

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Интенсивная полихимиотерапия
у молодых больных с диффузной**

В-крупноклеточной лимфомой

**Селективная коррекция
нарушений гемостаза**

**у детей со злокачественными
новообразованиями**

**Мутации генов *FLT3*, *c-KIT*
и *NPM1* у детей с острым
миелоидным лейкозом**

4

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

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOHEMATOLOGY

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

проф., д.м.н. Е.В. Самочатова

Заместители главного редактора

д.м.н. В.В. Птушкин,

проф., д.м.н. Б.В. Афанасьев

Ответственный секретарь

к.м.н. Ю.В. Румянцева

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

проф., д.м.н. О.В. Алейникова (Минск)

проф., д.м.н. А.К. Голенков (Москва)

проф., д.м.н. А.И. Карачунский (Москва)

д.м.н. Е.Н. Паровичникова (Москва)

проф., д.м.н. Ю.А. Криволапов (С.-Петербург)

доц., д.м.н. М.Л. Минков (Австрия)

д.м.н. Н.В. Мякова (Москва)

к.м.н. Е.А. Никитин (Москва)

проф., д.м.н. О.А. Рукавицын (Москва)

д.м.н. С.А. Румянцев (Москва)

д.м.н. Г.И. Сидорович (Москва)

к.м.н. Л.Г. Фечина (Екатеринбург)

д.м.н. А.Л. Усс (Минск)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

проф., д.м.н. Е.А. Лукина (Москва)

чл.-корр. РАМН И.В. Поддубная (Москва)

чл.-корр. РАМН А.Г. Румянцев (Москва)

к.м.н. В.А. Россиев (Самара)

проф., д.м.н. А.Г. Талалаев (Москва)

EDITOR-IN-CHIEF

Prof. Ye.V. Samochatova

Deputy Editor

D. Sci. V.V. Ptushkin,

Prof. B.V. Afanasyev

Executive Secretary

PhD Yu.V. Rumyantseva

EDITORIAL BOARD

Prof. O.V. Aleynikova (Minsk)

Prof. A.K. Golenkov (Moscow)

Prof. A.I. Karachunskiy (Moscow)

D. Sci. Ye.N. Parovichnikova (Moscow)

Prof. Yu.A. Krivolapov (St.-Petersburg)

D. Sci. M.L. Minkov (Austria)

D. Sci. N.V. Myakova (Moscow)

PhD Ye.A. Nikitin (Moscow)

Prof. O.A. Rukavitsin (Moscow)

D. Sci. S.A. Rumyantsev (Moscow)

D. Sci. G.I. Sidorovich (Moscow)

PhD L.G. Fechina (Yekaterinburg)

D. Sci. A.L. Uss (Minsk)

EDITORIAL COUNCIL

D. Sci. Ye.A. Lukina (Moscow)

Prof. I.V. Poddubnaya (Moscow)

Prof. A.G. Rumyantsev (Moscow)

PhD V.A. Rossiyev (Samara)

Prof. A.G. Talalayev (Moscow)

О с н о в а н в 2 0 0 5 г.

Адрес редакции:

Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж,
«АБВ-пресс». Тел./факс: 8(499) 929-96-19

e-mail: abv@abvpress.ru

Заведующая редакцией А.Г. Шегай

Редактор Н.В. Черножукова

Корректор А.Ф. Матвейчук

Дизайн и верстка Р.Р. Саргсян

Служба подписки и распространения

Н.А. Гаркавец, 8 (495) 645-21-98,

baza@roou.ru

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

При перепечатке материалов ссылка
на журнал «Онкогематология» обязательна

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.
В статьях представлена точка зрения
авторов, которая может не совпадать
с мнением редакции журнала

ISSN 1818-8346

Онкогематология. 2009. № 4. 1—64
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2009

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии
ООО «А2С», ул. Шоссе Энтузиастов, д. 9 а,
тел: (495) 749-58-55

Тираж 1500 экз.

2009

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

М.М. Бобкова, С.В. Семочкин, В.Л. Иванова, О.Г. Агафонова, Л.А. Антипова, Н.Н. Вольченко, В.В. Дергачева, О.Д. Захаров, Ю.А. Кудинов, С.С. Куликова, Ю.Б. Кочкарева, Н.А. Лобанова, И.Е. Лазарев, Е.В. Ларичева, Л.А. Магомедова, Н.В. Малахова, В.Г. Маркарян, Л.А. Муха, С.В. Миненко, Т.Ю. Остренкова, Е.В. Ованесова, Т.Н. Пересторонина, М.Е. Рыбакова, Е.А. Самышина, В.В. Птушкин

Эффективность применения интенсивной полихимиотерапии в лечении молодых больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой из клеток герминального центра	4
--	----------

Э.Г. Бойченко, Э.М. Петрова, М.Б. Ивановская, И.А. Гарбузова, М.Б. Белогурова, Г.Г. Радулеску, Ю.В. Румянцева, Д.В. Литвинов, С.Н. Лагойко, К.Л. Кондратчик, Н.И. Пономарева, Н.Р. Тюкалова, А.И. Карачунский

Сравнительный анализ режимов химиотерапии острого лимфобластного лейкоза BFM-90m, MB-91 и PECO-92 в Москве и Санкт-Петербурге	12
--	-----------

В.В. Дмитриев, И.А. Дунаев

Селективная коррекция нарушений гемостаза у детей с острым лейкозом и злокачественными новообразованиями	22
---	-----------

БИОЛОГИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

Л.В. Гук, Т.В. Савицкая, Д.А. Домнинский, В.О. Бобрынина, М.М. Шнейдер, А.А. Масчан, О.В. Алейникова

Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов FLT3, c-KIT и NPM1 у детей с острым миелобластным лейкозом	27
--	-----------

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

О.С. Татаринова, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев

Биологические свойства и возможности клинического использования мезенхимальных стволовых клеток	33
--	-----------

Р.Ш. Ибрагимов, Е.В. Райкина, Е.Ю. Осипова, Н.Н. Зиминова, О.А. Майорова, М.В. Яковлева, С.А. Румянцев

Сравнительная характеристика клеточного состава пуповинной крови здоровых новорожденных и мобилизованной гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови здоровых доноров	45
---	-----------

КАЧЕСТВО ЖИЗНИ И ДИСПАНСЕРНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Д.Ю. Качанов, Р.Т. Абдуллаев, К.В. Добренков, С.Р. Варфоломеева

Методология работы детского популяционного канцер-регистра	51
---	-----------

ФАРМАКОТЕРАПИЯ

Преимущество применения Тасигны перед Гливексом в лечении впервые диагностированного хронического миелолейкоза: результаты исследования компании «Новартис»	61
--	-----------

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

M.M. Bobkova, S.V. Semochkin, V.L. Ivanova, O.G. Agafonova, L.A. Antipova, N.N. Volchenko, V.V. Dergacheva, O.D. Zacharov, Yu.A. Kudinov, S.S. Kulikova, Yu.B. Kochkareva, N.A. Lobanova, I.E. Lazarev, E.V. Laricheva, L.A. Magomedova, N.V. Malachova, V.G. Markaryan, L.A. Mucha, S.V. Minenko, T.Yu. Ostrenkova, E.V. Ovanesova, T.N. Perestoronina, M.E. Ribakova, E.A. Samischina, V.V. Ptuschkina

Intensive polychemotherapy efficacy in young adults with diffuse B-large cells lymphoma from germinal center cells	4
---	----------

*E.G. Boichenko, E.M. Petrova, M.B. Ivanovskaya, I.A. Garbusova,
M.B. Belogurova, G.G. Radulesku, Yu.V. Roumiantseva, D.V. Litvinov, S.N. Lagoiko,
K.L. Kondratchik, N.I. Ponomareva, N.R. Tkalova, A.I. Karachunsky*

Comparative analysis of three various chemotherapy protocols for acute lymphoblastic leukemia BFM-90m, MB-91 and PECO-92 in Moscow and St.-Petersburg	12
--	-----------

V.V. Dmitriev, I.A. Dunaev

Selective correction of haemostatic defects in children with acute leukemia and malignant neoplasms	22
--	-----------

BIOLOGY OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

*L.V. Guk, T.V. Savitskaya, D.A. Domninsky,
V.O. Bobrinina, M.M. Schneider, A.A. Maschan, O.V. Aleinikova*

Analysis of incidence and prognostic significance <i>FLT3</i>, <i>c-KIT</i> and <i>NPM1</i> genes mutation in children with acute myeloid leukemia	27
---	-----------

BASIC RESEARCH

O.S. Tatarinova, E.Yu. Osipova, S.A. Roumiantsev

Mesenchymal stem cells biological properties and possibilities of clinical use	33
---	-----------

*R.Sh. Ibragimov, E.V. Raikina, E.Yu. Osipova,
N.N. Zimina, O.A. Maiorova, M.V. Yakovleva, S.A. Roumiantsev*

Comparative characteristics of healthy newborns cord blood cell composition and G-SCF-mobilized blood from healthy donors	45
--	-----------

QUALITY OF LIFE AND FOLLOW-UP

D.Y. Kachanov, R.T. Abdullaev, K.V. Dobrenkov, S.R. Varfolomeeva

Methodology of work of childhood population-based cancer registry	51
--	-----------

PHARMACOTHERAPY

Tasigna advantage in treatment of newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results of «Novartis research»	61
---	-----------

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ МОЛОДЫХ БОЛЬНЫХ С ДИФфуЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ ИЗ КЛЕТОК ГЕРМИНАЛЬНОГО ЦЕНТРА

М.М. Бобкова¹, С.В. Семочкин¹, В.Л. Иванова², О.Г. Агафонова³, Л.А. Антипова¹,
Н.Н. Вольченко³, В.В. Дергачева³, О.Д. Захаров³, Ю.А. Кудинов³, С.С. Куликова¹,
Ю.Б. Кочкарева³, Н.А. Лобанова², И.Е. Лазарев², Е.В. Ларичева³, Л.А. Магомедова³,
Н.В. Малахова², В.Г. Маркарян², Л.А. Муха², С.В. Миненко¹, Т.Ю. Остренкова³,
Е.В. Ованесова³, Т.Н. Пересторонина¹, М.Е. Рыбакова², Е.А. Самышина³, В.В. Птушкин¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

Минздравсоцразвития РФ; ²Гематологический центр ГКБ им. С.П. Боткина;

³Поликлиническая гематологическая служба, Москва

Контакты: Мария Михайловна Бобкова bobkova.hematol@mail.ru

В статье представлен анализ результатов лечения 165 первичных взрослых больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), получавших терапию в условиях практического здравоохранения Москвы.

Цель исследования — оценка эффективности разных по дозовой интенсивности режимов химиотерапии в зависимости от молекулярно-генетического варианта заболевания. Педиатрические протоколы BFM-NHL-90m и B-NHL-2004M получили 28 подростков и молодых пациентов (медиана 21,7 года; разброс 15—38 лет), CHOP и R-CHOP — 46 (29; 17—78) и 91 (59,5; 28—80) взрослых соответственно. Исследование носило нерандомизированный характер. Герминальный и постгерминальный варианты ДВККЛ были определены с помощью иммуногистохимической техники для 58 (35%) пациентов. Для молодых больных с герминальной ДВККЛ выявлено преимущество при лечении по интенсивным «блоковым» протоколам BFM-NHL-90m и B-NHL-2004M по отношению к постгерминальному варианту: 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) — $1,0 \pm 0,0$ ($n=6$) против $0,44 \pm 0,15$ ($n=9$) соответственно ($p < 0,05$). На терапии по программе R-CHOP у старших пациентов подобных различий не выявлено: 2-летняя БСВ $0,51 \pm 0,23$ ($n=16$) против $0,58 \pm 0,173$ ($n=27$) соответственно ($p > 0,05$). Данные, полученные в ходе работы, обосновывают целесообразность дифференцированного лечения подростков и молодых взрослых с ДВККЛ из клеток герминального центра с помощью интенсивных BFM-подобных протоколов.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома, взрослые, полихимиотерапия

INTENSIVE POLYCHEMOTHERAPY EFFICACY IN YOUNG ADULTS WITH DIFFUSE B-LARGE CELLS LYMPHOMA FROM GERMINAL CENTER CELLS

М.М. Bobkova¹, S.V. Semochkin¹, V.L. Ivanova², O.G. Agafonova³, L.A. Antipova¹, N.N. Volchenko³,
V.V. Dergacheva³, O.D. Zacharov³, Yu.A. Kudinov³, S.S. Kulikova¹, Yu.B. Kochkareva³, N.A. Lobanova²,
I.E. Lazarev², E.V. Laricheva³, L.A. Magomedova³, N.V. Malachova², V.G. Markaryan², L.A. Mucha², S.V. Minenko¹,
T.Yu. Ostrenkova³, E.V. Ovanesova³, T.N. Perestoronina¹, M.E. Ribakova², E.A. Samischina³, V.V. Ptuschkina¹

¹Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow; ²Hematological center of Botkin Municipal clinical hospital, Moscow; ³Outpatient hematological service, Moscow

Analysis of treatment results of 165 primary adult patients with diffuse B large-cells lymphoma (DBLCL) treating in Moscow municipal clinics is presented. Study aimed on analysis of efficacy of various dose intensity chemotherapy schedule according to disease molecular genetics variants. 28 adolescents and young adults (median age — 21.7 years) have received treatment according to pediatric BFM-NHL 90m and BFM-NHL 2004M protocols, 46 (median age — 29.0 years) and 91 (median age — 59.5) adults according to courses CHOP and R-CHOP, respectively. It was not randomized study. Germinal and postgerminal variants DBLCL were determined using immunohistochemical technique for 58 (35%) patients with appropriate primary samples. For young patients with germinal DBLCL therapy superiority of intensive BFM-NHL 90m and B-NHL 2004M protocols in relation to postgerminal variants was revealed: 5-years event-free survival (EFS) was 1.0 ± 0.0 ($n = 6$) versus 0.44 ± 0.15 ($n = 9$), respectively ($p < 0.05$). In advanced age patients treated according R-CHOP similar differences was not revealed: 2-years EFS - 0.51 ± 0.23 ($n = 16$) versus 0.58 ± 0.13 ($n = 27$), respectively ($p > 0.05$). Data receiving proves expediency of treatment adolescents and young adults with DBLCL from germinal center cells according to intensive BFM-like protocols.

Key words: diffuse B large-cells lymphoma (DBLCL), adults, polychemotherapy

Введение

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) — наиболее часто встречающийся (30—40% случаев) вариант агрессивных неходжкинских лимфом (НХЛ) у взрослых [1]. В детском и подростковом возрасте ДВККЛ диагностируется реже — 8—10 и 25% случаев соответственно [2]. ДВККЛ — гетерогенное в клиническом и биологическом отношении заболевание. В зависимости от профиля молекулярно-генетических событий его можно разделить по крайней мере на 2 различающихся по прогнозу и ответу на терапию варианта: подобный клеткам герминального центра (ГЦ), основным механизмом которого служит активация *c-myc* (данный вариант чаще встречается у детей) и подобный активированным В-клеткам (АВК), или постгерминальный, чаще возникающий у взрослых, ключевым нарушением которого является конститутивная активация NF-κB [3]. Эффективность стандартной химиотерапии (ХТ) всегда ниже для АВК, чем для ГЦ ДВККЛ [4].

