозных стволовых клеток. Учитывая, что больные, получавшие до этого интерферон- α , имели меньший риск рецидива после прекращения терапии, французские ученые проводят в настоящее время исследование по комбинированной терапии иматинибом с пегилированным интерфероном. Предварительные результаты, представленные на последних съездах ЕНА и ASH, дают основания надеяться на улучшение прогноза при этой терапии. Доклинические испытания показывают, что воздействия на стволовые лейкозные клетки можно добиться путем сочетания иматиниба со средствами, действующими на иные молекулярные мишени (например, ингибиторами фарнезилтрансферазы), однако эти исследования пока еще не вышли за рамки лабораторий. Учитывая, что быстрое уменьшение массы опухолей снижает риск прогрессирования болезни, в настоящее время проводятся исследования по повышению начальной дозы иматиниба, а также применению в качестве первой линии терапии ИТК II поколения: дазатиниба и нилотиниба. Применение нилотиниба позволяет достоверно повысить частоту дости-

	ОПТИМАЛЬНЫЙ ОТВЕТ	НЕДОСТАТОЧНЫЙ ОТВЕТ	НЕЭФФЕКТИВНОСТЬ	НАСТОРОЖЕННОСТЬ
До начала терапии	—	—	—	Высокий риск КХА/Рн+
3 месяца	- ПГО и - Не менее, чем малый ЦО (Рн+ > 65%)	- Нет ЦО (Рн+ > 95%)	- Менее, чем ПГО	—
6 месяцев	- Не менее, чем ЧЦО (Рн+ < 35%)	- Менее, чем ЧЦО (Рн+ > 35%)	- Нет ЦО (Рн+ > 95%)	—
12 месяцев	- ПЦО	- ЧЦО (Рн+ 35%)	- Менее, чем ЧЦО (Рн+ > 35%)	Менее, чем БМО
18 месяцев	- БМО	- Менее, чем БМО	- Менее, чем ПЦО	—
Любой срок	- Стабильность или улучшение БМО	- Потеря БМО - Мутации ¹	- Потеря ПГО - Потеря ПЦО - Мутации ² - КХА/Рн+	- Любое повышение трансскрипта - КХА/Рн+

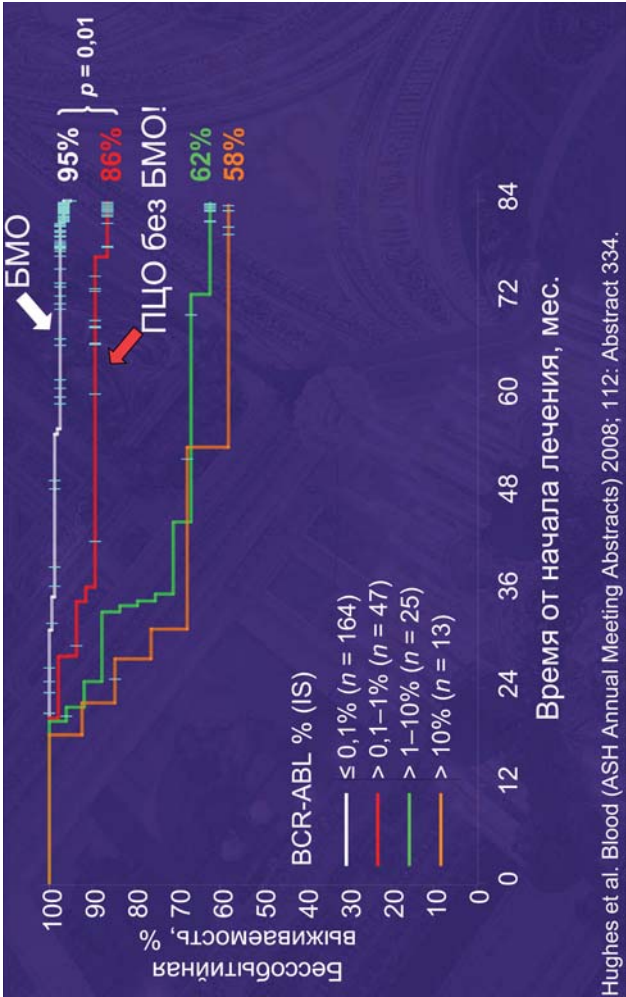
¹ Мутации, чувствительные к иматинибу.
² Мутации, нечувствительные к иматинибу.
ELN, Vassagani et al. J. Clin. Oncol. 2009; 27(35): 6041–51.

Рис. 1. Определение ответа. КХА — клональные хромосомные аномалии.



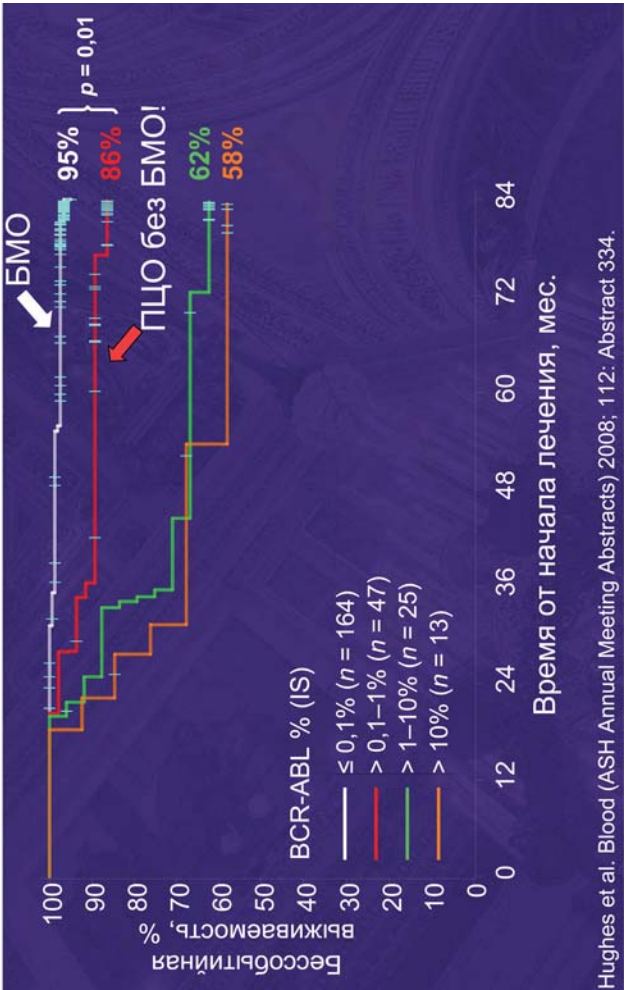
Hughes et al. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008; 112: Abstract 334.

Рис. 2. Бессобытийная выживаемость: анализ через 12 месяцев



Hughes et al. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008; 112: Abstract 334.

Рис. 3. Бессобытийная выживаемость: анализ через 18 месяцев



Hughes et al. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008; 112: Abstract 334.

Рис. 4. Выживаемость без трансформации в ФА/БК в зависимости от молекулярного ответа после 18 мес. терапии иматинибом

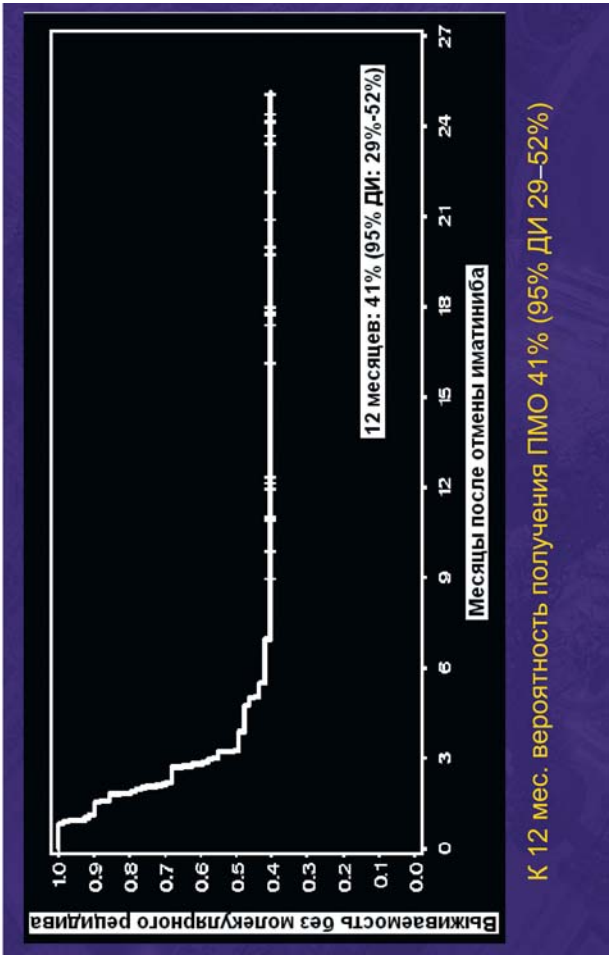


Рис. 9. Исследование STIM: выживаемость без молекулярного рецидива



Рис. 11. Нилотиниб, иматиниб, дазатиниб: активность in vitro. Phos. IC₅₀ — концентрация лекарственного вещества, при которой происходит снижение на 50 % фосфорилирования BCR-ABL-тирозинкиназы в клетках от исходной

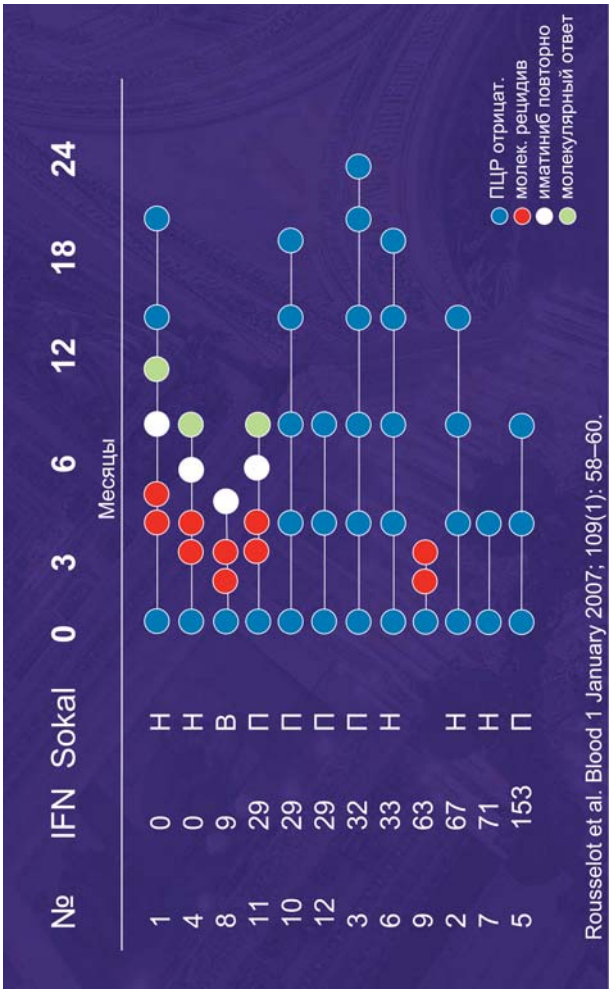


Рис. 10. Судьба больных с полным молекулярным ответом (ПМО) — отсутствие BCR-ABL-транскрипта, определяемое с помощью метода ПЦР. IFN — интерферон, длительность лечения до достижения ПМО; Sokal — прогностический индекс; В — высокий; Н — низкий; П — промежуточный



Рис. 12. Ответ на нилотиниб в качестве второй линии терапии (минимальный срок наблюдения 24 мес.; n = 321). II фаза исследования ХМП-ХФ

жения ПЦО на первом году терапии (78 vs 65 % у иматиниба; $p = 0,0005$). 17 июня 2010 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило применение нилотиниба в качестве препарата первой линии у ранее не леченных больных.

Текущие рекомендации по лечению больных ХМЛ

Хроническая фаза

- Первая линия лечения — иматиниб 400 мг/сут.
- Вторая линия лечения:
 - непереносимость иматиниба: нилотиниб, дазатиниб;
 - резистентность к иматинибу: нилотиниб, дазатиниб; при резистентности к ним и у некоторых категорий больных: аллогенная трансплантация;
 - недостаточный ответ на иматиниб: продолжение лечения в той же дозе либо ее повышение или переход на нилотиниб/дазатиниб.

Фаза акселерации и бластный криз

- Нелеченные больные: иматиниб 600 или 800 мг/сут или другие ИТК (если найдены мутации, вызывающие резистентность к иматинибу); далее — аллогенная трансплантация.
- Леченные иматинибом — нилотиниб, дазатиниб; далее — аллогенная трансплантация.

Показания к аллогенной трансплантации:

- впервые выявленный ХМЛ (при диагностике в ФА или БК);
- потеря ответа на иматиниб (у больных с предшествующим прогрессированием болезни; желательна предварительная терапия ИТК II поколения);
- потеря ответа на ИТК II поколения (всем больным).

При недостаточном ответе или резистентности к иматинибу необходимо:

- убедиться в соблюдении рекомендаций врача (учет перерывов в лечении, проверка соблюдения рекомендаций врача по данным концентрации препарата в крови и пр.);
- убедиться в отсутствии нежелательных пищевых и лекарственных взаимодействий;
- проверить концентрацию препарата в крови для исключения индивидуальных особенностей его транспорта в клетку и из клетки (в подобных случаях может помочь повышение дозы иматиниба);
- провести цитогенетическое исследование (для исключения дополнительных хромосомных аномалий) и поиск мутаций киназного домена BCR-ABL.

Определение концентрации иматиниба в крови

C_{min} — определяется перед очередным приемом препарата, через 24 ч после последней дозы, в фазе насыщения (через 1 мес. от начала терапии).

Рекомендуется в случае:

- подозрения на несоблюдение рекомендаций врача;
- подозрения на лекарственные взаимодействия;
- необычно тяжелой токсичности;
- недостаточном ответе или потере ответа.

Рекомендуемая минимальная концентрация — 1000 нг/мл.

Пищевые и лекарственные взаимодействия ИТК

- Пища практически не влияет на адсорбцию иматиниба.

При одновременном приеме с пищей:

- всасывание дазатиниба увеличивается на 14 %;
- всасывание нилотиниба повышается примерно на 100 %.

При одновременном приеме с некоторыми препаратами:

- влияние антацидов на адсорбцию ИТК;
- антациды и кислотоснижающие препараты не влияют на адсорбцию иматиниба;
- всасывание дазатиниба и нилотиниба снижается на 30–50 % при совместном применении с антацидами и кислотопонижающими препаратами;
- пантопразол и эзомепразол повышают время экспозиции нилотиниба в Ph^{+} клетках.

Сильные ингибиторы CYP3A4 (усиливают действие ИТК):

- дилтиазем,
- верапамил,
- азолы,
- макролиды,
- грейпфрутовый сок.

Сильные индукторы CYP3A4 (ослабляют действие ИТК):

- карбамазепин,
- рифампицин,
- дексаметазон,
- фенитоин,
- фенобарбитал,
- зверобой.

Субстраты CYP3A4 (при лечении ИТК возможно возрастание концентрации в крови):

- симвастатин,
- силденафил.

ABCG2 (BRCP1) ингибиторы (могут повышать концентрацию ИТК в клетках):

- пантропазол.

ABCB1 (PGP/MDR) ингибиторы (могут повышать концентрацию ИТК в клетках):

- циклоспорин,
- верапамил,
- хиноны,
- амиодарон.

hOCT1 ингибиторы (могут понижать концентрацию ИТК в клетках):

- празозин.



Круглый стол «Кэмпас в лечении хронического лимфолейкоза: современная практика» (май 2010 г., Санкт-Петербург)

20 мая 2010 г. в г. Санкт-Петербурге состоялась инициированная фармацевтической компанией Genzyme конференция, посвященная клиническому применению кэмпаса в терапии хронического лимфолейкоза. В конференции приняли участие специалисты из различных городов России. Ниже мы публикуем краткое изложение сделанных докладов.



ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИМФОЛЕЙКОЗ — ОТ РЕНТГЕНОТЕРАПИИ ДО КЭМПАСА

Д-р мед. наук М. А. Волкова

РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) впервые описан К. Р. Вирховым в 1856 г.

До начала XX в. терапии этого заболевания не существовало. С начала XX в. стала применяться рентгенотерапия — облучение лимфоузлов и селезенки. Это приносило некоторое субъективное временное облегчение больному, но не меняло темпов развития болезни. Английские ученые G. R. Minot и R. Isaacs, оценив результаты терапии больных ХЛЛ за период 1898–1923 гг., показали, что при симптоматическом лечении продолжительность жизни составляла 40 мес., при рентгенотерапии — 42 мес. Появление в терапии глюкокортикостероидных препаратов и хлорамбуцила в начале 50-х годов XX в. положило начало эре химиотерапии. Применение хлорамбуцила привело к увеличению продолжительности жизни, по данным разных авторов, до 55–60 мес., поддерживающая терапия хлорамбуцилом позволила многим больным годами сохранять хорошее самочувствие и работоспособность. Однако это относилось лишь к пациентам с благоприятным течением заболевания. Стремление улучшить результаты лечения больных



с прогрессирующим течением привело к использованию в 1970–1980 гг. комбинированных схем терапии, традиционно применяемых для лечения пациентов с неходжкинскими лимфомами: СОР, СНОР, САР. Применение этих схем позволило увеличить число полных ремиссий, но не привело к увеличению продолжительности жизни больных ХЛЛ.