В педиатрической гематологии для лечения ДВККЛ используют интенсивные протоколы, аналогичные таковым для лимфомы Беркитта. Большинство случаев ДВККЛ у детей в основном представлены ГЦ-вариантом [2, 5], чем частично объясняются хорошие результаты лечения по этим протоколам: 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) — до 95% [5, 6]. Результаты лечения взрослых с ДВККЛ на режимах, подобных СНОР (циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон), исторически всегда уступали таковым у детей: 5-летняя общая выживаемость (ОВ) для продвинутых стадий не превышала 30—40% [7].

Мы предположили, что для молодых пациентов с герминальной ДВККЛ возможно улучшение результатов терапии за счет ее интенсификации с помощью режимов, применяемых в педиатрической практике [8].

Цель исследования — оценка клинической эффективности применения разных по дозовой интенсивности режимов ХТ в лечении ДВККЛ у взрослых в зависимости от молекулярно-генетического варианта заболевания.

Материалы и методы

В исследование включены 165 больных с ДВККЛ, не имевших в анамнезе других онкологических заболеваний и не получавших никакой

предшествующей ХТ и/или лучевой терапии (ЛТ) по поводу настоящего заболевания (табл. 1). В работе оценена эффективность 4 протоколов лечения: BFM-NHL-90m для В-НХЛ; В-НХЛ-2004М; R-СНОР-21 и СНОР-21. Исследование носило нерандомизированный характер.

Двадцать восемь (14 мужчин и 14 женщин) молодых пациентов получили интенсивную «блоковую» терапию. Лечение проводилось в период с августа 2006 г. по апрель 2009 г. в отделении подростковой и возрастной гематологии ФНКЦ ДГОИ на клинической базе ГКБ им. С.П. Боткина. До 2006 г. больные ($n=18$) получали модифицированные блоки терапии BFM-NHL-90m для В-НХЛ с редуцированным режимом введения метотрексата (1 г/м² в течение 36 ч вместо оригинальных 5 г/м² в течение 24 ч) [8]. После 2006 г. ($n=10$) терапия проводилась по отечественному протоколу В-НХЛ-2004М, отличающемуся от NHL-BFM-90m введением ритуксимаба в первый день первых 4 блоков в дозе 375 мг/м² и ограничением дозы метотрексата только в первых 2 блоках (1 вместо 5 г/м² в течение 24 ч) [9].

Лечение 91 (47 мужчин и 44 женщины) пациента по программе R-СНОР осуществлялось врачами-гематологами поликлиник Москвы в период с февраля 2005 г. по октябрь 2008 г. Ретроспективно проанализированы данные по 46 (24 мужчины и 22 женщины) пациентам, пролеченным в период с декабря 1994 г. по август 2007 г. по программе СНОР в гематологических отделениях ГКБ им. С.П. Боткина.

Для разделения случаев ДВККЛ на молекулярные варианты (ГЦ или АВК) использована оригинальная методика С.Р. Hans и соавт. [3], основанная на иммуногистохимической технике (рис. 1).

Эффективность «блоковой» терапии по протоколам оценивали в соответствии с определенными протоколами BFM-NHL-90m для В-НХЛ и В-НХЛ 2004М критериями и формулировками [5, 9]. Не ответившими на терапию (non-responders) считали пациентов, у которых не было получено полной (ПР) и продолжительной полной (ППР) ремиссии после проведения 3-го блока терапии (СС, ССz). На программах СНОР и R-СНОР эффективность терапии оценивали после 2, 4, 6 и 8-го циклов. Неответившими считали пациентов, не достигших ремис-

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Показатель	Протокол лечения				Всего
	BFM-NHL-90m	В-НХЛ-2004М	СНОР	R-СНОР	
Период включения	08.1990—09.2008	11.2006—04.2009	12.1994—08.2007	02.2005—10.2008	08.1990—04.2009
Число больных (%)	18 (11)	10 (6)	46 (28)	91 (55)	165 (100)

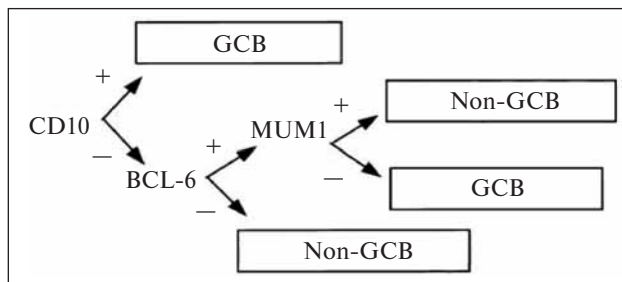


Рис. 1. Алгоритм для выделения герминального и постгерминального вариантов ДВККЛ с помощью иммуногистохимической техники [3].
GCB — герминальный вариант,
non-GCB — постгерминальный вариант

сии после проведения 4 циклов СНОР или R-СНОР, а также имевших признаки прогрессии на любом этапе лечения. Рецидивы классифицировали по времени возникновения следующим образом: ранними считали рецидивы, развившиеся через 3 (но не позднее 12) мес после окончания терапии, поздними — диагностированные через 12 мес. Потерянными из-под наблюдения считали пациентов, по которым не было сведений в течение > 12 мес.

Международный прогностический индекс (МПИ) оценен для 109 (66%) пациентов, по которым имелись соответствующие данные в полном объеме. МПИ определяли по 5-балльной шкале, учитывающей следующие прогностические факторы: 1) возраст ≤ 60 лет против > 60 лет; 2) активность ЛДГ в норме или повышена; 3) общий статус пациента по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group — Восточная онкологическая группа) 0—1 против 2—4; 4) клиническая стадия по классификации Энн-Арбор I—II против III—IV; 5) наличие экстранодальных поражений ≤ 1 или > 1 локализации [10].

Расчет ОВ и БСВ проводили по методу Каплана — Майера. Статистические различия между показателями выживаемости определяли с помощью непараметрического критерия Log-rank. Сравнительный анализ признаков между группами пациентов проводили с помощью непараметрического критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Математическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью статистического пакета SPSS 16.0.

Результаты

Характеристики включенных в исследование больных представлены в табл. 2.

В группе В-НХЛ-2004М медиана возраста на момент начала терапии составила 22,4 года (разброс 15—38 лет), в группе NHL-BFM-90 для В-НХЛ — 20,5 года (разброс 15—37 лет). Общий соматический статус по шкале ECOG ≥ 2 зафиксирован в 9 (90%) и 13 (72%) случаях соответственно. Половина пациентов на момент включения в исследование имели IV стадию заболевания по классификации Энн-Арбор: 5 (50%) и 9 (50%) соответственно. В-симптомы присутствовали у большинства больных: 8 (80%) и 10 (71%) соответственно. К группе промежуточного высокого и высокого риска (МПИ ≥ 3) были отнесены 4 (40%) и 3 (17%) больных.

В группе R-СНОР медиана возраста на момент начала терапии составила 59,5 года (разброс 28—80 лет), в группе СНОР — 29 (разброс 17—78) лет. Старше 60 лет было 46 (51%) и 6 (13%) больных соответственно. Статус по ECOG ≥ 2 имели 61 (67%) и 26 (63%) пациентов. В обеих группах у большинства пациентов диагностирована IV стадия заболевания: 68 (75%) и 32 (70%) соответственно. МПИ определен у 56 (61,5%) больных, получавших режим R-СНОР, и у 25 (54,6%) — СНОР.

Таблица 2. Инициальные клинические и биологические характеристики больных в зависимости от протокола лечения

Показатель	BFM-NHL-90m (n=18)		В-НХЛ-2004М (n=10)		R-СНОР (n=91)		СНОР (n=46)	
	абс.	%	абс.	Число больных %	абс.	%	абс.	%
Медиана возраста, годы	20,5 (15—38)		22,4 (15—38)		59,5 (28—80)		29 (17—78)	
Мужской пол	7	38,9	7	70	47	49	24	54
ECOG ≥ 2	13	72	9	90	61	67	26	63
IV стадия по Энн-Арбор	9	50	5	50	68	75	32	70
Поражение костного мозга	2	11	1	10	21	24	14	33
В-симптомы	10	71	8	80	37	49	24	55
Повышение ЛДГ*	13	72	6	60	24/57	42	15/21	56
МПИ ≥ 3	3	17	4	40	32/56	57	14/25	56

*ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

Таблица 3. Характеристика пациентов по иммуногистохимическим вариантам ДВККЛ в зависимости от протокола лечения

Показатель	В-НХЛ-2004М/BFM-NHL-90m				R-CHOP			
	ГЦ (n=6)		ABK (n=9)		ГЦ (n=16)		ABK (n=27)	
	абс.	%	абс.	Число больных %	абс.	%	абс.	%
Медиана возраста, годы	23,5 (16—38)		27,5 (16—50)		64 (28—79)		54 (29—76)	
ECOG ≥ 2	6	100	6	67	12	75	14	52
IV стадия по Энн-Арбор	4	67	5	83	9	56	14	52
Поражение костного мозга	1	17	2	22	0	0	5	19
МПИ ≥ 3	3	50	4	44	4	36	1	10*
В-симптомы	5	83	5	56	4	31	13	54*

* $p < 0,05$ между ГЦ и АВК.

К группе промежуточного высокого и высокого риска (МПИ ≥ 3) отнесено 32 (57%) и 14 (56%) пациентов соответственно.

Никаких статистически значимых различий в отношении инициальных клинических и биологических признаков между анализируемыми «парными» протоколами BFM-NHL-90m для В-НХЛ и В-НХЛ-2004М и, соответственно, R-CHOP и CHOP не выявлено ($p > 0,05$).

Молекулярный вариант ДВКЛЛ удалось выделить в 15 (54%) случаях у пациентов на протоколах В-НХЛ-2004М и NHL-BFM-90 для В-НХЛ и у 43 (47,2%) пациентов, получивших лечение по программе R-CHOP. К ГЦ ДВККЛ было отнесено 6 (40%) и 16 (37,2%), а к АВК — 9 (60%) и 27 (62,8%) случаев соответственно.

Инициальные характеристики больных, проанализированные в зависимости от молекулярного варианта ДВККЛ, представлены в табл. 3.

Среди всех обследованных пациентов было диагностировано в 1,5 раза больше случаев

постгерминальной ДВККЛ. Среди больных, получавших терапию по протоколам В-НХЛ-2004М или NHL-BFM-90, отмечено 6 (40%) случаев ГЦ и 9 (60%) — АВК соответственно. Между этими подгруппами не выявлено различий по возрасту пациентов, распределению по основным клиническим и биологическим характеристикам и величине МПИ ($p > 0,05$). В группе R-CHOP зафиксировано 16 (37%) случаев ГЦ и 27 (63%) — АВК. В этой терапевтической группе среди пациентов с ГЦ ДВККЛ было больше пациентов промежуточного высокого и высокого риска (МПИ ≥ 3), чем среди АВК: 4 (36%) против 1 (10%) соответственно ($p < 0,05$).

Эффективность протоколов В-НХЛ-2004М и NHL-BFM-90m. Результаты терапии представлены в табл. 4. ПР достигли 13 (72%) из 18 пациентов на терапии по протоколу NHL-BFM-90 и 8 (80%) из 10 больных, лечившихся по протоколу В-НХЛ-2004М ($p > 0,05$). Рефрактерными оказались 4 (22,2%) и 2 (20%) пациента соответствен-

Таблица 4. Результаты терапии

Показатель	BFM-NHL-90m (n=18)		В-NHL-2004М (n=10)		CHOP (n=46)		R-CHOP (n=91)	
	абс.	%	абс.	Число больных %	абс.	%	абс.	%
Рефрактерность к терапии	4	22	2	20	10	22	13	14
Смерть в индукции	1	6	0	0	0	0	0	0
ПР	13	72	8	80	34	74	78	86
Рецидив	2	11	2	20	11	24	12	13
Смерть в ремиссии	1	6	0	0	11	24	0	0
Потерины из-под наблюдения	0	0	0	0	2	4	1	1
ОВ	0,67 $\pm$ 0,11 (5-летняя)		0,65 $\pm$ 0,17 (2-летняя)		0,53 $\pm$ 0,08 (5-летняя)		0,82 $\pm$ 0,06 (2-летняя)	
БСВ	0,62 $\pm$ 0,12 (5-летняя)		0,6 $\pm$ 0,18 (2-летняя)		0,2 $\pm$ 0,07 (5-летняя)		0,61 $\pm$ 0,07 (2-летняя)	
Медиана наблюдения, годы	3,9 (0,4—8)		0,9 (0,2—2,2)		4,1 (1,1—13,4)		1,5 (0,2—8,4)	

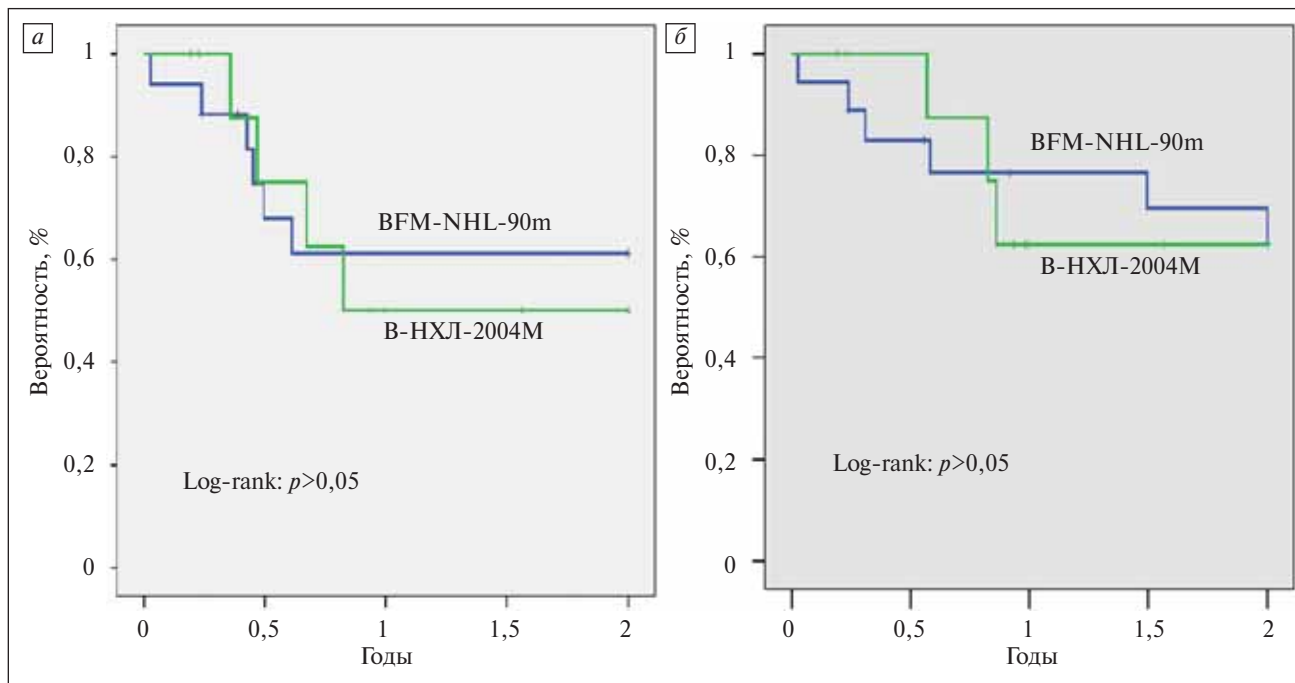


Рис. 2. Показатели ОВ (а) и БСВ (б) пациентов, получавших терапию по протоколам BFM-NHL-90m и B-HXL-2004M

но. Зафиксирован лишь 1 (6%) случай индукционной летальности на терапии NHL-BFM-90m. Рецидивы ДВККЛ развились у 2 (11,1%) пациентов на протоколе NHL-BFM-90m и у 2 (20,0%) — на B-HXL-2004M. В ПР от развития инфекционных осложнений, связанных с проведением протокола NHL-BFM-90m, умер 1 (5,6%) пациент. В ППР находятся 10 (55,5%; медиана наблюдения — 3,9 года) и 6 (60%; 0,9 года) больных соответственно ($p > 0,05$). Пятилетняя БСВ для пациентов, пролеченных по протоколу NHL-BFM-90m, составила $0,62 \pm 0,12$; ОВ — $0,67 \pm 0,11$. Двух-

летняя БСВ для больных, получивших терапию по протоколу B-HXL 2004-M, равнялась $0,6 \pm 0,18$; ОВ — $0,65 \pm 0,17$ (рис. 2).