Современная эра лечения ХЛЛ началась с появления пуриновых аналогов, а затем — моноклональных

антител. Из пуриновых аналогов при ХЛЛ наиболее эффективным оказался флударабин. Объединенное рандомизированное исследование, проведенное несколькими кооперативными группами из США и Канады, включившее 544 ранее не леченных больных ХЛЛ, показало явные преимущества флударабина: общий эффект достигнут у 64 % пациентов, получавших флударабин, и у 39 % — хлорамбуцил, число полных ремиссий составило 20 и 5 % соответственно

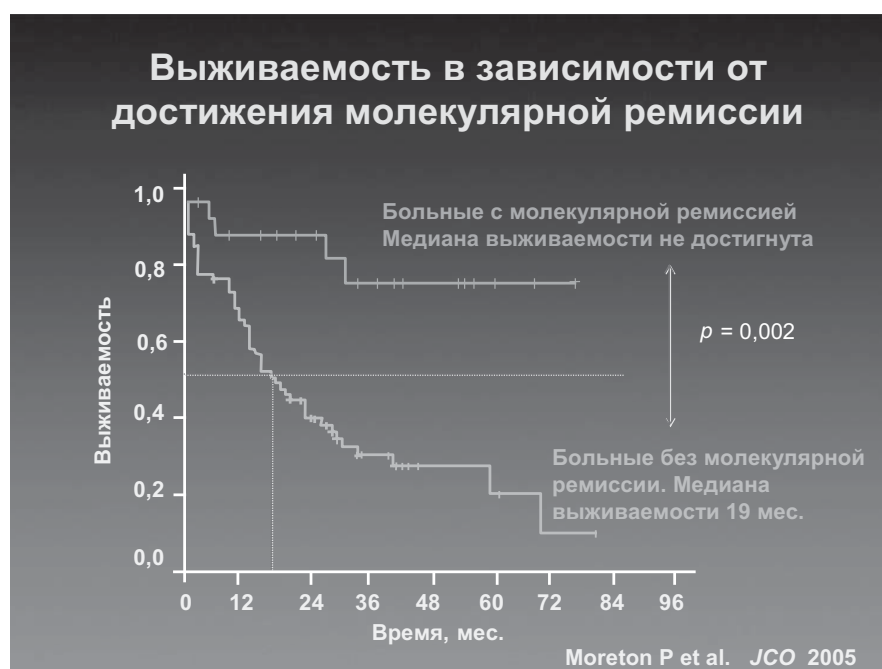


Рис. 1. Выживаемость в зависимости от достижения молекулярной ремиссии

($p = 0,0001$), продолжительность эффекта — 28 и 19 мес. соответственно ($p = 0,004$). Объединенные кооперированные рандомизированные исследования на больших группах больных показали явные преимущества флударабина по сравнению с комбинациями с другими препаратами: СОР, СНОР, САР.

В дальнейшем в улучшении результатов лечения ХЛЛ основную роль сыграли три фактора: 1) создание современной системы иммунофенотипирования, позволившее уверенно дифференцировать ХЛЛ и другие лимфопролиферативные заболевания; 2) создание современных классификаций стадийности ХЛЛ, позволившее объективно оценивать результаты лечения, получаемые различными авторами; 3) выявление роли различных биологических характеристик ХЛЛ и использование их в качестве прогностических маркеров, углубившее знание о заболевании и позволившее наиболее правильно и объективно использовать возможности современной терапии.

Было показано, что наиболее значимые прогностические факторы при ХЛЛ следующие: мутационный статус генов *IgVH*, стадия заболевания, множественные или комплексные хромосомные аберрации, диффузная инфильтрация костного мозга, время удвоения

числа лимфоцитов, степень инфильтрации лимфоцитами костного мозга.

Возникли даже надежды на лечение ХЛЛ с помощью флударабина. Когда стало ясно, что эти надежды не оправдались, началось использование флударабина в комбинации с другими препаратами. Наиболее эффективным оказалось сочетание препаратов разных групп: пуринового аналога флударабина и алкилирующего производного циклофосфана. Международное рандомизированное исследование CLL-4, включившее 777 больных, показало явные преимущества комбинации флударабина с циклофосфаном по сравнению с обоими препаратами в отдельности как по частоте общего ответа, так и по количеству полученных полных ремиссий и продолжительности беспрогрессивной выживаемости.

Огромный шаг вперед в улучшении результатов терапии ХЛЛ сыграло появление в 90-е годы XX в. моноклональных антител: ритуксимаба (Мабтера) — антитела к поверхностному антигену лимфоцитов CD20 и гуманизированного антитела к поверхностному антигену CD52 — алемтузумаба (Кэмпас).

Международное рандомизированное исследование REACH на большой группе ранее леченных больных, и международное рандомизированное

исследование CLL-8 — на ранее не леченных показали достоверно более частое получение как общих ответов, так и полных ремиссий и удлинение беспрогрессивной выживаемости при использовании сочетания флударабина, циклофосфана и мабтеры по сравнению с применением только комбинации флударабина с циклофосфаном. Выживаемость больных ХЛЛ при использовании для лечения трех препаратов указанной комбинации превысила таковую при всех ранее применяемых средствах терапии.

Кэмпас был одобрен в США и Европе позже, чем мабтера, поэтому имеется меньше исследований по его применению. Однако уже к настоящему времени показаны его несомненные преимущества по сравнению со всеми имеющимися средствами терапии ХЛЛ: кэмпас позволяет получить хорошие результаты с достижением полных цитогенетических ремиссий у больных с del17p, которые в большинстве случаев демонстрируют слабую чувствительность или рефрактерность ко всем современным схемам терапии, а в случаях получения ответа — быстрые рецидивы. У ряда больных кэмпас позволяет получить полные молекулярные ремиссии, достижение которых значительно продлевает безрецидивную и общую выживаемость больных ХЛЛ (рис. 1).

АЛЕМТУЗУМАБ: КАК ДОСТИЧЬ ОПТИМАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ?

Проф. А. Osterborg

Karolinska Institute and Hospital, Stockholm, Sweden

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является самым распространенным лейкозом среди взрослого населения Западного полушария, поражающим в основном пожилых людей (заболеваемость среди лиц старше 70 лет 50/100 000 в год). Однако отмечается возрастающая заболеваемость лиц более молодого возраста: в настоящее время 20–30 % впервые выявленных случаев приходится на пациентов моложе 55 лет. Молекулярная гетерогенность, наблюдаемая у больных ХЛЛ, имеет прогностическую значимость, в особенности делеции 13q (55 %), 11q (18 %), 17p (7 %) и трисомия хромосомы 12 (16 %), а также мутационный статус гена вариабельных регионов тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgH_v*). Кроме того, идентифицированы такие прогностические маркеры, как CD38, ZAP-70, CD49d, длина теломер, липопроотеидлипаза, CLL-U1, эпигенетические нарушения и микроРНК. Среди них один маркер наиболее важен с клинической точки зрения — делеция короткого плеча хромосомы 17 (17p-) или мутация гена *p53*. Количество клеток с делецией 17p увеличивается по мере эволюции опухолевого клона/прогрессии заболевания, что может быть следствием селекции под влиянием частого и повторяющегося использования химиотерапевтических препаратов, а также свидетельствовать о потенциальном негативном эффекте такого лечения (Zenz T. et al. Blood 2008; 112: 3322). Именно поэтому проведение цитогенетического анализа (FISH, который по экономическим соображениям может ограничиваться тестированием делеции 17p) крайне рекомендуется перед началом каждой линии химиотерапии, т.к. результаты этого анализа влияют на выбор терапии. Другие маркеры, за исключением стандартных характеристик ХЛЛ (форменные элементы крови, клиническая стадия, время удвоения числа лимфоцитов и т.д.), можно не использовать за рамками клинических исследований в целях снижения стоимости диагностики.

Тактика ведения больных ХЛЛ зависит от предполагаемой цели лечения: у пожилых пациентов, для которых

оптимальной является циторедукция и паллиативная терапия, все еще широко используется препарат алкилирующего действия хлорамбуцил. У более молодых пациентов с выраженными симптомами ХЛЛ полный ответ — предпочтительная цель лечения, т.к. именно достижение длительной и полной ремиссии связано с лучшим прогнозом выживаемости. Флударабин и циклофосфамид (FC) высокоэффективны и до сих пор служат препаратами выбора в качестве терапии первой линии у более молодых пациентов, не имеющих делеции 17p. FC в сочетании с ритуксимабом (FCR) существенно улучшает вероятность полного ответа и общую безрецидивную выживаемость по сравнению с комбинацией FC, как у нелеченных больных, так и у резистентных/рефрактерных больных ХЛЛ (по данным международных исследований CLL-8 и REACH). Однако у пациентов с делецией 17p лечение комбинацией FCR неэффективно. Примечательно, что на данный момент не существует опубликованных данных по применению режима FCR в качестве терапии первой линии у пожилых больных, в то время как показано, что переносимость химиотерапии FCR у больных с рецидивом ХЛЛ в возрасте старше 70 лет неудовлетворительна и только 13 % таких пациентов получают все запланированные курсы терапии (Badoux X. et al. IWCLL 2009: abstr. 10.32).