Эффективность протоколов CHOP и R-CHOP. Добавление ритуксимаба к режиму CHOP позволяет повысить частоту достижения ПР: 34 (74%) — CHOP против 78 (86%) — R-CHOP ($p > 0,05$). Рефрактерными к терапии оказались 10 (22%) и 13 (14%) пациентов соответственно ($p < 0,05$). На протяжении проведения индукционной терапии в данном исследовании не умер ни один больной. Рецидивы ДВККЛ развились в 11

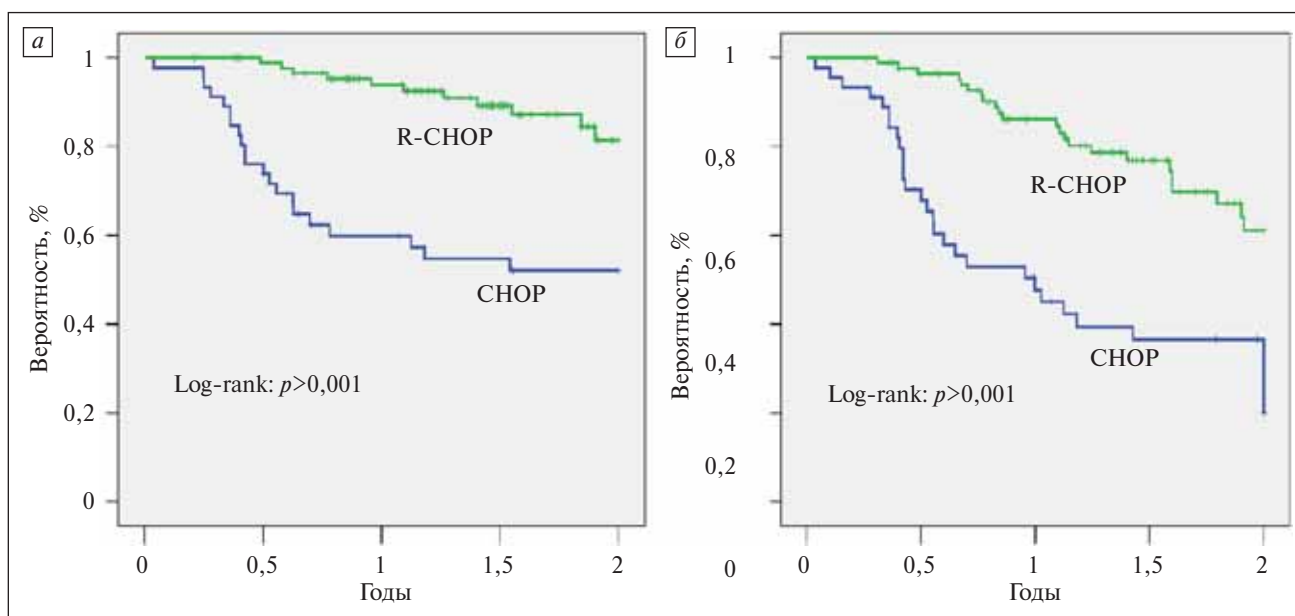


Рис. 3. Показатели ОВ (а) и БСВ (б) пациентов, получавших терапию по программам CHOP и R-CHOP

Таблица 5. Результаты терапии пациентов с герминальным и постгерминальным вариантами на интенсивных протоколах В-НХЛ-2004М/BFM-NHL-90т и режиме R-CHOP

Показатель	В-НХЛ-2004М/BFM-NHL-90т				R-CHOP			
	ГЦ (n=6)		АВК (n=9)		ГЦ (n=16)		АВК (n=27)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Рефрактерность к терапии	0	0	1	11	2	13	4	15
Смерть в индукции	0	0	0	0	0	0	0	0
ПР	6	100	8	89	14	88	23	85
Рецидив	0	0	3	33*	1	6	4	15
Смерть в ремиссии	0	0	1	11	0	0	0	0
Потерины из-под наблюдения	0	0	0	0	0	0	0	0
БСВ	1,0±0,0 (5-летняя)		0,44±0,17*		0,51±0,23 (2-летняя)		0,58±0,13 (2-летняя)	
ОВ	1,0±0,0 (5-летняя)		0,58±0,2*		0,92±0,07 (2-летняя)		0,59±0,14 (2-летняя)	
Медиана наблюдения, годы	5,2 (2,1—8,4)		1,5 (0,9—5,9)		1,4 (0,4—2,1)		1,5 (0,2—2)	

* $p < 0,05$.

(24%) и 12 (13%) случаях соответственно. Вследствие различных причин в ПР ДВККЛ умерли 10 (21,7%) пациентов, получавших поли-ХТ по программе СНОР, в то время как на R-CHOP подобных событий не зарегистрировано — 0 (0%; $p < 0,05$). На момент подготовки данной публикации были потерины из-под наблюдения 2 (4%) и 1 (1%) больной соответственно. В ППР находятся 15 (33%; медиана наблюдения — 4,1 года) и 65 (71%; 1,5 года) больных соответственно ($p < 0,05$). Пятилетняя БСВ для пациентов, пролеченных с помощью режима СНОР, составила $0,2 \pm 0,07$; ОВ — $0,53 \pm 0,08$. Двухлетняя БСВ на программе R-CHOP равнялась $0,61 \pm 0,07$; ОВ — $0,82 \pm 0,06$ (рис. 3).

Анализ результатов в соответствии с иммуногистохимическими вариантами ДВККЛ. Результаты терапии по протоколам В-НХЛ-2004М/NHL-BFM-90т и R-CHOP в зависимости от иммуногистохимического варианта заболевания представлены в табл. 5.

На интенсивных «блоковых» протоколах лечения ПР достигли 6 (100%) пациентов с ГЦ и 8 (89%) — с АВК ДВККЛ. Среди пациентов с ГЦ не отмечено случаев первичной рефрактерности или рецидивов заболевания. Все пациенты пребывают в ППР (медиана наблюдения — 5,2 года). Пятилетняя БСВ и ОВ составили $1,0 \pm 0,0$. Напротив, в группе АВК зарегистрированы 1 (11%) случай рефрактерности к терапии, 3 (33%) рецидива ($p < 0,05$) и 1 (11%) случай смерти вследствие развития осложнений терапии. В ППР находятся лишь 4 (44%) пациента с медианой наблюдения 1,5 года. Пятилетняя БСВ составила $0,44 \pm 0,17$ ($p < 0,05$); ОВ — $0,58 \pm 0,2$.

В отличие от «блоковой» терапии значимых различий в результатах лечения по протоколу R-CHOP в зависимости от иммуногистохимического варианта не получено. ПР достигли 8 (62%) пациентов с вариантом ГЦ ДВККЛ и 13 (57%) — с АВК ($p > 0,05$). Рефрактерными к терапии оказались 2 (15%) и 3 (13%) больных соответственно ($p > 0,05$). Рецидивы возникли в 1 (8%) и 3 (13%) случаях ($p > 0,05$). Двухлетняя БСВ составила $0,51 \pm 0,23$ и $0,58 \pm 0,13$ ($p > 0,05$), ОВ — $0,92 \pm 0,07$ и $0,59 \pm 0,14$ ($p > 0,05$) при медиане наблюдения 1,4 и 1,5 года соответственно (рис. 4).

Обсуждение

Стандартом лечения ДВККЛ у взрослых до 2004 г. был режим СНОР. Эффективность лечения продвинутых стадий ДВККЛ с помощью СНОР-подобных режимов была невысокой: 5-летняя ОВ не превышала 30—40% [11]. После-

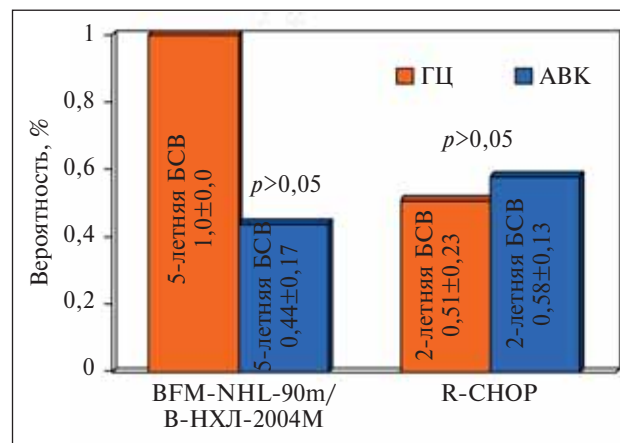


Рис. 4. Показатели БСВ пациентов с ГЦ и АВК ДВККЛ в зависимости от характера проведенной терапии

дующие попытки улучшения результатов были связаны с повышением интенсивности ХТ. К сожалению, в условиях рандомизированных исследований режимы 2-й и 3-й генерации оказались более токсичными и не показали преимущества перед СНОР [11, 12]. В то же время в более поздних исследованиях М. Pfreundschuh и соавт. [13] продемонстрировали, что сокращение интервалов между курсами СНОР с 21 до 14 дней (повышение дозоинтенсивности на 10%) существенно улучшает ОВ пожилых больных, в то время как дальнейшая интенсификация (добавление этопозиды — СНОР-14) при повышении токсичности не приносит дополнительной пользы. Кардинальные изменения в лечении ДВККЛ произошли после включения в терапевтические схемы моноклональных антител. Ритуксимаб (Мабтера) — химерные моноклональные антитела мыши/человека, которые специфически связываются с общим В-клеточным трансмембранным антигеном CD20. Возможные механизмы лизиса В-клеток после взаимодействия с ритуксимабом включают антителозависимую клеточную и комплементзависимую цитотоксичность, индукцию апоптоза. Режим ритуксимаб + СНОР в настоящее время признан эффективным и безопасным стандартом лечения взрослых больных ДВККЛ [14]. Таким образом, интенсификация ХТ приводит к повышению эффективности не во всех случаях, поэтому крайне важно определить круг пациентов, для которых она окажется оптимальной.

Известно, что наиболее значимое биологическое различие с точки зрения молекулярно-генетических событий при ДВККЛ существует между вариантами из герминальных и постгерминальных клеток. В своей работе мы исследовали в отношении данных молекулярно-биологических вариантов ДВККЛ клиническую эффективность принципиально различающихся по дозой интенсивности режимов ХТ — «блоковую» терапию по NHL-BFM-90-подобным протоколам, принятую в педиатрической гематологии, и программу R-СНОР, стандартную для взрослой практики.

Поскольку анализ профиля экспрессии генов является технически достаточно сложным исследованием, в нашем проекте использован относительно простой алгоритм, предложенный С.Р. Hans и соавт. [3]. Методика основана на оценке экспрессии 3 ключевых маркеров — CD10, BCL6, MUM1 с помощью иммуногистохимического исследования биоптатов опухоли. Показатели БСВ наших пациентов в зависимости от иммуногистохимического варианта и проведенной терапии представлены на рис. 4. Оказалось, что интенсивная «блоковая» терапия несет несомненное преимущество для молодых пациентов

с ГЦ ДВККЛ по сравнению с режимом R-СНОР: 5-летняя БСВ $1,0 \pm 0,0$ против 2-летней БСВ $0,51 \pm 0,23$ ($p < 0,05$).

Как упоминалось выше, основную долю педиатрических случаев составляют ГЦ ДВККЛ. Одним из ведущих патогенетических механизмов в случае ГЦ ДВККЛ является активация *c-мус* — гена, играющего существенную роль в контроле клеточной пролиферации, дифференцировки и клеточного апоптоза. Повышение экспрессии данного гена происходит в случае хромосомной транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, встречающейся в 38% случаев ДВККЛ у детей и чуть менее 10% — у взрослых [10]. В педиатрической практике, как правило, для лечения ДВККЛ используют унифицированные протоколы, аналогичные таковым для лимфомы и лейкомии Беркитта, таким образом, «перекрывающие» все случаи с активацией *c-мус*. Результаты лечения по этим протоколам очень высоки: 5-летняя БСВ достигает 95% [15]. На основании полученных нами данных представляется оправданным лечение молодых пациентов с ГЦ ДВККЛ по BFM-подобным протоколам. К сожалению, выполнимость данных протоколов ограничивается возрастной переносимостью и может быть рекомендована для лечения только молодых пациентов [16].

Результаты терапии постгерминальной ДВККЛ на «блоковой» терапии не показали какого-либо преимущества перед режимом R-СНОР: 5-летняя БСВ $0,44 \pm 0,17$ против 2-летней БСВ $0,58 \pm 0,13$ ($p > 0,05$). И, что представляется особенно интересным, на режиме R-СНОР вообще не было различий в результатах терапии ГЦ и АВК ДВККЛ: 2-летняя БСВ $0,51 \pm 0,23$ против $0,58 \pm 0,13$ ($p > 0,05$). Совершенствование терапии часто меняет значимость отдельных прогностических факторов, имевших значение в прошлом. Добавление ритуксимаба к тем или иным ХТ-режимам также может изменять значение факторов прогноза. Ритуксимаб улучшает результаты терапии как ГЦ, так и АВК ДВККЛ и, таким образом, нивелируется неблагоприятное прогностическое значение последнего варианта. Сходные результаты были продемонстрированы в ряде исследований. В частности, в работе Н. Numan и соавт. [17] на терапии по программе R-СНОР выживаемость, свободная от неудач в лечении за 27 мес, составила для ГЦ ДВККЛ 68%, а для АВК — 63% ($p > 0,05$).