Алемтузумаб (Кэмпас, Campath®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к CD52 — гликопротеиду с высокой плотностью (около 370 000 молекул на 1 клетке) на большинстве нормальных и опухолевых лимфоцитов, но не на поверхности гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Связывание алемтузумаба с лимфоцитарным CD52 приводит к лизису опсонизированных клеток посредством комплимент-зависимого и антитело-зависимого клеточно-опосредованного цитотоксического действия; в исследованиях *in vitro* была продемонстрирована способность алемтузумаба вызывать апоптоз клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ответ на использо-



вание алемтузумаба не зависит от наличия делеции 17p или мутации гена *TP53*, которые предположительно служат причиной резистентности опухолевых клеток к терапии флударабином.

Монотерапия алемтузумабом в качестве первой линии терапии ХЛЛ

Первым исследованием алемтузумаба в качестве терапии первой линии было шведское исследование II фазы, проведенное в Каролинском институте у пациентов с симптоматическим ХЛЛ. Общий ответ (ORR) был достигнут у 87 % из 38 пациентов (Lundin J. et al. Blood 2002; 100: 768). Средняя продолжительность ремиссии составила 28 мес. для 38 пациентов, 32 мес. для 33 больных, ответивших на терапию алемтузумабом, и 77 мес. для 7 пациентов, имевших полный ответ. Более того, длительность терапии коррелировала с качеством ремиссии, наблюдавшейся в костном мозге. Лечение хорошо переносилось пациентами, повышенного риска инфекций по сравнению с историческим контролем не наблюдалось (Karlsson C. et al. Leukemia 2006; 20: 2204–7).

Эти результаты были подтверждены в сравнительном исследовании (III фаза, CAM307) алемтузумаба и хлорамбуцила в терапии ХЛЛ первой линии, по результатам которого кэ-

пас был зарегистрирован как препарат первой линии терапии ХЛЛ в Европе. Пациенты, получавшие алемтузумаб, продемонстрировали значительно превосходящую хлорамбуцил беспрогрессирующую выживаемость ($p = 0,0001$), а также 42%-е снижение риска прогрессирования заболевания по сравнению с хлорамбуцилом (Hillmen P. et al. JCO 2007; 25: 5616). Отсутствие минимальной остаточной болезни (МОБ) отмечалось у 26 % пациентов, достигших полного ответа на терапию алемтузумабом, в то время как в группе больных, получавших хлорамбуцил, эрадикации МОБ не было. Важно отметить, что алемтузумаб оказался эффективен у пациентов с хромосомными aberrациями — для групп пациентов с делецией 17p, получавших алемтузумаб и хлорамбуцил: безрецидивная выживаемость — 10,7 и 2,2 мес., ORR — 60 и 22 % соответственно. Частота инфекций (исключая цитомегаловирусную — ЦМВ) была на одном уровне в обеих группах. В группе пациентов, получавших алемтузумаб, частота ЦМВ-инфекции I–II степени тяжести составила 8,8 %, III степени тяжести — 2 %.

Вероятно, алемтузумаб эффективен у пациентов с массивной лимфаденопатией (размер лимфоузлов более 5 см) в качестве терапии первой линии. Однако у таких больных наблюдался в основном частичный ответ.

Ведение пациентов

При использовании алемтузумаба нередко возникает обратимая нейтропения: нейтропения IV степени тяжести может развиваться примерно у 25 % пациентов, как правило, на 2–4-й неделе лечения. При первых признаках

нейтропении или в случае фебрильной нейтропении рекомендуется временно приостановить прием алемтузумаба и продолжить лечение после достижения количества нейтрофилов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$. Назначение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора позволит избежать нежелательных задержек в терапии алемтузумабом.

Нейтропения, тромбоцитопения и показания к переливанию компонентов крови, имеющие место в результате массивной инфильтрации костного мозга и/или предшествующей терапии, не позволяют пациентам с панцитопенией получать миелотоксичную химиотерапию, в то время как алемтузумаб у таких больных может снизить лимфоцитарную инфильтрацию костного мозга без риска развития гематологической токсичности. Поэтому для пациентов, имеющих на момент выбора лечения панцитопению в результате инфильтрации костного мозга, применение алемтузумаба в качестве терапии первой линии может быть эффективным (Osterborg A. et al. Leukemia 2009; 23: 1980–8).

Аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА) — частое осложнение ХЛЛ, и хотя, согласно инструкции, алемтузумаб может вызывать АИГА, существуют данные, свидетельствующие в пользу нашей рекомендации назначать алемтузумаб пациентам с рефрактерной к лечению преднизолоном АИГА и аутоиммунной тромбоцитопенией (Royer B. et al. Leukemia 2007; 21: 511–4).

Ответ на терапию статистически выше у пациентов со статусом жизнедеятельности (performance status) 0–I степени по сравнению со статусом II–III. Вероятность возникновения лю-

бых инфекций также менее вероятна у больных со статусом 0–I степени, однако это различие статистически недостоверно. Данные немаловажного исследования SAM211 свидетельствуют, что ответ на терапию — существенный фактор возможных инфекций и смертности от них: инфекции III и IV степени тяжести отмечались у 25 (27 %) пациентов, но только у 3 (10 %) из 31 пациента, ответившего на терапию алемтузумабом, они были тяжелыми (III–IV степени).

Реактивация ЦМВ-инфекции — описанное осложнение терапии алемтузумабом (10–25 % пациентов), которое возникает вследствие максимального снижения количества Т-лимфоцитов на 4–8-й неделе лечения. Мы рекомендуем следующий алгоритм диагностики ЦМВ-инфекции (рис. 2).

Профилактика реактивации ЦМВ-инфекции (с использованием валганцикловира) не рекомендована в рутинной клинической практике (Osterborg A. et al. Leukemia 2009; 23: 1980–8).

При возникновении симптомов реактивации ЦМВ-инфекции необходимо провести ПЦР-исследование на ЦМВ как можно раньше (в первые 24 ч); при подтверждении реактивации ЦМВ, а также при возникновении субфебрильной лихорадки рекомендуется начать следующее лечение: ганцикловир/цимевен по 5 мг/кг 2 раза в день в/в или внутрь, валганцикловир/вальцит по 900 мг 2 раза в день в течение 14–21-го дня до достижения ПЦР-отрицательного результата на ЦМВ. При отсутствии ответа на лечение или в случае миелосупрессии можно добавить фоскарнет или ганцикловир.

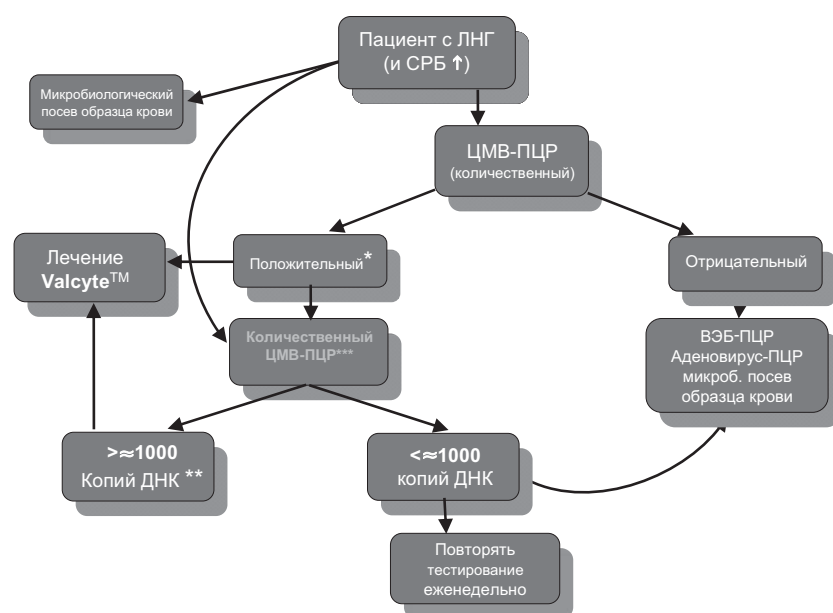


Рис. 2. Схема диагностики и лечения ЦМВ-инфекции в Каролинском институте:

ЛНГ — лихорадка неизвестного генеза; СРБ — С-реактивный белок; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр
* Количественный анализ ПЦР на ЦМВ — крайне чувствительный метод (> 100 ДНК копий): высок риск ложноположительного результата.
** Чаще 10 000–100 000 копий ДНК или более.
*** При использовании анализатора Cobas (фирма Roche) (ЭДТА, исследование плазмы) предел обнаружения — 600 копий ДНК.

Подкожное введение

Подкожное введение алемтузумаба (не является рекомендованным в инструкции к препарату способом введения) — допустимый и эффективный способ введения: уровень и продолжительность ответа были сходны с в/в введением алемтузумаба в качестве первой линии терапии, а профиль безопасности после прохождения этапа эскалации дозы превосходит в/в введение. Поскольку подкожное введение вызывает местные реакции (покраснение, отек), места введения должны меняться для сведения к минимуму таких реакций. Схема увеличения дозы препарата и профилактика местных реакций сходны с премедикацией при в/в введении, а подкожное введение полной дозы (30 мг) представляется возможным.