Перспективы терапии ДВККЛ, в частности АВК, по-видимому, связаны с созданием новых «таргетных» препаратов. Известно, что ключевым моментом патогенеза АВК ДВККЛ является конститутивная активация NF-κB [3]. Стимуляция рецептора способствует активации I-κB-киназы, которая фосфорилирует I-κB, что приводит к его деградации. При этом транскрипцион-

ный фактор NF-κB поступает в ядро и включает экспрессию множества генов-мишеней (*IRF-4*, циклин *D2*, *I-κB*, *BCL-2*, *CCR7*, *Pim-1*, *Lyn*, *BIC*, *CD44*, *FLICE*, *IM684838*, *EBI2*, *NCF2*, *DIFF48*, *SNF2L2*, *NF-κB1*). В связи с тем что пролиферация, процессы метастазирования и выживание опухолевых клеток зависят от белков, расщепляемых в протеосомах, терапевтическое воздействие на уровне указанных реакций может приводить к гибели клеток и блокированию онкогеназа [18]. Ряд химических соединений тестируется в лечении ДВККЛ. В частности, бортезомиб (Велкейд) — новый препарат, являющийся ингибитором протеосомной помпы. Он подавляет активность протеосомы 26S и предотвращает направленный протеолиз, тем самым оказывает влияние на многие внутриклеточные каскады реакций передачи сигнала. Недавно опублико-

ванные данные свидетельствуют о том, что добавление бортезомиба к режиму R-СНОР улучшает результаты терапии АВК и не влияет на лечение ГЦ ДВККЛ [19]. Другим препаратом, блокирующим активацию NF-κB, является новый иммуномодулирующий препарат леналидомид (Ревлид). Препарат продемонстрировал обнадеживающую активность и низкую токсичность у пациентов с рецидивами и первично рефрактерной ДВККЛ [20].

Данные, полученные в ходе нашей работы, свидетельствуют о целесообразности применения интенсивных ВФМ-подобных протоколов для лечения подростков и молодых взрослых с ДВККЛ из клеток ГЦ и могут служить обоснованием для проведения соответствующего проспективного исследования на большем числе пациентов.

Л и т е р а т у р а

1. Поддубная И.В. Неходжкинские лимфомы. В кн.: Клиническая онкогематология. Под. ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2001. с. 336—75.
2. Самочатова Е.В. Неходжкинские лимфомы у детей: от патогенетической классификации к успешной терапии. Вopr гематол онкол иммунопатол педиатр 2007;6(4):5—12.
3. Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C. et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2004;103(1):275—82.
4. Spagnolo D.V., Ellis D.W., Juneja S. et al. The role of molecular studies in lymphoma diagnosis: a review. Pathology 2004;36(1):19—44.
5. Reiter A., Schrappe M., Parwaresch R. et al. NHL of childhood and adolescence: Results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage. A report of the BFM Group. J Clin Oncol 1995;13(2):359—72.
6. Klapper W., Szczepanowski M., Burkhardt B. et al. Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. Blood 2008;112(4):1374—81.
7. Feugier P., Van Hoof A., Sebban C. et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 2005;23(18):4117—26.
8. Семочкин С.В., Бобкова М.М., Лория С.С. и др. Опыт терапии подростков и взрослых больных с неходжкинскими лимфомами по педиатрическому протоколу NHL-BFM-90m. Вopr гематол онкол иммунопатол педиатр 2007;6(1):18—25.
9. Самочатова Е.В., Мякова Н.В., Литвинов Д.В. и др. Применение Ритуксимаба (Мабтера) в комбинированном лечении В-клеточных неходжкинских лимфом у детей: предварительные результаты. Вopr гематол онкол иммунопатол педиатр 2004;3(4):54—60.
10. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R. et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N Engl J Med 1993;329(14):987—94.
11. Gordon L.I., Harrington D., Andersen J. et al. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1992;327(19):1342—9.
12. Messori A., Vaiani M., Trippoli S. et al. Survival in patients with intermediate or high grade non-Hodgkin's lymphoma: meta-analysis of randomized studies comparing third generation regimens with CHOP. Br J Cancer 2001;84(3):303—7.
13. Pfreundschuh M., Trümper L., Kloess M. et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. Blood 2004;104(3):634—41.
14. Pfreundschuh M., Trümper L., Osterborg A. et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. Lancet Oncol 2006;7(5):379—91.
15. Dave B., Weisenburger D., Higgins C. et al. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization studies of diffuse large B-cell lymphoma in children and young adults. Cancer Genet Cytogenet 2004;153(2):115—21.
16. Семочкин С.В. Оптимизация технологий лечения лимфопролиферативных заболеваний у подростков и лиц молодого возраста. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2007.
17. Nyman H., Adde M., Karjalainen-Lindsberg M.L. et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. Blood 2007;109(11):4930—5.
18. Espinosa I., Briones J., Bordes R. et al. Activation of the NF-κB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications. Histopathology 2008;53(4):441—9.
19. Dunleavy K., Pittaluga S., Czuczman M. et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2009;113(24):6069—76.
20. Wiernik P.H., Lossos I.S., Tusciano J.M. et al. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2008;26(30):4952—7.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЖИМОВ ХИМИОТЕРАПИИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА BFM-90m, MB-91 И PECO-92 В МОСКВЕ И САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Э.Г. Бойченко¹, Э.М. Петрова¹, М.Б. Ивановская¹, И.А. Гарбузова¹, М.Б. Белогурова²,
Г.Г. Радулеску², Ю.В. Румянцева³, Д.В. Литвинов^{3,4}, С.Н. Лагойко³, К.Л. Кондратчик⁵,
Н.И. Пономарева^{3,4}, Н.Р. Тюкалова⁴, А.И. Карачунский³

¹Детская городская больница №1; ²Городская клиническая больница №31, Санкт-Петербург;

³ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ⁴Российская детская клиническая больница; ⁵Морозовская городская детская клиническая больница №1, Москва

Контакты: Эльмира Госмановна Бойченко boychenko_elmira@dgb.spb.ru

Проведен сравнительный ретроспективный анализ результатов лечения по 3 режимам химиотерапии (ХТ) — ALL BFM-90m, ALL MB-91 и PECO-92 у первичных больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в возрасте до 18 лет, зарегистрированных в клиниках Москвы и Санкт-Петербурга в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1999 г. Этот анализ показал, что если между протоколами ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 никаких различий в результатах лечения ОЛЛ у детей обнаружено не было, то результаты лечения на протоколе PECO-92 оказались значительно хуже. Бессобытийная выживаемость (БСВ) у больных из Санкт-Петербурга, лечившихся по протоколу PECO-92, достоверно хуже, чем у пациентов, получавших протоколы ALL-BFM-90m ($p=0,0056$) и ALL-MB-91 ($p=0,0239$) — 60 ± 3 , 74 ± 4 и $73\pm4\%$ соответственно. Основной причиной ухудшения результатов лечения больных ОЛЛ по данному протоколу стало большее число рецидивов. При этом различий летальности в индукции и в ремиссии между тремя режимами ХТ ОЛЛ у детей не отмечено. Достоверные и наиболее резкие различия в отношении БСВ между протоколом PECO-92 и программами ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 получены в подгруппах мальчиков, среди детей в возрастной группе от 1 года до 10 лет, с инициальным лейкоцитозом $> 100\ 000/\text{мм}^3$, у пациентов с не-Т-клеточным фенотипом и у пациентов с увеличением селезенки > 4 см.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, химиотерапия, PECO-92, ALL-MB-91, ALL-BFM-90

COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE VARIOUS CHEMOTHERAPY PROTOCOLS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BFM-90M, MB-91 AND PECO-92 IN MOSCOW AND ST.-PETERSBURG

E.G. Boichenko¹, E.M. Petrova¹, M.B. Ivanovskaya¹, I.A. Garbusova¹, M.B. Belogurova², G.G. Radulesku², Yu.V. Roumiantseva³,
D.V. Litvinov^{3,4}, S.N. Lagoiko³, K.L. Kondratchik⁵, N.I. Ponomareva^{3,4}, N.R. Tukaeva⁴, A.I. Karachunsky³

¹Municipal children hospital №1, St.-Petersburg; ²Municipal clinical hospital №31, St.-Petersburg; ³Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow; ⁴Russian children clinical hospital, Moscow; ⁵Morozov children clinical hospital №1, Moscow

Comparative retrospective analysis of treatment results of three different chemotherapy protocols - ALL BFM 90m, ALL MB 91 and PECO 92 — in primary ALL patients aged before 18 years, registered in Moscow and St-Petersburg clinics from 01.01.1993 to 01.01.1999 is presented. It has been shown, that treatment results of PECO 92 protocol have appeared much worse, thus, any differences in treatment results for children with ALL between ALL BFM 90m and ALL MB 91 protocols were not revealed. Event-free survival (pEFS) of St-Petersburg patients, received PECO 92 protocol ($60\pm3\%$), was significantly worse, in comparison with patients treated according to ALL BFM 90m protocol ($74\pm4\%$; $p=0,0056$) and ALL MB 91 protocol ($73\pm4\%$; $p=0,0239$). The high incidence of relapses became a main cause of efficacy decreasing. Differences of induction and remission death incidences between three chemotherapy protocols were not revealed. Significant and most expressive EFS differences between PECO-92 and two other protocols were obtained in boys, in a 1—10 age group, and in patients with leukocytes count $> 100\ 000/\text{mm}^3$, in patients with non-T-ALL and in patients with spleen size > 4 cm.

Key words: acute lymphoblastic leukemia (ALL), children, chemotherapy, PECO-92, ALL-MB-91, ALL-BFM-90

До 90-х годов XX в. в странах бывшего СССР не существовало программного лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Различные клиники проводили лечение пациентов с помощью чередующихся схем введения химиопрепаратов (ВАМП — винкристин, адриамицин, мелфалан, преднизолон, ЦАМП — замена винкристина циклофосфаном, применение интерферона и т.д.), при этом выживаемость не превышала 20%, а леталь-

ность от терапии составляла 15% [1]. Улучшить это сложное положение можно было либо путем применения хорошо отработанных на Западе программ интенсивной химиотерапии (ХТ), либо посредством создания оригинального отечественного протокола.

В связи с расширением международного сотрудничества и появлением возможностей профессионального обмена в начале 90-х годов началось активное внедрение принятых на Западе методов ин-

тенсивной ХТ, в основе которых была заложена интенсификация раннего этапа лечения с целью полноценной изначальной редукции лейкоемического клона и предотвращения формирования оставшихся лимфобластами лекарственной резистентности [2]. Для этого использовали чередующиеся лекарственные комбинации с малой перекрестной резистентностью и потенцирующим действием [3].

Протоколы германской исследовательской группы BFM (Berlin—Frankfurt—Münster Group) явились первой западной программой поли-ХТ (ПХТ), которая получила широкое распространение в онкогематологических отделениях нашей страны [4] и в 90-х годах стала стандартом *de facto* в России.

На развитие интенсивной ХТ в Санкт-Петербурге благодаря сотрудничеству с Клиникой Гамбургского университета основное влияние оказала терапевтическая программа другой германской исследовательской группы — COALL (Cooperative study group for childhood ALL). Главной целью исследований, проводимых группой COALL, помимо улучшения долговременной выживаемости, было снижение токсичности ХТ (перенос введения L-аспарагиназы с индукции на более поздние этапы лечения; введение L-аспарагиназы в виде очень высоких однократных доз, обеспечивающих полноценную деплецию аспарагина, вместо многократных малых доз; снижение кумулятивной дозы антрациклинов и поиск «щадящих» путей их введения для минимизации кардиотоксического эффекта) и постепенное уменьшение числа детей, получивших краниальное облучение [5].

Существовало несколько причин для внедрения модифицированных, а не оригинальных программ ХТ в России. К 90-м годам в экономически развитых странах был накоплен огромный опыт по проведению программной интенсивной ПХТ ОЛЛ у детей [8—8]. С одной стороны, это свидетельствовало о неоспоримом преимуществе использования данного метода лечения и демонстрировало значительное улучшение показателей долговременной выживаемости, с другой — не оставалось сомнений в том, что процесс проведения интенсивной ХТ сопровождается развитием тяжелых осложнений, обусловленных токсическими эффектами самих химиопрепаратов и глубокой депрессией кроветворения, неизбежно возникавшей в ходе лечения. Успешное проведение ХТ требовало бесперебойного и полноценного обеспечения дорогостоящими препаратами для цитостатической и сопроводительной терапии, а также организации четкой инфраструктуры лечебно-диагностического процесса.

Важным моментом было и то, что к 90-м годам на Западе появилась статистика вторых опухолей (second malignancies), возникавших у детей-«долгжителей», получивших химиолучевую терапию в раннем детстве и находившихся в стойкой продолжительной ремиссии ОЛЛ [9—14]. Возникновение вторых опухолей было обусловлено канцеро-

генным эффектом некоторых цитостатических препаратов, но прежде всего — краниальным облучением в рамках профилактики поражения центральной нервной системы (ЦНС) при лейкемии. В связи с этим необходимо было резко ограничить показания к проведению лучевой терапии ЦНС, а также снизить интенсивность программ ХТ у больных с низким риском развития рецидивов.

По этой причине в оригинальные протоколы BFM и COALL были внесены модификации, адаптирующие данные лечебные программы для применения в условиях российских клиник. Эти модификации в протоколе BFM касались в основном снижения дозы метотрексата, а в протоколе COALL — уменьшения разовых доз L-аспарагиназы и цитарабина.

В 1992 г. с учетом результатов проведенных группой COALL кооперативных исследований (COALL-82, COALL-85, COALL-89 [5, 15—22]) был разработан специальный протокол для Санкт-Петербурга РЕСО-92. Одновременно в России стал широко использоваться модифицированный вариант германского протокола ALL-BFM-90 — ALL-BFM-90m.

В 1991 г. появился первый отечественный протокол для лечения ОЛЛ у детей — «Москва—Берлин 91», или ALL-MB-91 [23—27]. Теоретической основой данного протокола послужила научная концепция о ключевой роли скрытой нейрорлейкемии в патогенезе ОЛЛ у детей [28] и о возможности ее эффективного контроля с помощью терапевтических элементов, отобранных на основе данных, полученных немецкой группой BFM (ALL-BFM 76/79, 81/83, 86) [29, 30], в голландских исследованиях DCLSG (Dutch Childhood Leukemia Study Group) ALL-5 и ALL-6 [31, 32] и американской группой Dana Farber (DFCI 81-01 и 85-01) [33—35]. Несмотря на то что были использованы терапевтические компоненты из режимов терапии DFCI и DCLSG ALL-6, данный протокол существенно отличался по своему дизайну от всех имевшихся на тот период времени программ ХТ ОЛЛ у детей, в том числе ALL-BFM-90 и COALL.

Основными идеями нового протокола являлись замена преднизолона на дексаметазон, применение длительного режима терапии аспарагиназой и использование пролонгированной интратекальной терапии тремя препаратами — метотрексатом, цитарабином и дексаметазоном. Важные составляющие нового режима терапии ОЛЛ — полный отказ от интенсивной ХТ, значительная редукция кумулятивной дозы антрациклинов и отказ от краниального облучения для большинства больных. Это должно было сделать его более простым в выполнении и менее токсичным, чем упомянутые выше западные программы ХТ [36].