Алемтузумаб в комбинации с флударабином

Комбинированное лечение алемтузумабом и флударабином (FluCam) по сравнению с одним флударабином (Flu) в качестве терапии второй линии было изучено в рандомизированном исследовании III фазы CAM314 (Engert A. et al. ASH 2009; abstr. 209). Согласно предварительным результатам, комбинация FluCam превосходит монотерапию флударабином в достижении ORR (85 и 68 % соответственно; $p < 0,001$) и в продолжительности беспрогрессивной выживаемости (30 и 21 мес. соответственно; $p = 0,05$), имея аналогичную гематологическую токсичность и частоту возникновения инфекций, за исключением реактивации ЦМВ.

Перспективы и дальнейшее развитие

В настоящее время комбинация FC и алемтузумаба в качестве терапии ХЛЛ первой линии изучается в клиническом исследовании HOVON 68 (FC vs FC-A у пациентов с высоким риском, алемтузумаб в невысокой дозе). Стоит отметить, что исследование франко-европейской группы по изучению ХЛЛ (French/European Cooperative Group CLL), сравнивавшей комбинации FC-A и FC-R (не леченные ранее пациенты со стадиями В и С, алемтузумаб

в трехкратной дозе), было преждевременно остановлено после обнаружения возросшей частоты гибели пациентов вследствие развития инфекций в группе FC-A. Главным отличием этих работ, по-видимому, является доза алемтузумаба, однако пока информации недостаточно для полного понимания различия исходов этих двух исследований. Необходимо отдельно подчеркнуть, что любая терапия в комбинации с алемтузумабом не должна проводиться вне клинических исследований с надлежащим мониторингом безопасности (Osterborg A. et al. Leukemia 2009; 23: 1980–8).

Теоретически алемтузумаб очень хорошо подходит для эрадикации МОБ и поддерживающего лечения, поскольку иммунотерапия весьма эффективна при лечении небольших по объему опухолей. Несмотря на обещающие результаты применения небольших доз алемтузумаба для эрадикации МОБ (Montillo M. et al. JCO 2006; 24: 2337, Wendtner C. M. et al. Leukemia 2004; 18: 1093), имеются данные, что применение более высоких доз (т.е. стандартных для лечения) алемтузумаба представляло проблему с точки зрения безопасности (Wendtner et al. Leukemia 2004; 18: 1093, Lin T. S. et al. ASH 2009; abstr. 210). Настоятельно рекомендуется, в т.ч. в руководстве по алемтузумабу (Osterborg A. et al. Leukemia 2009; 23: 1980–8), не использовать препарат в качестве поддерживающей терапии вне клинических исследований с надлежащим мониторингом безопасности.

Подробные руководства по использованию алемтузумаба в лечении ХЛЛ были опубликованы д-ром Андерсом Остеборгом и соавт. в 2009 г. («Management guidelines for use of alemtuzumab in chronic lymphocytic leukaemia»).

Выводы

- Следующим пациентам показано назначение алемтузумаба:
 - пожилым пациентам (ввиду хорошей переносимости);
 - пациентам с делецией 17p (химиотерапия неэффективна);

■ пациентам с панцитопенией вследствие массивной инфильтрации костного мозга (алемтузумаб нетоксичен в отношении стволовых клеток);

■ пациентам с рефрактерной аутоиммунной гемолитической анемией или аутоиммунной тромбоцитопенией (в некоторых случаях алемтузумаб может служить терапией по жизненным показаниям).

- ORR при терапии алемтузумабом больных ХЛЛ, резистентных к флударабину, составляет приблизительно 40 %; более высокая вероятность ORR достижима при правильном подборе пациентов.
- При использовании алемтузумаба в качестве первой линии терапии частота ORR составляет 80 %.
- Начинать назначать алемтузумаб рано (статус жизнедеятельности 0–I степени), но не прекращайте лечение рано для достижения максимального эффекта в костном мозге.
- Ответ в костном мозге более выражен по сравнению с лимфоузлами.
- Подкожное введение может быть предпочтительнее, чем внутривенное.
- Следите за ранними проявлениями признаков ЦМВ-инфекции: лечение следует начинать как можно раньше, после чего терапия алемтузумабом может быть продолжена. В случае лихорадки на фоне отрицательного ПЦР-исследования на ЦМВ проводите активный поиск других инфекционных агентов (аденовирусная инфекция, вирус Эпштейна—Барр и др.).
- Комбинированная терапия на основе FC и эрадикация МОБ не должны проводиться вне хорошо контролируемых клинических исследований!

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЕМТУЗУМАБА (КЭМПАС) ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Д-р мед. наук С. С. Бессмельцев, Е. В. Карягина, канд. мед. наук Е. В. Литвинская

РосНИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург

Современный этап лечения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) характеризуется широким применением моноклональных антител (ритуксимаб, алемтузумаб, люмеликсимаб и др.). Алемтузумаб — гуманизированное моноклональное антитело, направленное против мембранного антигена лимфоцитов CD52. Антиген CD52 экспрессирован на мембране большинства зрелых нормальных и опухолевых Т- и В-лимфоцитов, эозинофилов, моноцитов и макрофагов.

Цель настоящего исследования — определить эффективность алемтузумаба (Кэмпас) при ХЛЛ, оценить его безопасность и проанализировать частоту и характер неблагоприятных побочных явлений.

Под наблюдением находилось 10 больных ХЛЛ (стадии В и С по Binet) в возрасте 42–71 год; 4 женщины и 6 мужчин. 6 пациентов были с впервые установленным ХЛЛ, 4 — с рецидивом или рефрактерностью к предшествующей терапии, которые на момент включения в исследование получили по 3–4 линии различных программ терапии (хлорамбуцил, СОР, СНОР, пульс-терапия дексаметазоном, СНОР-Vp, R-CHOP, FC, FCR). Размер периферических лимфоузлов у 2 больных был более 5 см; у 3 — обнаружена выраженная гепатоспленомегалия. У всех больных наблюдались В-симптомы. При поступлении пациентам осуществлялось цитогенетическое и FISH-исследование клеток крови и костного мозга. В 5 случаях найдены различные хромосомные нарушения, в т. ч. в 2 выявлена del17p. 6 больным ХЛЛ (у 3 — рецидив/рефрактерность, у 3 — впервые выявленный ХЛЛ) алемтузумаб назначен в виде монотерапии (получили 24–36 введений). 4 больным (3 — с впервые установленным ХЛЛ, 1 — с рефрактерностью к предшествующей терапии, в т. ч. флударабину) назначе-

ны 28-дневные циклы FluCam (по 6 циклов). Одной пациентке алемтузумаб вводился внутривенно, остальным — подкожно. Обязательной была терапия сопровождения: во время курса лечения и в течение 2 мес. после его завершения больные принимали бисептол для профилактики пневмоцистной пневмонии и противовирусные средства (ацикловир, валацикловир) для предупреждения герпетической инфекции.

Объективный ответ у больных с впервые выявленным ХЛЛ составил 100 %. При этом у 3 пациентов зарегистрирована полная ремиссия (ПР) после монотерапии алемтузумабом, а у 2 — вследствие терапии по схеме FluCam, в т. ч. у 4 — иммунофенотипическая ремиссия. Еще у одного больного после терапии по схеме FluCam достигнута частичная ремиссия (ЧР). У всех ответивших на лечение больных исходно выявлена высокая экспрессия CD38. Длительность ПР при использовании алемтузумаба в первой линии терапии колебалась от 12 до 36 мес., второй линии — 4–12 мес. Медиана общей выживаемости больных с впервые выявленным ХЛЛ не достигнута (период наблюдения за больными — 9–36 мес.).

Осложнения, которые возникают в ходе лечения моноклональными антителами, существенно отличаются от осложнений химиотерапии (ХТ). Первое введение алемтузумаба часто сопровождается гриппоподобным синдромом. Однако при назначении алемтузумаба подкожно мы не наблюдали данного осложнения. У 3 больных на месте подкожной инъекции появился гиперемизированный зудящий участок кожи. Тромбоцитопения IV степени выявлена у 1 больного, нейтропения — у 5 (у 2 — IV степени), анемия — у 3 больных (у 2 — II степени). У 6 пациентов возникли инфекци-



онные осложнения (в одном случае — острая респираторная аденовирусная инфекция, в двух — острый бронхит, в двух — цитомегаловирусная (ЦМВ) пневмония). Еще у одного пациента был положительный результат ПЦР на ЦМВ, но без клинических проявлений.