За последние 15 лет онкогематологическими отделениями Москвы и Санкт-Петербурга накоплено большое количество данных, полученных в результате проведения различных режимов ХТ ОЛЛ у детей. Возникла необходимость эти данные детально проанализировать и обобщить с целью

выбора наиболее оптимального режима терапии. В связи с этим было решено провести сопоставление различных подходов к проведению программной ХТ ОЛЛ у детей путем объединения баз данных клиник Москвы и Санкт-Петербурга с последующим проведением метаанализа.

В период с января 1993 г. до января 2007 г. в клиниках Москвы и Санкт-Петербурга пролечено свыше 1300 детей с ОЛЛ. С учетом того что не только дизайны протоколов модифицировались за прошедшие 15 лет, но (что гораздо более существенно) также значительно изменилось качество сопроводительной терапии и опыт врачей клиник, для максимально корректного анализа было принято решение сравнивать между собой группы больных, зарегистрированные за одинаковые промежутки времени. Поскольку первый модифицированный вариант протокола COALL, названный PECO-92, был завершен в декабре 1998 г., в нашей работе мы приводим данные сравнительного анализа результатов лечения по 3 режимам ХТ — ALL-BFM-90m, ALL-MB-91 и PECO-92 — у больных, зарегистрированных в клиниках Москвы и Санкт-Петербурга в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1999 г.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование включены данные первичных больных ОЛЛ в возрасте до 18 лет, находившихся на лечении в отделениях онкологии и гематологии детского возраста Санкт-Петербурга и Москвы в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1998 г. К категории первичных были отнесены пациенты, которые не получали ХТ до начала специфического лечения либо получили лечение преднизолоном длительностью ≤ 7 дней, поскольку такая терапия могла быть приравнена к циторедуктивной предварительной фазе; диагноз ОЛЛ в этом случае был подтвержден данными цитохимического исследования и иммунофенотипирования.

Набор первичных пациентов. Проанализированы данные первичных больных ОЛЛ, поступавших в Республиканскую детскую клиническую больницу, Морозовскую детскую клиническую больницу (Москва), Детскую городскую больницу №1 и Городскую больницу №31 (Санкт-Петербург).

Критерии включения. В данной работе пациенты включались в анализ при выполнении следующих условий:

- возраст на момент постановки диагноза от 0 до 18 лет;
- начало индукционной терапии: 01.01.1993—01.01.1998;
- зарегистрированы в перечисленных выше клиниках;
- наличие диагноза ОЛЛ, установленного на основании клинических данных, анализов периферической крови, результатов морфологического и цитохимического исследований и иммунофенотипирования клеток костного мозга;

— получение информированного согласия родителей (опекунов) пациента на лечение.

Больных исключали из анализа при наличии хотя бы одного из перечисленных ниже признаков:

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

Клинические группы, проанализированные в данной работе:

1) пациенты ($n=149$), получавшие лечение в соответствии с протоколом ALL-BFM-90m на базе 2 отделений РДКБ и отделения детской гематологии Морозовской детской клинической больницы и поступившие в указанные выше клиники в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1999 г.;

2) все первичные больные ($n=130$), получавшие лечение в соответствии с протоколом ALL-MB-91 на базе 2 отделений РДКБ и отделения детской гематологии Морозовской детской клинической больницы и поступившие в указанные выше клиники в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1999 г.;

3) все первичные больные ($n=214$), получавшие лечение в соответствии с протоколом PECO-92 на базе отделений онкогематологии Детской городской больницы №1 и Городской больницы №31 Санкт-Петербурга и поступившие в клиники в период с 01.01.1993 г. по 01.01.1999 г.

Таким образом, все 3 протокола, а именно — ALL-MB-91, ALL-BFM-90 и ALL-PECO — проводились в Москве и Санкт-Петербурге в одно и то же время.

Режимы ХТ ОЛЛ у детей. Детали режимов ХТ, профилактики нейтролейкемии и стратификации по группам риска представлены в табл. 1—4.

Для стратификации на группы риска использовали комбинации различных факторов риска. Несмотря на то что иммунофенотип, инициальное поражение ЦНС, наличие ремиссии на 28—36-е сутки индукции и наличие $t(9;22)$ во всех протоколах были общими критериями стратификации, по другим параметрам стратификация отличалась. При этом в протоколах ALL-MB-91 и PECO-92 стратификацию производили на 2 группы — стандартного и высокого риска, а в протоколе ALL-BFM-90m — на 3 группы — стандартного, промежуточного и высокого риска.

Все протоколы ХТ включали в себя индукцию ремиссии, интенсивную фазу лечения (или так на-

Таблица 1. Стратификация на группы риска в зависимости от протокола¹

Показатель	BFM-90	стандартный MB-91	РЕСО	Риск промежуточный BFM-90	BFM-90	высокий MB-91	РЕСО
Инициальный лейкоцитоз	RF* $\leq$ 0,8	$\leq$ 50 000	$\leq$ 25 000	RF $\geq$ 0,8	— ²	$\geq$ 50 000	$\geq$ 25 000
Органомегалия	RF $\leq$ 0,8	— ²	— ²	RF $\geq$ 0,8	— ²	— ²	— ²
Иммунофенотип	не-Т-клеточный	не-Т-клеточный	не-Т-клеточный	Т-клеточный	—	Т-клеточный	Т-клеточный
Возраст, годы	—	>1	—	—	—	<1	— ²
Поражение ЦНС	Нет	Нет	Нет	Да	—	Да	Да
t(4;11)	—	—	—	—	—	—	— ²
t(9;22)	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Да
Ответ на 8-й день: бласты в крови, мкл	<1000	— ²	— ²	— ²	≥ 1000	— ²	— ²
Ремиссия на 28/36-й день	Да	Да	Да	Да	Нет	— ³	Нет

¹Для стратификации в группу стандартного риска должны выполняться все критерии, а для стратификации в группы промежуточного и высокого риска — хотя бы один. ²Знак прочерка (—) означает, что данный фактор не используется в протоколе как критерий для стратификации в данную группу риска. ³В протоколе ALL-MB-91 отсутствие ремиссии на 36-й день индукции означало не группу высокого риска, а расценивалось как событие (nonresponder). *RF — фактор риска.

зываемую консолидацию ремиссии), поддерживающую терапию и локальную профилактику нейролейкемии. Детали индукции ремиссии и интенсивной фазы терапии, включавшей в себя одну или несколько консолидаций и/или реиндукций, отражены в табл. 2. В табл. 3 представлена поддерживающая терапия, а в табл. 4 — режимы профилактики нейролейкемии в зависимости от программы ХТ.

Модификация протокола ALL-BFM-90 в России заключалась в изменении дозы и режима введения метотрексата (вместо 5 г/м² в течение 24 ч — 1 г/м² в течение 36 ч).

Принципиальным отличием протокола РЕСО-92 по сравнению с оригинальным протоколом COALL явилось уменьшение дозы L-аспарагиназы с 45 000 до 25 000 ЕД/м² и разовой дозы цитозара с 3 до 2 г/м².

Диагностика и определение событий. Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании международных критериев с оценкой клинических данных, анализов периферической крови, результатов исследования костного мозга при наличии $\geq 25\%$ лимфобластов. Для верификации варианта лейкемии использовали морфологическое, цитохимическое, иммунологическое, цитогенетическое и молекулярно-биологическое исследования мононуклеаров костного мозга.

В ходе иммунофенотипирования определяли линейную принадлежность лейкоэмических бластных клеток. ОЛЛ из клеток-предшественников В-клеточного ряда диагностировали в случае, если $> 20\%$ бластных клеток были положительны по TdT, CD19 и HLA-DR (pro-B-ОЛЛ), либо по TdT, CD10, CD19 и HLA-DR (common ОЛЛ), или по TdT, CD10, CD19, HLA-DR и цитоплазматическому IgM

(pre-B-ОЛЛ). Т-клеточный ОЛЛ был верифицирован при наличии $> 20\%$ бластных клеток, положительных по TdT, CD2, цитоплазматическому CD3 (CyCD3) и/или CD7. Острый недифференцированный лейкоз (ОНЛ) диагностировали, когда все маркеры, характерные для pro-B, common, pre-B и Т-клеточных вариантов ОЛЛ, а также все миелоидные маркеры были отрицательными. Пациенты с ОНЛ и зрелой В-клеточной лейкемией в исследование не включались. По техническим причинам определение иммунофенотипа было проведено у 133 из 149 больных, получавших терапию по протоколу ALL-BFM-90m, у 118 из 130 пациентов, лечившихся по протоколу ALL-MB-91, и у 187 из 214 больных, получивших лечение по протоколу РЕСО 92.

Поражение ЦНС диагностировали при цитозе > 5 ядросодержащих клеток в 1 мкл цереброспинальной жидкости и наличии при этом лейкоэмических бластных клеток либо при выявлении лейкоэмической инфильтрации головного мозга. Статус ЦНС остался неизвестным у 3 больных, лечившихся по программе ALL-BFM-90m.

Костномозговая ремиссия считалась достигнутой при наличии в костномозговом пунктате $<5\%$ бластных клеток, полиморфной цитологической картине костного мозга, нормальном анализе крови и отсутствии экстрамедуллярных проявлений лейкемии. **Ранняя смерть** или смерть в индукции определялась как летальный исход в течение преднизолоновой профазы и терапии индукции до начала консолидации. **Смертью во время ремиссии** считали смерть, наступившую по разным причинам после достижения костномозговой ремиссии. **Рефрактерными к терапии** (non-responders) считались пациенты,

Таблица 2. Индукция и интенсивная фаза ХТ в зависимости от протокола

Препарат	ALL-MB-91		ALL-BFM-90m		РЕСО-92	
	доза/м ²	способ применения, нед	доза/м ²	способ применения, нед	доза/м ²	способ применения, нед
	Индукция		Индукция (протокол Ia)		Индукция	
Преднизолон			60 мг	Внутрь ежедневно; 1—4		
Дексаметазон	6 мг	Внутрь ежедневно; 1—4			6 мг	Внутрь ежедневно; 1—4
Винкристин	1,5 мг	В/в еженедельно №5; 1—5	1,5 мг	В/в еженедельно №4; 1—4	1,5 мг	В/в еженедельно №4; 1—4
Даунорубин	45 мг	В/в №1 (2); 1(3)	30 мг	В/в еженедельно №4; 1—4	36 мг	В/в еженедельно №4; 1—4
L-аспарагиназа	10 000 ЕД	В/м №2; 5 и 6	10 000 ЕД	В/в 1 раз в 3 дня №8; 2—5		
Консолидация I			Интенсификация Протокол Ib		Консолидация	
Меркаптопурин	50 мг	Внутрь ежедневно; 8—13	50 мг	Внутрь ежедневно; 6—9	100 мг	Внутрь ежедневно; 5, 7 и 12
Метотрексат	30 мг	В/м еженедельно №6; 8—13				
Высокодозный метотрексат					1000 мг	В/в в течение 24 ч №3; 5, 7 и 12
L-аспарагиназа	10 000 ЕД	В/м еженедельно №6; 8—13			25 000 ЕД	В/в №5; 5, 7, 9, 11 и 14
Даунорубин	30 мг	В/в №3; 8, 11, 14				
Дексаметазон	6 мг	Внутрь ежедневно; 14—15				
Винкристин	1,5 мг	В/в №2; 14 и 15				
Цитарабин			75 мг	В/в 4 блока по 4 дня; 6—9		
Циклофосфамид			1000 мг	В/в №2; 6, 10	1000 мг	В/в №2; 5, 7
HDARA-C					2000 мг	В/в №4; 9
Консолидация II			Протокол М		Реиндукция I	
Меркаптопурин	50 мг	Внутрь ежедневно; 16—21	25 мг	Внутрь ежедневно; 12—19		
Метотрексат	30 мг	В/м еженедельно №6; 16—21	1000 мг	В/в в течение 36 ч №4; 13, 15, 17, 19		
L-аспарагиназа	10 000 ЕД	В/м еженедельно №6; 6—21			25 000 ЕД	В/в №1; 18
Даунорубин	30 мг	В/в №2; 16 и 19			36 мг	В/в №2; 17 и 18
Дексаметазон	6 мг	Внутрь ежедневно; 22—23			6 мг	Внутрь ежедневно; 17
Винкристин	1,5 мг	В/в №2; 22 и 23			1,5 мг	В/в №2; 17 и 18
Консолидация III			Протокол II		Реиндукция II и III (группа высокого риска)	
Меркаптопурин	50 мг	Внутрь ежедневно; 24—29				
Метотрексат	30 мг	В/м еженедельно №6; 24—29				
L-аспарагиназа	10 000 ЕД	В/м еженедельно; 24—29	10 000 ЕД	В/в №2; 23, 24	25 000 ЕД	В/в №2; 22 и 26
Доксорубин			30 мг	В/в еженедельно №4; 22—25	36 мг	В/в №4; 21 и 22, 25 и 26
Дексаметазон	6 мг	Внутрь ежедневно; 30—31	10 мг	Внутрь ежедневно; 22—24	6 мг	Внутрь ежедневно; 21 и 25
Винкристин	1,5 мг	В/в №2; 30—31	1,5 мг	В/в еженедельно №4; 22—25	1,5 мг	В/в №4; 21 и 22, 25 и 26
Цитарабин			75 мг	В/в 4 блока по 4 дня; 27—28		
Циклофосфамид			1000 мг	В/в №1; 27		
Тиогуанин			60 мг	Внутрь ежедневно; 27—28		

Примечание. Здесь и в табл. 3: в/в — внутривенно, в/м — внутримышечно.

Таблица 3. Поддерживающая терапия в зависимости от протокола

Препарат	ALL-MB-91		ALL-BFM-90m		РЕСО-92		доза/м ² , мг
	доза/м ² , мг	способ применения, нед	доза/м ² , мг	способ применения, нед	доза/м ² , мг	способ применения, нед	
Меркаптопурин	50	Внутрь ежедневно	50	Внутрь ежедневно	25	Внутрь ежедневно	25
Метотрексат	30	В/м еженедельно	20	Внутрь еженедельно	60	Внутрь еженедельно	60
Дексаметазон	6	Внутрь 14 дней каждые 6 нед					
Винкристин	1,5	В/в №2; каждые 6 нед					

не достигшие ремиссии на 36-й день терапии по программе ALL-MB-91 или на 33-й день — по программе ALL-BFM-90. В исследовании РЕСО-92 к категории non-responders относились пациенты, не достигшие ремиссии на 56-й день; больные, не достигшие ремиссии по окончании этапа индукции (28-й день), относились к late-responders. **Изолированный костномозговой рецидив** регистрировали в случае появления $\geq 20\%$ бластных клеток в костном мозге после достигнутой ранее ремиссии без признаков экстрамедуллярной лейкемической инфильтрации. При доказанной экстрамедуллярной лейкемической инфильтрации **комбинированный костномозговой рецидив** диагностировали при наличии $> 5\%$ лимфобластов в костном мозге. **Изолированный экстрамедуллярный рецидив** диагностировали при наличии клинических экстрамедуллярных проявлений лейкемии и отсутствии лейкемической инфильтрации ($< 5\%$ лимфобластов) в костном мозге. Рецидив ЦНС диагностировали при содержании ≥ 5 лейкоцитов в 1 мкл ликвора при наличии лимфобластов. Тестикулярный рецидив устанавливали клинически, однако в случае одностороннего поражения проводили биопсию контралатерального яичка. **Вторая опухоль** — развитие второго онкологического заболевания после окончания или на фоне ХТ по поводу ОЛЛ. Пациент считался **выбывшим из-под наблюдения** (lost-to-follow-up — LFU) при отсутствии информации о нем более года.

Статистический анализ. Результаты терапии ОЛЛ оценивали по числу пациентов, достигших пол-

ной ремиссии (ПР), количеству рецидивов, летальных исходов в ПР и числу детей, находящихся в полной продолжительной ремиссии (ППР), а также по кривым бессобытийной (БСВ) и общей (ОВ) выживаемости, построенным по методу Каплана — Майера. Сравнительный анализ кривых выживаемости проводили с использованием непараметрического Log-rank-критерия. При сравнении групп пациентов по категориальным признакам применяли критерии Фишера или χ^2 . Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Access, Paradox, GraphPad Prism 3.0, STATISTICA 6.0. Оценивали уровень достоверности p , различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Характеристика пациентов. Сравнительный анализ инициальных клинико-лабораторных характеристик больных в зависимости от полученной ими программы ХТ представлен в табл. 5. Не обнаружено достоверных различий между пациентами, получавшими программы ALL-BFM-90m, ALL-MB-91 и РЕСО-92, по возрасту, инициальному лейкоцитозу и поражению ЦНС. Однако в группе больных из Санкт-Петербурга, получавших терапию по программе РЕСО-92, достоверно чаще встречались Т-клеточные формы ОЛЛ и спленомегалия > 4 см от края реберной дуги (при инициальном пальпаторном исследовании селезенки). Фактически, если Т-ОЛЛ у больных, лечившихся в московских клиниках, наблюдался примерно в 13%

Таблица 4. Профилактика нейрорлейкемии в зависимости от протокола

Этап лечения	ALL-BFM-90m		ALL-MB-91		РЕСО-92	
	n	Режим введения	n	Режим введения	n	Режим введения
Индукция	2	В 1-й и 13-й дни, mtx i.th.	6	Еженедельно, trip. i.th.	1	В 1-й день предварительной фазы, mtx i.th.
Интенсивная фаза	8	1 раз в 2 нед, mtx i.th.	3	1 раз в 6 нед, trip. i.th.	9	1 раз в 2 нед, mtx i.th.
Поддерживающая терапия	0		4	1 раз в 6 нед, trip. i.th.	0	
Всего ...	10		13		10	
Профилактическое краниальное облучение						
	12 Гр (60)*		18 Гр (25)		18 Гр (40)	

* В скобках представлен процент больных.

случаев от общего числа пациентов, которым было проведено иммунофенотипирование (18 из 133 больных, получавших ALL-BFM-90, и 15 из 118 получавших ALL-MB-91), то у больных из Санкт-Петербурга Т-ОЛЛ был зарегистрирован в 23% всех случаев с известным иммунофенотипом (43 из 144 пациентов), что практически соответствует частоте встречаемости этой формы лейкемии во взрослой популяции. Кроме того, в группе пациентов из Санкт-Петербурга зарегистрировано достоверное и резкое преобладание мальчиков по сравнению с группой больных, лечившихся в Москве.

В связи с различиями в стратификации распределение пациентов на группы риска в разных протоколах оказалось неодинаковым. Так, если стандартная группа риска среди больных, получавших лечение по протоколу ALL-BFM-90, составила всего 30%, то среди пациентов протокола ALL-MB-91 она составляла 70%, а доля больных стандартного риска, получавших терапию по программе РЕСО-92 в Санкт-Петербурге, составила 58%.

Результаты лечения. В табл. 6 представлены результаты лечения всех больных в зависимости от

режима ХТ. При минимальном сроке наблюдения > 10 лет в ППР находятся 107 (71,8%) пациентов, получивших протокол ALL-BFM-90m, 94 (72,3%) — лечившихся по программе ALL-MB-91 и лишь 121 больной (56,5%, $p=0,004$) из тех, кто получил протокол РЕСО-92. БСВ оказалась для больных из Санкт-Петербурга, лечившихся по протоколу РЕСО-92, достоверно хуже, чем для пациентов, получавших протоколы ALL-BFM-90m ($p=0,0056$), ALL-MB-91 ($p=0,0239$), и составила 60 ± 3 , 74 ± 4 и $73\pm4\%$ соответственно (см. рисунок). При этом никаких различий по БСВ между режимами ХТ ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 не обнаружено.

Детальный анализ событий, случившихся с больными в зависимости от проведенной им программы ХТ, который представлен в табл. 6, показывает, что основной причиной получения худших результатов лечения по протоколу РЕСО-92 является значительно большее число рецидивов. Так, рецидивы были зарегистрированы лишь у 17—18% пациентов, лечившихся по протоколам ALL-MB-91 и ALL-BFM-90, но практически у 32% больных, получавших протокол РЕСО-92. При этом различий летальности

Таблица 5. Инициальные характеристики пациентов и исходы терапии

Показатель	Число больных			Р _{Фитнер}	БСВ, %			P _{Log-rank}
	BFM-90m	MB-91	РЕСО		BFM-90m	MB-91	РЕСО	
Всего...	149	130	214	—	0,74±0,04	0,73±0,04	0,60±0,03	0,0056 _{BFM—PECO} 0,0239 _{MB—PECO}
Группа риска:								
низкий	44	100	125	—	0,86±0,05	0,73±0,04	0,68±0,04	—
средний	91	—	—	—	0,76±0,05	—	—	—
высокий	14	30	89	—	0,29±0,12	0,73±0,08	0,49±0,05	—
Пол:								
мальчики	76	64	141	0,0048 _{BFM—PECO}	0,70±0,05	0,70±0,06	0,56±0,04	0,0674 _{MB—PECO} 0,0675 _{BFM—PECO}
девочки	73	66	73	0,0031 _{MB—PECO}	0,79±0,05	0,76±0,05	0,68±0,05	N.S.
Возраст, годы:								
< 1	2	—	2	N.S.	—	—	—	—
≥ 1 и < 10	117	102	167	N.S.	0,75±0,04	0,76±0,04	0,62±0,04	0,030 _{BFM—PECO} 0,020 _{MB—PECO}
≥ 10	30	28	45	N.S.	0,70±0,08	0,61±0,09	0,52±0,08	N.S.
Инициальный лейкоцитоз, тыс./мкл:								
< 10	80	65	116	N.S.	0,84±0,04	0,72±0,06	0,70±0,04	0,09 _{BFM—MB} 0,027 _{BFM—PECO}
≥ 10 и < 50	44	44	58	N.S.	0,72±0,07	0,75±0,07	0,60±0,06	N.S.
≥ 50 и < 100	8	9	19	N.S.	0,63±0,17	0,67±0,16	0,47±0,11	N.S.
≥ 100	17	12	21	N.S.	0,41±0,12	0,75±0,13	0,15±0,08	0,079 _{BFM—PECO} 0,003 _{MB—PECO}
Поражение ЦНС:								
нет	136	120	208	N.S.	0,74±0,04	0,72±0,04	0,60±0,03	0,012 _{BFM—PECO} 0,044 _{MB—PECO}
есть	10	10	6	N.S.	0,70±0,14	0,80±0,13	0,50±0,20	N.S.
Иммунофенотип:								
не-Т-клеточный ОЛЛ	115	103	144	0,043 _{BFM—PECO}	0,76±0,04	0,72±0,04	0,64±0,04	0,034 _{BFM—PECO}
Т-клеточный ОЛЛ	18	15	43	0,035 _{MB—PECO}	0,61±0,11	0,67±0,12	0,47±0,08	N.S.
Размер селезенки, см								
< 4	95	93	129	0,037 _{MB—PECO}	0,78±0,04	0,75±0,05	0,66±0,04	0,078 _{BFM—PECO}
≥ 4	54	37	85		0,69±0,06	0,67±0,08	0,51±0,06	0,038 _{BFM—PECO}

Примечание. Здесь и далее N.S. — незначимо.

в индукции и в ремиссии между тремя режимами химиотерапии ОЛЛ у детей не зафиксировано. Уровень летальности в индукции оказался практически одинаковым и составил для «ALL-BFM-90», «ALL-MB-91» и «РЕСО-92» 2,7, 3,1 и 3,3% пациентов соответственно. Летальность в ремиссии также достоверно не различалась: для больных, лечившихся по протоколу ALL-BFM-90m, — 3,6%; для пациентов, получавших программу ALL-MB-91, — 1,5%; для больных, пролеченных по протоколу РЕСО-92, — 4,2% (см. табл. 6).

Анализ структуры рецидивов в зависимости от их локализации и времени возникновения, представленный в табл. 6 и 7, продемонстрировал, что в группе больных, лечившихся по протоколу РЕСО-92, оказалось значительно больше изолированных костномозговых рецидивов (19,2% против 13,4% по протоколу ALL-BFM-90m и 9,2% — по протоколу ALL-MB-91, $p=0,014$) и, что явилось неожиданностью для нас, достоверно выше было суммарное число изолированных и комбинированных тестикулярных рецидивов, чем таковое по протоколам ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 (6,5% по протоколу РЕСО-92 против 1,3% — по протоколу ALL-BFM-90m, $p=0,0186$ и 1,5% Р по протоколу ALL-MB-91, $p=0,0353$). Несмотря на то, что достоверных различий при анализе структуры рецидивов в зависимости от времени их возникновения обнаружено не было (см. табл. 7), обращает на себя внимание существенно большая доля ранних рецидивов на протоколе РЕСО-92, чем таковая у больных, получивших программы ALL-BFM-90m и ALL-MB-91.

В табл. 5 представлены также показатели БСВ в зависимости от различных факторов риска, одинаково определенных для 3 различных режимов ХТ. Видно, что при анализе практически всех показателей БСВ различных подгрупп пациентов по протоколу РЕСО-92 оказалась хуже, чем таковая по протоколам ALL-BFM-90m и ALL-MB-91. При этом достоверные и наиболее резкие различия в отношении БСВ между протоколом РЕСО-92 и программами ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 получены в подгруппах мальчиков, среди больных в возрастной группе от 1 года до 10 лет, с инициальным лейкоцитозом $> 100\ 000/\text{мм}^3$, у пациентов с не-Т-клеточным фенотипом и с увеличением размера селезенки > 4 см.

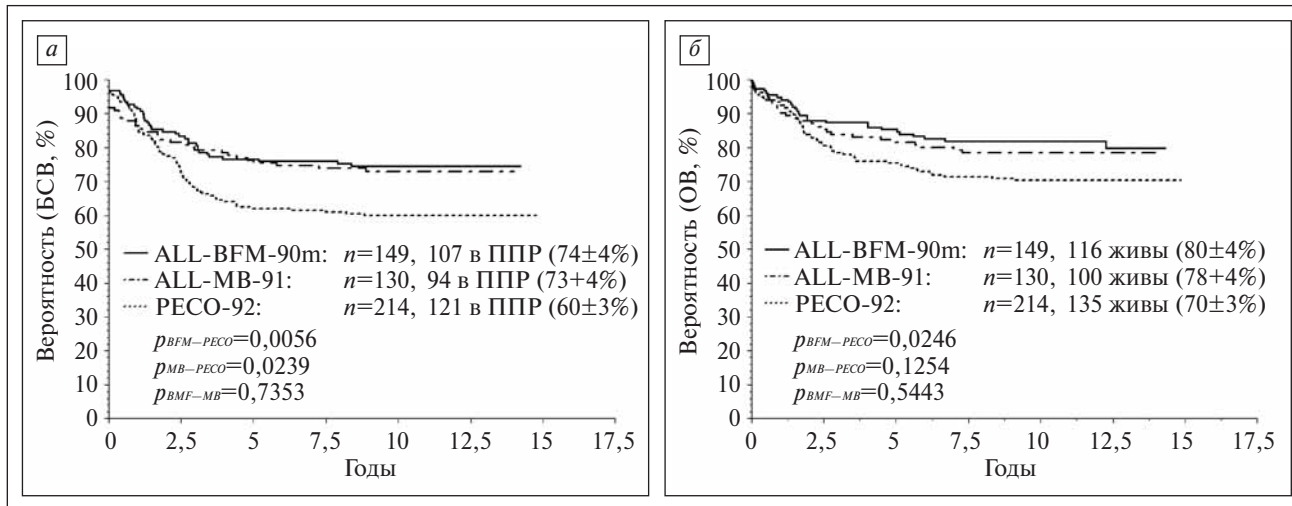
Заключение

Основной целью данного исследования было выяснение вопроса об оптимальной стратегии проведения ХТ ОЛЛ у детей в России. Для этого были проанализированы результаты лечения по 3 различным режимам ХТ: ALL-BFM-90m, ALL-MB-91 и РЕСО-92. Анализ показал, что если между протоколами ALL-BFM-90m и ALL-MB-91 никаких различий в результатах лечения ОЛЛ у детей обнаружено не было, то результаты лечения на протоколе РЕСО-92 оказались значительно хуже. Основной причиной ухудшения результатов лечения больных ОЛЛ по данному протоколу стало большее число рецидивов.

Следует отметить, что данное исследование с самого начала имело ограничения, которые необходимо принимать во внимание при анализе ре-

Таблица 6. Результаты лечения пациентов на разных протоколах

Показатель	BFM-90		MB-91		РЕСО-92		P
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Всего пациентов ...	149	100	130	100	214	100	
Смерть в индукции	4	2,7	4	3,1	7	3,3	N.S.
Non-responders	1	0,7	7	5,4	0	0	0,027 _{BFM-MB} 0,001 _{РЕСО-MB}
ПР	144	96,6	119	91,5	207	96,7	0,076 _{BFM-MB} 0,046 _{РЕСО-MB}
Смерть в ремиссии	5	3,6	2	1,5	9	4,2	N.S.
Рецидив: всего	27	18,1	22	16,9	68	31,8	0,004 _{BFM-РЕСО} 0,002 _{MB-РЕСО}
костный мозг	20	13,4	12	9,2	41	19,2	0,014 _{MB-РЕСО}
ЦНС	1	0,7	5	3,8	6	2,8	N.S.
яички	0	0	0	0	4	1,9	N.S.
другие	0	0	1	0,8	2	0,9	N.S.
костный мозг и ЦНС	3	2,0	2	1,5	2	0,9	N.S.
костный мозг и яички	2	1,3	2	1,5	10	4,7	N.S.
костный мозг и др.	1	0,7	0	0	1	0,5	N.S.
Вторичная опухоль	1	0,7	0	0	0	0	N.S.
Lost-to-follow up	4	2,7	1	0,8	9	4,2	N.S.
ППР	107	71,8	94	72,3	121	56,5	0,004 _{BFM-РЕСО} 0,004 _{MB-РЕСО}



Выживаемость больных в зависимости от протокола: а — БСВ; б — ОВ

зультатов. Это исследование не является ни мультицентровым, ни рандомизированным и ретроспективным. Поэтому для максимально корректного сравнения групп больных нами были жестко ограничены временные рамки анализа предполагались одинаковые условия для проведения протоколов и одинаковые стандарты сопроводительной терапии, существовавшие в то время. Тем не менее выявлены существенные различия в структуре подгрупп между пациентами из Москвы и Санкт-Петербурга. Однако эти различия, а именно: значительное преобладание мальчиков, возможно, связанное с этим увеличение доли Т-клеточных форм и значительное число больных с большой селезенкой в группе из Санкт-Петербурга — лишь отчасти объясняют более низкий уровень выживаемости по протоколу PECO-92, так как в целом более низкие показатели выживаемости у больных, получавших терапию по протоколу PECO-92, были зарегистрированы и в подгруппах, определяемых другими факторами риска, различий по которым между пациентами, лечившимися в Москве и Санкт-Петербурге, не зафиксировано. Также следует отметить, что описанные выше различия отличают группу пациентов из Санкт-Петербурга не только от московских больных, но и вообще от «стандартного» соотношения различных клинических признаков, дав-

но описанного для детей с ОЛЛ в мировой литературе. Является ли этот эффект случайным или отличительным признаком популяции больных ОЛЛ в Санкт-Петербургском регионе, покажет дальнейшее наблюдение.