Таким образом, проведенное исследование показало, что алемтузумаб — эффективный препарат, играющий важную роль в терапии ХЛЛ. Он эффективен при рефрактерности к флударабину и выявлении факторов неблагоприятного прогноза. При использовании алемтузумаба важно помнить об инфекциях, в первую очередь ЦМВ (необходим еженедельный ЦМВ-тест методом ПЦР или посредством анализа на наличие антигенов). Чаше инфекционные осложнения возникают у больных ХЛЛ с рецидивом/рефрактерностью, ранее получивших 3 линии и более различных программ ХТ. В ходе лечения алемтузумабом необходима терапия сопровождения, направленная на предотвращение инфекции.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ АЛЕМТУЗУМАБА (КЭМПАС) У БОЛЬНЫХ РЕЦИДИВАМИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Канд. мед. наук Е. А. Никитин

ГНЦ РАМН, Москва

Участники исследования (по алфавиту): Ю. В. Алексеева, С. С. Беляева, Т. Е. Бялик, М. А. Волкова, М. Е. Голубева, В. А. Доронин, Т. П. Загоскина, А. Ю. Зарицкий, Е. В. Катаева, И. В. Крюкова, Е. В. Литвинская, Ю. Ю. Лорие, Ю. В. Мазикова, А. А. Мясников, Е. А. Никитин, А. С. Пристupa, А. Н. Ребриков.

Алемтузумаб (Кэмпас) — моноклональное антитело к CD52, которое разрабатывалось для лечения и профилактики реакции «трансплантат против хозяина». Эффективность кэмпаса продемонстрирована во многих клинических испытаниях. Кэмпас — единственное антитело, которое позволяет добиться эрадикации минимальной остаточной болезни при назначении в виде монотерапии. Наблюдательных исследований, посвященных этому препарату, не публиковалось. В данной работе мы приводим результаты наблюдательного исследования, проведенного в рамках базы данных CARE.

Для проведения наблюдательного исследования в 2008 г. была разработана электронная база данных CARE (CAmpath REgistry, <http://onco.gerold.ru/>). К настоящему времени в базу данных была внесена информация по 53 больным хроническим лимфолей-

козом (ХЛЛ), получавшим кэмпас. Из них 32 пациента получали монотерапию кэмпасом по поводу рецидивов. Медиана возраста этой группы больных 52 года (диапазон 37–69 лет), 22 мужчины, 10 женщин. У 15 (47 %) больных статус по шкале ECOG был более 2 баллов. 14 (44 %) больных имели стадию С. 19 (59 %) пациентов ранее получали два и более вариантов терапии, 29 — флударабин и флударабинсодержащие режимы. 10 больных получали кэмпас внутривенно, 22 — подкожно.

Общий ответ на лечение составил 66 %. Полные ремиссии были получены у 9 (28 %) больных, частичные — у 12 (38 %), стабилизация — у 6 (19 %), прогрессия на фоне лечения наблюдалась у 4 (12 %) больных. Медиана беспрогрессивной выживаемости составила 8,2 мес. (247 дней), медиана общей выживаемости не достигнута (при медиане срока наблюдения 351 день зарегистрировано 7 летальных исходов). 4 больных умерли от прогрессии опухоли, двое — от инфекционных осложнений, один больной — от второй опухоли (рак легких). Ответ на терапию не зависел от стадии, статуса по шкале ECOG, числа вариантов терапии в анамнезе. Ни один из этих показателей (стадия, ECOG



и число вариантов терапии в анамнезе) не предсказывал беспрогрессивную и общую выживаемость.

У 16 больных проведено 12 нед. и более терапии кэмпасом, у 5 больных — 8–11 нед., у 11 больных — 7 нед. и менее. Основными причинами преждевременного прекращения терапии была токсичность. Из осложнений было зарегистрировано 9 реакций на введение, 9 случаев клинически манифестной цитомегаловирусной инфекции, 11 случаев фебрильной нейтропении.

Таким образом, результаты наблюдательного исследования показывают сравнительно высокую эффективность кэмпаса, однако продолжительность ремиссий в сравнении с другими режимами второй линии невысока. Кэмпас имеет свою нишу в лечении ХЛЛ. Токсичность препарата предполагает его использование в крупных центрах, оснащенных возможностями оперативной диагностики и лечения инфекций.

ПРИМЕНЕНИЕ КЭМПАСА ПРИ АУТОИММУННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Канд. мед. наук Т. Е. Бялик

ММА им. И. М. Сеченова, Москва

Особого внимания заслуживает эффективность применения кэмпаса при различных аутоиммунных цитопениях (анемии или тромбоцитопении).

Аутоиммунная анемия развивается у 10–15 % больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), аутоиммунная тромбоцитопения — у 3–5 %. На-

личие анемии или тромбоцитопении значительно ухудшает течение ХЛЛ. В большом ретроспективном исследовании, включающем 1278 больных, показано, что общая выживаемость существенно ниже при развитии аутоиммунных расстройств: так, 5-летняя выживаемость при наличии аутоим-



мунной тромбоцитопении составляет 64 %, при отсутствии — 82 %. В общепринятых стандартах первым шагом для лечения аутоиммунных расстройств является применение кортикостероидных гормонов. Эффективность кортикостероидов в этих случаях составляет 65 %. У 60 % больных развивается рецидив сразу после отмены препарата. При отсутствии эффекта в недалеком прошлом выполнялась спленэктомия. Эффективность, т.е. полное восстановление уровня гемоглобина и/или тромбоцитов, составляет 80 %. Время достижения эффекта — от 1 до 24 дней. Большое количество осложнений, таких как развитие внутрибрюшных гематом, поддиафрагмальных абсцессов, раневая инфекция, пневмония, септический синдром, тромбозы, ограничивают применение этого метода. Необходимость повторных операций в связи с осложнениями возникала у 50–60 % пациентов. С внедрением в клиническую практику моноклональных антител изменились подходы к лечению аутоиммунных расстройств при ХЛЛ. В настоящее время при рефрак-

терности к кортикостероидным гормонам используют ритуксимаб и в/в введение больших доз иммуноглобулина, спленэктомию выполняют у ограниченного числа больных (рекомендации NCCN по лечению аутоиммунных расстройств при ХЛЛ, 2008 г.).

Эффективность применения ритуксимаба в случаях рефрактерности к кортикостероидам также составляет около 60 %.

Литературные данные об использовании кэмпаса при аутоиммунных расстройствах крайне скудны. В основном это описание отдельных случаев, сообщающих об успешном лечении аутоиммунных цитопений, рефрактерных к стандартной терапии. Наиболее крупных работ всего две.

В работе J. Marsh и E. Gordon-Smith сообщается о 21 пациенте с различными аутоиммунными цитопениями (у 4 — аутоиммунная нейтропения, у 8 — аутоиммунная анемия, у 4 — тромбоцитопения, у 5 — сочетанные расстройства), которые были резистентны к стандартной иммуносупрессивной терапии, включая пред-

низолон, цитостатическую терапию, ритуксимаб, иммуноглобулин, получили лечение кэмпасом, из них у 16 был достигнут эффект, который сохранялся от 4 до 61 мес. В работе J. Lundin и соавт. при лечении кэмпасом 5 больных с аутоиммунной анемией, резистентных к лечению кортикостероидами и ритуксимабом, эффект был достигнут у всех 5 пациентов и сохранялся в течение 12 мес. Описание отдельных случаев и эти работы стали основанием для составления рекомендаций по лечению аутоиммунных цитопений при ХЛЛ. В конце 2009 г. проходило совещание по лечению аутоиммунной тромбоцитопении, в котором принимали участие представители 21 института стран Европы, США и Канады. В ходе этого совещания место кэмпаса было определено как препарата второй линии для лечения рефрактерных аутоиммунных тромбоцитопений. Результаты опубликованы в 2010 г.

Заключение: кэмпас эффективен для лечения рефрактерных аутоиммунных осложнений при ХЛЛ.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Канд. мед. наук И. С. Мартынкевич

РосНИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург

Клинические проявления и прогноз при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) гетерогенны. Некоторые пациенты живут 20 лет и более, однако у 50 % пациентов наблюдается быстрая прогрессия с последующим неблагоприятным исходом. Становится очевидным, что у этих пациентов терапию необходимо начинать немедленно, не дожидаясь прогрессии. И это обусловлено открытием новых прогностических маркеров, отражающих биологию опухолевых клеток. К наиболее важным из них относятся мутационный статус генов вариабельного региона иммуноглобулинов (*IgV(H)*), экспрессия антигена CD38 на циркулирующих опухолевых клетках и цитогенетические маркеры (Dreger P. et al. Blood 2004; 103: 2850–8, Hayat A. et al. Leuk. Lymphoma 2006; 47: 2371–9). По причине низкой пролиферативной ак-

тивности клеток митозы для рутинного цитогенетического исследования удавалось получать менее чем у 50 % больных ХЛЛ. Однако в настоящее время благодаря использованию комбинаций различных В-клеточных митогенов информативность стандартного цитогенетического метода удалось повысить до 80–90 %. Кроме того, с появлением в 1990-е годы FISH-метода стало возможным проводить исследования и на интерфазных ядрах, что позволяет обнаруживать цитогенетические aberrации более чем у 80 % больных ХЛЛ.

Наиболее часто встречающимися и прогностически значимыми являются трисомия хромосомы 12 — у 15–30 % пациентов, *del(13)(q14)* — у 40–60 %, *del(11)(q13-23)* — у 15–20 %, *del(17)(p13)* — у 5–10 % (Krober A. et al. Blood 2002; 100: 1410–6, Dewald G. W. et al. Br. J. Haematol. 2003; 121: 287–



95, Dohner H. et al. N. Engl. J. Med. 2000; 343: 1910–6).

Показано, что выживаемость у пациентов с $\text{del}(13)(q14)$ такая же, как у больных с нормальным кариотипом, она значительно выше, чем у пациентов с трисомией хромосомы 12. В то же время наличие $\text{del}(11)(q13-23)$, ген *ATM*, и $\text{del}(17)(p13)$, ген *TP53*, играющее ключевую роль в индукции апоптоза клеток, связано с крайне неблагоприятным течением заболевания

и диктует необходимость терапии препаратами, индуцирующими апоптоз лимфоидных клеток р53-независимым путем (алемтузумаб и метилпреднизолон).

Вместе с тем у больных ХЛЛ в 15–30 % случаев при стандартном цитогенетическом исследовании определя-

ются множественные комплексные хромосомные aberrации, обуславливающие короткую выживаемость пациентов и служащие более важным прогностическим фактором, чем данные FISH и статус генов *IgVH* (Никитин Е. А. и др. Онкогематология 2007; 2: 67–70, Обухова Т. Н. и др. Тер. арх. 2004; 76(7): 70–7).

СТАНДАРТНЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Д-р мед. наук Н. Н. Тупицын

РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Подходы к лечению В-клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ) за последние годы претерпели существенные изменения. Применение современных препаратов на основе моноклональных антител позволяет добиться высокой частоты полных ремиссий (ПР) как у первичных (нелеченных), так и у больных, получавших лечение и даже резистентных к нему. В значительной части случаев при достижении ПР (критерии NCI-WG, 1996) опухолевые клетки В-ХЛЛ определяются в периферической крови и костном мозге больных. Присутствие этих клеток в количествах более 1 клетки на 10 000 лейкоцитов (именно этот уровень надежно и воспроизводимо определяется современными методами) носит название минимальной остаточной болезни (МОБ). Эрадикация МОБ, т. е. достижение МОБ-отрицательного статуса ПР, считается мощным фактором благоприятного прогноза. Европейскими и американскими исследователями (European Research Initiative in CLL, ERIC) в 2007 г. в дополнение к стандартно-

му определению МОБ методом аллель-специфической количественной ПЦР в реальном времени предложен иммунологический метод — 4-цветная проточная цитометрия (Rawstron A. et al. Leukemia 2007; 21: 956–64). Из 50 квартетов моноклональных антител отобрано три. Это оценка коэкспрессии CD20/CD38, CD81/CD22, CD79b/CD43 в пределах популяции CD19+/CD5+ В-лимфоцитов. Особое внимание уделено оценке порога чувствительности метода в каждом конкретном случае. Метод характеризуется высокой корреляцией с ПЦР с аллель-специфичными олигонуклеотидами, низкой межлабораторной вариабельностью, точностью 95,7 %. При сопоставлении 728 пар крови и костного мозга показано, что в 92 % случаев исследование крови дает такие же данные, как и костный мозг, или является более чувствительным по сравнению с изучением костного мозга. Однако анализ костного мозга необходим в течение 3 мес. лечения алемтузумабом. В докладе Международного рабочего совещания по ХЛЛ — IWCLL



(Hallek M. et al. Blood 2008; 111: 5446–56) отмечается, что клинические исследования, направленные на достижение длительных ПР, должны включать оценку МОБ. В докладе проиллюстрирована возможность использования данного метода для диагностики МОБ при В-ХЛЛ.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ВТОРОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ФЛУДАРАБИНОМ С АЛЕМТУЗУМАБОМ ПО СРАВНЕНИЮ С МОНОТЕРАПИЕЙ ФЛУДАРАБИНОМ У БОЛЬНЫХ В-ХЛЛ

Д-р мед. наук О. А. Рукавицын, канд. мед. наук В. П. Поп

Главный военный госпиталь им. Н. Н. Бурденко, Москва

Лечение больных с рецидивирующим/рефрактерным В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) представляет собой трудную задачу.

В последнее время активно применяются новые эффективные препараты, такие как моноклональные антитела (ритуксимаб, алемтузумаб) и режимы химиотерапии (сочетание с флударабином и др.).

В 2009 г. были опубликованы данные предварительного анализа результатов рандомизированного исследования САМ-314 по оценке эффективности и безопасности второй линии терапии флударабином с алемтузумабом ($n = 168$) против монотерапии флударабином ($n = 167$) как терапии второй линии у пациентов с В-ХЛЛ. Показаны возможность достижения хорошего общего ответа на лечение и увеличение выживаемости без прогрессирования. В группе комбинированной терапии ответ оценен у 158 пациентов: общий ответ достигнут у 85 %, полная ремиссия — у 30 %, частичная ремиссия — у 54 %. Среди пациентов, получавших монотерапию флударабином, ответ оценен у 159 больных: общий ответ достигнут у 68 % ($p < 0,001$), полная ремиссия — у 16 % ($p = 0,002$), частичная ремиссия — у 52 %.

Терапия флударабином с алемтузумабом продемонстрировала значительное улучшение выживаемости без прогрессирования по сравнению с монотерапией флударабином у больных с рецидивирующим/рефрактерным В-ХЛЛ: 29,6 vs 20,7 мес. ($p = 0,005$), особенно у больных с III–IV стадией заболевания (по Rai) — 26,1 vs 12,1 мес. ($p = 0,003$). При этом профиль безопасности комбинированной терапии оказался сравнимым с таковым у флударабина: нет разницы в количестве умерших пациентов, отмечена сходная частота инфекционных осложнений III–IV степени.

В гематологическом центре ГВКГ им. Н. Н. Бурденко в исследовании САМ-314 принимало участие в скрининге 6 пациентов (все мужчины). Не прошли скрининг 3 больных (исключены в связи с выявлением антител к вирусу гепатита В ($n = 2$) и активного гепатита, вызванного вирусом Эпштейна—Барр ($n = 1$)). Из 3 пациентов, получавших лечение по протоколу, одному была назначена комбинированная терапия флударабином с алемтузумабом. Возраст больных, получавших монотерапию, — 51 и 52 года, а пациенту, рандомизированному на комбинированную терапию, было 73 года на момент включения в протокол. Пациент № 1 в группе монотерапии флударабином получил 6 циклов лечения (по 53 мг с 1-го по 5-й день), осложнений не отмечено. В апреле 2008 г. зарегистрирована частичная ремиссия, которая сохраняется в настоящее время. Пациенту № 2 проведено 6 циклов монотерапии флударабином с 14.12.06 по 26.05.07 (по 36,7 мг с 1-го по 5-й день, доза снижена с учетом клиренса креатинина); в июне 2007 г. констатирована частичная ремиссия. С мая 2007 г. проводится динамическое наблюдение за пациентом. Проводился мониторинг активации цитомегаловируса (ЦМВ), больной принимал ацикловир; реактивации ЦМВ-инфекции не отмечалось. Имел место часто рецидивирующий генитальный герпес. В сентябре 2009 г. выявлен аутоиммунный гемолиз (гемоглобин 37 г/л), в январе 2010 г. — аутоиммунная тромбоцитопения (тромбоциты 40×10^9 /л). Проведена терапия ритуксимабом с положительным эффектом.

Пациенту с комбинированной терапией флударабином и алемтузумабом с 22.12.06 по 20.05.07 проведено 6 циклов лечения: флударабин 58,8 мг в/в в 1–3-й день, кэмпас 30 мг в/в в 1–3-й день. Отмечались агранулоцитоз, фебрильная нейтропения; после 5-го цикла — рентгенонегатив-



ная пневмония в нижней доле левого легкого (лихорадка и аускультативная симптоматика). Частичная ремиссия констатирована в феврале 2007 г. В августе 2007 г. без признаков прогрессирования В-ХЛЛ развилась аутоиммунная гемолитическая анемия с гемолитическим кризом 21.08.07: уровень гемоглобина снижался до 29 г/л. Проводилась терапия солумедролом 500 мг в/в в течение 5 дней, вводили в/в иммуноглобулины, на фоне чего гемолиз купирован, однако течение заболевания осложнилось декомпенсацией сахарного диабета, венозными тромбозами. Развился смешанный (бактериальный и грибковый) сепсис; в дальнейшем был диагностирован инвазивный аспергиллез с поражением обоих легких. 16.09.07 пациент умер от отека легких (через 6 мес. после завершения исследования).