Несмотря на все ограничения данного анализа, уже сейчас можно сделать некоторые предположения по поводу недостаточно хороших результатов лечения ОЛЛ у детей по протоколу PECO-92 в Ленинградском регионе. При этом мы исходим из того, что никаких различий в стандартах сопроводительной терапии между клиниками не существовало. Об этом, в частности, свидетельствует абсолютно одинаковый уровень индукционной летальности на всех 3 режимах ХТ.

Мы предполагаем следующее:

— значительно большая частота развития именно ранних рецидивов, а также более низкие результаты у мальчиков свидетельствует о возможных «пробелах» в постиндукционной терапии протокола PECO-92. В частности, речь идет о так называемых прерывистых курсах повышенных доз 6-меркаптопурина в рамках консолидации и длительных паузах между введениями пусть и больших доз *E. coli*-аспарагиназы в периоде консолидации;

— увеличение числа рецидивов за счет изолированных костномозговых и тестикулярных связа-

но с недостаточной эффективностью системной ХТ в интенсивной или консолидирующей фазе лечения. Так, применение высоких доз цитарабина, циклофосфана, вепезида не является методом выбора или достаточно эффективным, по крайней мере, для лечения не-Т-клеточных вариантов ОЛЛ, но в то же время достаточно токсично и может приводить к дополнительным перерывам в терапии;

Таблица 7. Структура рецидивов по времени возникновения в зависимости от протокола

Рецидив	Программа			p_{Fisher}
	BFM-90	MB-91	PECO	
Всего...	27	22	68	—
Очень ранний	10 (37)	7 (31,8)	21 (30,9)	Нет данных
Ранний	5 (18,5)	4 (18,2)	21 (30,9)	Нет данных
Поздний	12 (44,5)	11 (50)	26 (38,2)	Нет данных

Примечание. Представлено число рецидивов (в скобках — процент).

— дополнительное негативное воздействие показало недостаточность интратекальной терапии в группе низкого риска на этапе поддерживающего лечения.

Для подтверждения или опровержения этих гипотез необходимо проведение дальнейшего анализа результатов лечения, в частности по протоколам ALL-MB-2002 и Peterburg-COALL.

Л и т е р а т у р а

1. Алексеев Н.А., Воронцов И.М. Лейкозы у детей. Л.: Медицина, 1988.
2. Riehm H., Gadner H., Henze G. et al. Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies. *Hematol Blood Transfus* 1990;33:439—50.
3. Janka-Schaub G.E., Winkler K., Gobel U. et al. Rapidly rotating combination chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: preliminary results of a randomized comparison with conventional treatment. *Leukemia* 1988;2:73—8.
4. Schrappe M., Reiter A., Zimmermann M. et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia* 2000;14:2205—22.
5. Harms D.O., Janka-Schaub G.E. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 2000;14(12):2234—9.
6. Rivera G., Raimondi S., Hancock M. et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet* 1991;337(8733):61—6.
7. Tubergen D.G., Gilchrist G.S., O'Brien R.T. et al. Improved outcome with delayed intensification in children with acute lymphoblastic leukemia and intermediate presenting features: a Children's Cancer Group phase III trial. *J Clin Oncol* 1993;11:527.
8. Neglia J.P., Meadows A.T., Robinson L.L. et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;325:1330—6.
9. Meadows A.T., Baum E., Fossati-Bellani F. et al. Second malignant neoplasms in children: an update from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol* 1985;3:532—8.
10. Walter A.W., Hancock M.L., Pui C.-H. et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St. Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 1998;16:3761—7.
11. Pui C.-H., Ribeiro R.C., Hancock M.L. et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991;325:1682—7.
12. Kreissman S.G., Gelber R.D., Cohen H.J. et al. Incidence of secondary acute myelogenous leukemia after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1992;70:2208—13.
13. Pui C.-H., Relling M.V., Rivera G.K. et al. Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia: a study of 35 cases. *Leukemia* 1995;9:1990—6.
14. Карачунский А.И., Штакельберг А., Мякова Н.В. и др. Сравнение протоколов ОЛЛ-БФМ-90М и ALL-MB-91 для лечения острого лимфобластного лейкоза у детей (предварительные результаты). *Педиатрия* 1995;(2):10—6.
15. Janka-Schaub G.E., Stuhrl H., Kortum B.U., Winkler K. Initial response to therapy as an important prognostic factor in acute lymphoblastic leukaemia in childhood COALL Study Group. *Klin Padiatr* 1991;203(4):231—5.
16. Eckhof-Donovan S., Schwaborn D., Korholz D. et al. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with the COALL-protocol. *Klin Padiatr* 1994;206(4):327—30.
17. Jurgens H., Janka-Schaub G., Ibrahim M. et al. Prognostic significance of exposure to intermediate-dose methotrexate in children with standard risk ALL: The COALL 82/85 Experience. *Haematol Blood Transfus* 1992;34:338—42.
18. Gobrecht O., Gobel U., Graubner U. et al. Effect of dose intensity and therapy-included leukocytopenia in childhood. Results in 213 patients of the COALL-85 study. *Klin Padiatr* 1992;204(4):230—5.
19. Janka-Schaub G., Harms D., Goebel U. et al. for the Coall Study Group. Randomized comparison of rational chemotherapy in high-risk acute lymphoblastic leukaemia of childhood — follow up after 9 years. *Eur J Pediatr* 1996;155:640—8.
20. Janka G., Harms D., Escherich G. et al. Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance therapy of childhood ALL. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:217.
21. Harms D., Schwaborn D., Winkler K. et al. Daunorubicin-induced cell kill in 1-hour vs. 24-hour infusions: randomized comparison in newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1994;23:197.
22. Ritter J., Creutzig V., Reiter A. et al. Childhood leukemia: Cooperative Berlin—Frankfurt—Munster trials in the Federal Republic of Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:100.
23. Карачунский А.И., Штакельберг А., Мякова Н.В. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: 6-летние результаты нерандомизированного моноцентрового исследования с минимальным сроком наблюдения 2 года. *Гематол трансфузиол* 1997;(5):14—8.
24. Мякова Н.В., Карачунский А.И., Штакельберг А. и др. Сравнительный анализ токсичности полихимиотерапии острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколам ALL-BFM-90m и ALL-MB-91. *Педиатрия* 1997;(4):29—33.
25. Von Stackelberg A., Karachunsky A., Miakova N. et al. Toxicity, supportive care and costs of two chemotherapy protocols for treatment of childhood ALL in Russia: BFM-90m and MB-91. *Eur J Cancer* 1999;35:1349—55.
26. Карачунский А.И. Стратегия терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Автореф. докт. ... мед. наук. М., 1999.
27. Bleyer W.A. Biology and pathogenesis of CNS leukemia. *Am J Pediatr Hem Oncol* 1989;11(1):57—63.
28. Henze G., Langermann H.-J., Braemswig J. et al. Ergebnisse der Studie BFM 76/79 zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen. *Klin Pädiatrie* 1981;193:145—54.
29. Reiter A., Schrappe M., Ludwig W. et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994;84:3122—33.
30. Veerman A.J.P., Hahlen K., Kamps W.A. et al. Dutch Childhood Leukemia Study Group: Early results of study ALL VI (1984—1988). *Haematol Blood Transfus* 1990;33:473—7.
31. Veerman A.J.P., Hahlen K., Kamps W.A. et al. High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of protocol ALL-VI from the Dutch Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 1996;14:911—8.
32. Clavell L.A., Gelber R.D., Cohen H.J. et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1986;315:657—63.
33. Barr R.D., DeVéber L.L., Pai K.M. et al. Management of children with acute lymphoblastic leukemia by the Dana-Farber Cancer Institute Protocols. *Am J Pediatr Hem Oncol* 1992;14:136—9.
34. Schorin M.A., Blattner S., Gelber R. et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of Dana-Farber Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. *J Clin Oncol* 1994;12:740—7.
35. Карачунский А.И., Мякова Н.В., Тимаков А.М. и др. Результаты мультицентрового исследования лечения острого лимфобластного лейкоза у детей — ALL-MB-91/ALL-BFM-90m: анализ эффективности и токсичности. *Тер арх* 2007;79(7):19—26.

СЕЛЕКТИВНАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

В.В. Дмитриев, И.А. Дунаев

ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Контакты: Дмитриев Вячеслав Васильевич dmitrievhaematol@mail.ru

Концентрат факторов неактивированного протромбинового комплекса, содержащий факторы II, X и IX, из-за отсутствия в составе препарата фактора VII позволяет остановить или предотвратить кровотечение только в половине случаев. При снижении активности факторов протромбинового комплекса до 40% и менее за счет преимущественного дефицита фактора VII препаратом выбора следует признать лекарственное средство, в состав которого кроме факторов II, X, IX и VII входят протеины C и S, что потенциально предотвращает развитие тромботических осложнений. Диффузное кровотечение со всей раневой поверхности во время хирургического вмешательства или вероятность мгновенного развития фатального легочного кровотечения, в том числе и у больных с тромбоцитопенией, определяют показания для применения препарата, содержащего рекомбинантный активированный фактор rVIIa.

Ключевые слова: гемобластозы, новообразования, дети, свертывание крови, кровотечение

SELECTIVE CORRECTION OF HAEMOSTATIC DEFECTS IN CHILDREN WITH ACUTE LEUKEMIA AND MALIGNANT NEOPLASMS

V.V. Dmitriev, I.A. Dunaev

Republic Centre for Paediatric Oncology and Haematology, Minsk, Belarus

Treatment of children with acute leukemia or other malignant neoplasm can be complicated with bleeding, caused by decreased vitamin K-dependent coagulations factors. Administration of prothrombin complex concentrate seems more convenient than transfusion of fresh frozen plasma with regard to volume overload and speed of administration. Recombinant rVIIa has been successfully used in patients with uncontrolled bleeding during surgery, including patients with thrombocytopenia.

Key words: childhood acute leukemia, malignant neoplasm, haemostatic defects, bleeding, treatment

Массивное кровотечение представляет реальную угрозу для жизни больного. Развитие геморрагических осложнений обусловлено нарушением синтеза коагуляционных факторов [1, 2]. Серьезное влияние на синтез факторов свертывания оказывают злокачественные новообразования и заболевания системы крови, а также специфическая химиотерапия (ХТ) [3]. Изменения гемостаза, формирующиеся в процессе лечения пациентов, в ряде случаев вызваны комбинированным дефектом плазменного звена, вследствие выраженного нарушения синтеза и потребления факторов (II, VII, IX, X) свертывания, на фоне тромбоцитопении [4–6]. С учетом ведущего механизма приобретенных нарушений плазменного звена системы свертывания крови и влияния на систему свертывания лекарственных средств оправдано селективное применение препаратов, содержащих концентрат факторов протромбинового комплекса — ФПК (II, VII, X) [7, 8].

Цель исследования — обоснование выбора гемостатических препаратов на основе концентрата ФПК для предупреждения или остановки кровоте-

чения, возникшего на различных этапах программного лечения детей с солидными опухолями и лейкозами.

Материалы и методы

Обследованы 72 ребенка в возрасте от 4 до 17 (медиана — 14) лет, находившихся на лечении в ГУ РНПЦДОГ в период с 2000 по 2008 г., у которых на день включения в исследование было зарегистрировано кровотечение с объемом кровопотери от 5 до 10 мл/кг массы тела в течение суток ($n=57$) или требовалась коррекция показателей, отражающих функциональное состояние системы свертывания крови, в связи с предстоящей операцией ($n=15$). Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) диагностирован у 23 детей: тип L1 — у 11, тип L2 — у 12. Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) зафиксирован у 15 больных: тип M2 — у 5, M4 — у 5, M5 — у 4 и M7 — у 1. Миелодиспластический синдром имел место в 2 случаях, лимогранулематоз — также в 2. Злокачественные новообразования выявлены у 30 пациентов: медуллобластома — у 5, неходжкинская лимфома — у 9, нейробластома — у 3, злокачественная опухоль яичников — у 3, гепатобласто-

ма — у 5, рабдомиосаркома — у 3, краниофарингиома — у 2. На этапе проведения индукционной ХТ в исследование включены 26 больных, в период разгара основного заболевания — 17, на этапе осуществления ХТ по поводу рецидива основного заболевания — 16 пациентов, после трансплантации костного мозга — 10, аутологичной трансплантации периферических стволовых клеток — 13. Показания для введения гемостатических препаратов были следующими: профилактика кровотечения перед плановой операцией ($n=15$), остановка кровотечения во время операции или в первые 12 ч после вмешательства ($n=8$), остановка кровотечения на протоколе ХТ ($n=49$). Желудочно-кишечное кровотечение было у 40 детей, легочное — у 8, обширное кровоизлияние в вещество головного мозга с распространением крови в боковые желудочки — у 1, кровотечение возникло во время операции — у 7, гемоторакс после плевральной пункции — у 1 пациента. Удалось избежать развития кровотечения после адекватной коррекции свертывания крови у 15 детей. Из 57 больных с клинической картиной системного воспалительного ответа подтвержденный положительными результатами бактериологического исследования крови бактериальный сепсис имел место у 22 пациентов, бактериально-кандидозный сепсис — у 26.

Изучено влияние на показатели свертывания крови следующих препаратов: Уман Комплекс Д.И. («Kedrion», Италия) — у 21 пациента 1-й группы, Октаплекс («Octapharma», Австрия) — у 10 больных 2-й группы, Фейба Тим 4 Иммуно («Baxter», Австрия) — у 14 пациентов 3-й группы, и рекомбинантного активированного фактора VII (rVIIa, НовоСэвен; «Novo Nordisc», Дания) — у 15 больных 4-й группы.

Дополнительно у 12 пациентов (5-я группа) оценено состояние свертывания крови до и после инфузии однокрупной донорской криоплазмы в объеме 10 мл/кг массы тела в течение 1 ч. Коагуляционный статус оценивали перед введением лекарственного средства и через 15 мин после завершения инфузии, выполнявшейся в соответствии с инструкцией к каждому конкретному препарату.