Таким образом, у всех наблюдаемых нами пациентов достигнут ответ на лечение — частичная ремиссия. Реактивации ЦМВ-инфекции не отмечено. Более частые инфекционные осложнения у пациента на комбинированной терапии флударабином с алемтузумабом наиболее вероятно связаны с пожилым возрастом и наличием сопутствующих заболеваний. У этой группы больных проведение комбинированной терапии флударабином с алемтузумабом требует большей тщательности и дополнительного изучения.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЕМТУЗУМАБА В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В НАЦИОНАЛЬНОМ ИНСТИТУТЕ РАКА УКРАИНЫ

Д-р мед. наук И. А. Крячок

Национальный институт рака, Киев

В отделении онкогематологии Национального института рака Украины в период с 2006 по 2009 г. находилось 32 пациента с диагнозом В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ), которые получали лечение с использованием алектумумаба в разных режимах (монотерапия в дозе 30 мг 3 раза в неделю, 10 мг 3 раза в неделю, комбинированная терапия по схеме FluCam) в качестве терапии первой линии, противорецидивной терапии и рефрактерности к первой линии терапии, терапии консолидации с целью эрадикации минимальной остаточной болезни.

Для анализа эффективности и токсичности однородную группу составили 20 больных В-ХЛЛ, которые получали режим FluCam по поводу рецидива или рефрактерной формы заболевания. Возраст пациентов колебался от 50 до 69 лет (медиана 59 лет), 10 мужчин и 10 женщин. 3 пациента получали лечение по поводу рефрактерной формы заболевания, 17 пациентов — по поводу рецидива. Все больные получили от 1 до 6 курсов терапии (медиана 5,5 курса). Всем пациентам в период терапии проводилась профи-

лактика инфузионных реакций (парацетамол, дифенгидрамин, гидрокортизон) и инфекционных осложнений (триметоприм/сульфаметоксазол, ацикловир).

В качестве оценки эффективности терапии использовались показатели непосредственного ответа на лечение (общий, полный, частичный ответ, стабилизация, прогрессия заболевания). Отдаленные результаты оценены по показателям общей и бессобытийной выживаемости. Общий ответ на лечение составил 85 % (17 пациентов).

Полный ответ достигнут у 4 (20 %) пациентов, частичный ответ — у 13 (65 %) пациентов. Прогрессия заболевания наблюдалась у 2 (10 %) пациентов, стабилизация заболевания — у 1 (5 %). Период наблюдения за больными составил максимально 45 мес. За период наблюдения умерло 2 пациента (1 — от прогрессии основного заболевания, 1 — в результате инфекции). 3-летняя общая выживаемость составила $93,8 \pm 5,7 \%$, 3-летняя бессобытийная выживаемость — $85,3 \pm 9,3 \%$. Всего в данной группе пациентов проведено 93 курса терапии. 43 % кур-



сов сопровождалась гематологической токсичностью III–IV степени, реактивация ЦМВ-инфекции наблюдалась у 3 пациентов, инфузионные реакции — у 2. Таким образом, применение алектумумаба для лечения больных с рецидивом ХЛЛ или при рефрактерности к стандартному лечению служит эффективным методом терапии с приемлемым профилем токсичности.

РЕШЕНИЕ ПО ИТОГАМ КРУГЛОГО СТОЛА «КЭМПАС В ЛЕЧЕНИИ ХЛЛ: СОВРЕМЕННАЯ ПРАКТИКА»

Необходимость в обсуждении оптимального использования кэмпаса в терапии больных ХЛЛ назрела в связи с тем, что полученные за последнее время новые данные позволяют иначе взглянуть на возможности кэмпаса, а значит, стандарты лечения кэмпасом нуждаются в пересмотре и доработке.

Заслушав доклады, посвященные актуальным вопросам применения кэмпаса у больных ХЛЛ, и обсудив имеющиеся данные, представляется возможным заключить следующее.

1. Кэмпас эффективен в качестве терапии первой линии у паци-

ентов ХЛЛ, имеющих делецию 17p/мутацию *p53*, а также при рефрактерности/резистентности к лечению схемами FC, FCR.

2. Кэмпас может назначаться больным ХЛЛ с аутоиммунными анемиями и тромбоцитопениями.

3. Кэмпас может применяться у пожилых больных.

4. При терапии кэмпасом важное значение имеет своевременная диагностика ЦМВ-инфекции, целесообразным представляется регулярный мониторинг реактивации ЦМВ в случаях, когда это доступно.

5. Терапия кэмпасом должна сопровождаться надлежащей профилактикой оппортунистических инфекций, в особенности *Pneumocystis carinii* и *Herpes zoster virus*.

6. Подкожное введение кэмпаса служит альтернативой внутривенному введению, адекватной по эффективности, но с меньшим количеством и интенсивностью системных реакций на введение препарата.

Данные выводы должны послужить началом для дальнейшей разработки рекомендаций как по использованию кэмпаса, так и по лечению ХЛЛ в целом.

НОВЫЕ КНИГИ НА WWW.MEDPRINT.RU

АТЛАС КЛИНИЧЕСКОЙ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОЙ ЭНДСКОПИИ

Мел Ч. Уилкоккс, Мигель Муньос-Навас, Джозеф Дж. Й. Санг (перевод с английского под редакцией Е.Д. Федорова)

Эта книга, в отличие от других подобных изданий, содержит наиболее современные иллюстрации эндоскопического исследования ЖКТ, что помогает безошибочно интерпретировать любые находки, встречающиеся в клинической практике.

Более 2000 иллюстраций (в последнее издание Атласа вошло более 75% новых) охватывают характерные особенности всего спектра патологических изменений ЖКТ.

Соответствующие гистологические и радиологические иллюстрации облегчают постановку диагноза.

Новые материалы по эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии помогают оптимальному использованию этой важной диагностической методики.

Построение материала от органа ЖКТ к заболеванию позволяет быстро отыскать нужные изображения.

Эскизы отдельных изображений подчеркивают основные особенности оригинального снимка.

Для эндоскопистов, гастроэнтерологов, гепатологов, онкологов.

ЭНДОКРИННАЯ ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Корман Д. Б.

В книге приведены классификации основных гормонов человеческого организма, их биологические эффекты, рецепторный механизм действия. Рассмотрено участие гормонов щитовидной железы, кортикостероидов и половых гормонов в возникновении и развитии злокачественных новообразований.

Освещены общие принципы эндокринной терапии первично иноперабельных опухолей, рецидивов и метастазов, использование эндокринной терапии в комплексе с другими лечебными мероприятиями до и после хирургического вмешательства.

Для специалистов по химиотерапии, онкологов, эндокринологов.

ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИЙ АТЛАС. Классификация и определение стадии опухолей. Принципы диагностики и лечения

(перевод с английского под редакцией Е. Г. Новиковой)

В атласе суммирована информация по основным нозологиям, встречающимся в практике онкогинеколога. По каждому заболеванию представлены общие сведения, а также основные принципы диагностики и лечения.

Главной особенностью атласа, обуславливающей его уникальность, служит подробное описание принципов и критериев определения стадии опухолей различных локализаций. В приведенных иллюстрациях проводится взаимосвязь между системами стадирования FIGO и AJCC в сочетании с данными УЗИ и МРТ. Расположение иллюстраций на едином развороте большого формата позволяет охватить весь спектр вариантов распространения опухолевого процесса.

Для онкогинекологов, хирургов, специалистов по диагностике, а также химио- и лучевой терапии.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И МЕЛАНОМА КОЖИ

Гилязутдинов И.А., Хасанов Р.Ш., Сафин И.Р., Моисеев В.Н.

В руководстве рассматриваются этиология, классификация, диагностика, клиника, различные виды лечения злокачественных опухолей мягких тканей и кожи.

Обращается внимание на большую вариабельность клинических проявлений опухолей этого вида, трудности дифференциальной диагностики.

Представлены клинически разработанные методы комбинированного и комплексного лечения злокачественных опухолей мягких тканей и кожи, методы свободной кожной пластики дефектов после хирургического лечения данной патологии.

Для онкологов, хирургов общей лечебной сети, патоморфологов и специалистов по лучевой диагностике.

ЭКГ ПОНЯТНЫМ ЯЗЫКОМ

Лутра А. (перевод с английского)

В книге освещены вопросы регистрации и классификации волн ЭКГ, определение частоты сердечных сокращений и положения электрической оси сердца, представлены возможные изменения волн и сегментов ЭКГ с характеристикой их основных причин и клинической значимости. Описаны нарушения ритма, собранные в разделы по дифференциальным признакам.

Это помогает наглядно оценить их механизм, причины, характерные признаки и основные принципы терапии.

Книга предназначена для тех, кто стремится овладеть методом ЭКГ за короткое время — от основ к клинической практике.

Для студентов медицинских вузов, клиницистов и работников экстренных служб.

РЕКОНСТРУКТИВНЫЕ ОПЕРАЦИИ ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Под редакцией Е. Г. Матякина

Монография посвящена реконструктивным операциям при опухолях головы и шеи. О необходимости их применения свидетельствуют многочисленные публикации в отечественной и зарубежной литературе. Монография основана на опыте более 1100 реконструктивных операций, выполненных в хирургическом отделении опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН за период с 1980 по 2001 год. Авторы одними из первых в нашей стране стали выполнять пластические операции одновременно с удалением первичной опухоли.

Монография рассчитана на хирургов-онкологов, челюстно-лицевых и пластических хирургов.