Оценка функционального состояния системы свертывания крови включала: регистрацию структурных и хронометрических показателей автоматическими коагулометрами ACL-200 и ACL-9000 («Instrumentation Laboratory», США) с использованием диагностических наборов той же фирмы; определение содержания в плазме крови фибриногена, коагулируемого тромбином, методом Клауса; определение D-димеров по тесту агглютинации с латексом (J. Soria и соавт., 1983) набором D-Dimer kit («Instrumentation Laboratory», США). Одностадийным клоттинговым методом у всех пациентов регистрировали активность факторов VIII и IX, а также ФПК II, V, VII и X с применением соответ-

ствующих диагностических наборов той же фирмы. Качественную реакцию на присутствие растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ) выполняли методом агглютинации лиофилизированных донорских эритроцитов с использованием набора F.M. Test («Diagnostica Stago», Франция). Количественное определение ранних продуктов деградации фибриногена и фибрина (ПДФ) в плазме крови по тесту агглютинации частиц латекса с фиксированными на частицах антителами к ПДФ осуществляли с помощью набора PDF/PLASMA («Diagnostica Stago», Франция). Для коагуляционных показателей в качестве контроля использовали нормальную контрольную плазму, входящую в состав диагностических наборов фирмы «Instrumentation Laboratory» (США). Представление результатов хронометрических тестов в виде относительной величины (R), равной отношению исследуемого хронометрического показателя к величине соответствующего показателя контрольной плазмы, позволило сравнить результаты (независимо от времени проведения исследования) активности используемых реагентов без применения в качестве контроля показателей гемостаза здоровых детей аналогичного возраста. За величину показателей гемостаза, отражающих возрастную норму, были приняты результаты наблюдений, представленные в публикации M. Andrew и соавт. [9].

Статистический анализ данных выполнен при помощи компьютерного пакета программ Statistica (версия 6.0). Количественные показатели описательной статистики представлены как медиана, 25-й и 75-й процентиля. Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по критерию Манна — Уитни (U), а для попарно связанных — вариант по парному критерию Вилкоксона (T). Значимыми признаны различия для $p<0,05$.

Результаты

Снижение активности ФПК и тромбоцитопения определили ведущий механизм нарушений свертывания крови у больных 1-й группы перед введением препарата Уман Комплекс Д.И. В целом по группе низкая суммарная активность ФПК — 45% (32—57%) была обусловлена снижением активности факторов II до 51,5% (23—70%), X — до 46% (26—71%) и VII — до 37% (21—55%). Болюсное введение концентрата факторов II, X и IX в количестве 30 (20—40) МЕ/кг массы тела 11 больным первой группы не отразилось на суммарной активности ФПК (табл. 1). Отсутствие значимого прироста суммарной активности ФПК было обусловлено сохраняющимся дефицитом фактора VII, о чем свидетельствовал сниженный до 30% (16—40%) уровень фактора VII после введения препарата. Введение препарата Уман Комплекс Д.И. способствовало частичному восстановлению коагуляционного потенциала у 10 детей 1-й группы, у которых меди-

Таблица 1. Сравнительная оценка эффективности применения препаратов Уман Комплекс Д.И. и Октаплекс, медиана (25-й и 75-й перцентили)

Показатель	Препарат					
	Уман Комплекс Д.И. (II, X, IX) n=11			Октаплекс (II, VII, X, IX, Pr C, PrS), n=10		
	до введения	после введения	до введения	после введения	до введения	после введения
Доза, МЕ/кг / мкг/кг	—	30 (20—40)	—	25 (22,5—44,5)	—	23 (22—26)
R АПТВ, ЕД	1,17 (0,08—1,31)	1,19 (1,08—1,4)	1,29 (1,06—1,47)	1,13 (1,08—1,2)**	1,36 (0,95—1,46)	1,27 (1,2—1,77)
МНО	1,8 (1,56—2,6)	1,67 (1,54—2,22)	2,1 (1,8—2,5)	1,56 (1,37—1,81)*	2,3 (1,49—4,5)	1,6 (1,48—1,9)*
Активность ФПК, %	49 (29—57)	48,5 (36,4—58,0)	37,5 (28,5—45)	55 (43—63)*	41 (19—61)	68 (56—71)*
Прирост активности, %	—	2 (1—5)	—	19 (10—30)	—	23 (20—31)
Протеин, %						
С	74 (56—85)	68 (55—83)	58 (40—70)	61 (48—72)	74 (58—89)	95 (72—112)**
S	86 (66,5—126)	103,5 (85,5—34)	65 (55—75)	81 (61—92)	67 (39—99)	115 (103—120)**
РФМК, n (абс.):						
положительная	0	0	0	0	0	0
отрицательная	11	11	12	12	9	9
Фактор, %						
II	56 (21—71)	92 (67—110)*	47,5 (40—59)	77,5 (66—99)*	60 (40—85)	90 (71—124)*
V	68 (36—92)	69 (42—111)	77,5 (56—97,5)	84 (67—92)	68 (58—92)	74 (51—89)
VII	41 (19—52)	30 (16—40)**	46,5 (32,5—59)	49 (30—58)	35 (17—62)	64 (53—85)*
X	58 (13—74)	94 (75—104)*	41 (30,5—54)	81 (66,5—92)*	67 (52—83)	109 (78—132)*
IX	88 (46—114)	110 (75—120)*	70 (48,5—102)	111 (80—133)*	64 (16—64)	72 (33—103)

Примечание. Здесь и в табл. 2: АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; МНО — международное нормализованное отношение. * $p<0,01$; ** $p<0,05$ — достоверность различия по сравнению с исходным значением соответствующего показателя для парного критерия Вилкоксона (T).

ана исходного уровня активности фактора VII превышала 45%. На фоне достоверного повышения ($p=0,008$) активности ФПК до 55% (43—63%) кровотечение было предупреждено или остановлено у всех пациентов данной подгруппы.

После введения препарата Октаплекс в дозе 23 (22—26) МЕ/кг зарегистрировано сокращение МНО до 1,6 (1,48—1,9) и повышение ($p=0,004$) активности ФПК до 68% (56—71) соответственно. Прирост активности ФПК составил 23% (20—31). Ограничивал повышение активности ФПК прирост ($p=0,007$) уровня фактора VII до 64% (53—85). Зарегистрировано повышение активности протеина С до 95% (72—112) — $p=0,012$ по сравнению с исходной величиной — и S — до 115% (103—120) — $p=0,0117$ по сравнению с исходной величиной, что приближалось к значениям возрастной нормы здоровых детей. После введения препарата кровотечение прекратилось у 7 больных, инвазивные процедуры (катетеризация центральной вены и дренирование плевральной полости) выполнены без осложнений 3 пациентам.

После болюсного введения 25 (22—30) МЕ/кг препарата Фейба Тим 4 Иммуно у 12 из 14 больных зарегистрировано повышение активности ФПК до 67% (53—77) по сравнению с исходным уровнем 44% (36—56), что отражено в табл. 2. Суммарный прирост активности ФПК составил 15% (10—23). Достижение коагулологического эффекта у 12 из 14 детей в группе позволило выполнить хирургиче-

ское вмешательство ($n=3$) или остановить кровотечение, возникшее на этапе проведения ХТ ($n=9$). Не отмечено эффекта после введения концентрата ФПК у 2 детей в связи с выраженным снижением исходной активности фактора V до 10—15% по сравнению с возрастной нормой [9]. Анализ изменений суммарной активности ФПК в динамике заболевания позволил говорить о приобретенном снижении активности фактора V. Дефицит фактора V вынужденно восполняли криоплазмой до 10 мл/кг в течение 1—2 ч, так как других альтернативных вариантов не существует. После восполнения дефицита фактора V повторное введение препарата Фейба Тим 4 Иммуно этим больным позволило достигнуть восстановления активности ФПК и остановки кровотечения.

После введения препарата НовоСэвен в количестве 50 (25—75) мкг/кг массы тела у всех больных отмечено повышение активности фактора VII до 245% (170—257).

Через 15 мин после введения препарата рекомбинантного активированного фактора VII зарегистрировано снижение протеинов С до 74% (27—80) по сравнению с исходным значением 96% (61—102, $p=0,046$) и S до 46% (40—75) по сравнению с исходным значением 87,5% (70—112, $p=0,048$). При повторном исследовании гемостаза, выполненном через 1 ч после завершения инфузии, у 8 пациентов выявлено восстановление уровня протеинов С и S до исходного значения у всех этих

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности применения препаратов Фейба Тим 4 Иммуно, НовоСэвен и криоплазмы, медиана (25-й и 75-й перцентили)

Показатель	Фейба Тим 4 Иммуно (II, VIIa, X, IX), n=14		Препарат Новосэвен (rVIIa), n=15		Криоплазма, n=12	
	до введения	после введения	до введения	после введения	до введения	после введения
Доза, МЕ/кг/мкг/кг, мл/кг/ч	—	25 (22—30)	—	50 (25—75)	—	10 (9—11)
R АПТВ, ЕД	1,25 (1,06—1,71)	1,08 (0,95—1,15)*	1,24 (1,12—1,4)	1,1 (1—1,2)	1,14 (0,98—1,38)	1,07 (0,88—1,38)
МНО	1,95 (1,81—2,2)	1,34 (1,24—1,7)*	1,5 (1,4—1,9)	1,02 (0,97—1,15)*	1,91 (1,63—2,25)	1,85 (1,22—2)
Активность ФПК, %	44 (36—56)	67 (53—77)*	56 (43—62)	98 (82—105)*	47,3 (40,9—53,5)	53,4 (45,8—68)**
Прирост активности, %	—	15 (10—23)	—	40 (24—56)	—	5,5 (3—11)
Протеин, %						
С	63 (45—91)	52 (39—78)	96 (61—102)	74 (27—80)**	—	—
S	77 (59—110)	59 (38—82)	87,5 (70—112)	46 (40—75)**	—	—
РФМК, n (абс.)						
положительная	3	3	2	1	0	0
отрицательная	11	11	13	14	12	12
Фактор, %						
II	52 (37—72)	98 (68—116)*	71,5 (61—97)	100 (76—115)*	71,5 (41—77)	81,5 (70—86)**
V	73 (40—79)***	71 (56—113)***	80 (60—109)	87,5 (63—102)	95 (81—98)	106 (92—110)
VII	33 (29—55)	70 (45—98)**	60 (35—78)	245 (170—257)*	37,5 (14—42)	45 (39—48)**
X	67 (37—87)	100 (82—119)*	81 (69—96)	110 (97—125)*	43,5 (41—53)	62 (52—80)**
IX	46 (35—83)	96 (95—165)*	86 (69—113)	102 (86—114)	77 (60,5—102)	88 (68,5—127)**

***n=12.

детей. В целом, после введения препарата гемостатический эффект был зарегистрирован у всех пациентов. Клиническая эффективность препарата была наиболее выраженной у 4 больных с легочным кровотечением и у 2 — в процессе остановки интраоперационного кровотечения.

Введение болусом криоплазмы в объеме до 10 мл/кг/ч больным с кровотечением сопровождалось умеренным ростом активности ФПК на 5,5% (3—11% у всех пациентов по сравнению с исходным значением. Судить о клиническом гемостатическом эффекте трансфузии донорской криоплазмы трудно, так как объем кровопотери в ближайшие 2—3 ч после трансфузии у большинства пациентов данной группы существенно не изменился.

Снижение активности ФПК, обусловленное спадом активности факторов II, X и IX без выраженного дефицита фактора VII, определило показания для использования препарата Уман Комплекс Д.И. — концентрата ФПК, содержащего факторы II, X и IX.

При уменьшении активности ФПК до 40% и менее, с преимущественным дефицитом фактора VII, целесообразно применение концентрата ФПК, содержащего факторы II, X, IX и VII. Приоритет при выборе препарата принадлежит лекарственной форме, не вызывающей снижения уровня естественных антикоагулянтов, таких как протеины С и S. Данное обстоятельство определяет показания для возможного использования в качестве препара-

та выбора лекарственного средства Октаплекс, созданного на основе неактивированных факторов II, VII, X, IX, протеинов С и S с целью остановки кровотечения, в том числе и у больных в гипокоагуляционной стадии диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

Введение концентрата ФПК, включающего факторы II, X, IX и активированный фактор VIIa, сопровождается относительным снижением активности протеина S на фоне чрезмерного роста активности фактора VIII. Подобная реакция системы гемостаза больных лейкозом или злокачественным новообразованием на введение препарата Фейба Тим 4 Иммуно может привести к развитию тромбоза. По этой причине нецелесообразным является расширение показаний для применения данного препарата с целью остановки кровотечения, осложнившего лечение онкологических или гематологических больных, в том числе и пациентов с лабораторными признаками диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

Диффузное кровотечение со всей раневой поверхности, возникшее во время хирургического вмешательства, или вероятность мгновенного развития фатального легочного кровотечения, в том числе и у больных с тромбоцитопенией, определили показания для применения препарата НовоСэвен. Использование препарата, содержащего рекомбинантный активированный фактор VII, способствовало качественным изменениям активно-

сти ФПК, что сопровождалось выраженным клинически локальным гемостатическим эффектом.

При трансфузии донорской криоплазмы до 10 мл/кг/ч больным с кровотечением наблюдался прирост активности ФПК в среднем на 5–7%. Период полураспада фактора II составил 72–96 ч, X — 24–48 ч, V — до 36 ч, неактивированного фактора VII — 4–5 ч. При инфузии криоплазмы со скоростью 1,5–2 мл/кг/ч для введения 10 мл плазмы на единицу массы тела пациента понадобилось до 7–5 ч. При медленном введении препарата достижение гемостатического эффекта, связанного с восполнением дефицита фактора VII, сомнительно. У пациентов с исходной суммарной активностью ФПК 40% для достижения уровня активности 55–60% необходимо вводить криоплазму в количестве 20–25 мл/кг в течение 1–2 ч. Такой режим инфузионной терапии может привести у ряда больных к появлению тяжелых гемодинамических нарушений, представляющих угрозу для жизни [10, 11]. Кроме того, следует помнить о посттрансфузионном повреждении легких (Transfusion-induced lung injury), которое может возникнуть из-за присутствия лейкоцитов в донорской плазме перед ее замораживанием [12].

Таким образом, для коррекции нарушений свертывания крови в экстренной ситуации у пациентов с кровотечением в качестве стартового гемостатического препарата оправдано использование криоплазмы. При болюсном введении криоплазмы со скоростью до 10 мл/кг/ч суммарная активность ФПК повышается на 5–7%. В случае если состояние центральной гемодинамики не позволяет выполнить трансфузию криоплазмы в объемно-скоростном режиме 10 мл/кг/ч, для восстановления активности ФПК пациента необходимо использовать концентрат факторов протромбинового комплекса. Препаратом выбора для коррекции нарушений свертывания, ставших причиной кровотечения и обусловленных снижением активности ФПК, является концентрат, содержащий факторы II, X, IX и VII в сочетании с протеинами C и S Октаплекс. Для остановки кровотечения, в том числе интраоперационного, легочного, а также кровотечения, развившегося на фоне тромбоцитопении, осложнившей лечение больных со злокачественными новообразованиями на этапах проведения ХТ, показан рекомбинантный препарат активированного фактора rVIIa НовоСэвен.

Л и т е р а т у р а

1. Buchanan G.R. Hematologic supportive care of the pediatric cancer patient. In: Pediatric oncology. P.A. Pizzo, D.G. Poplack. J.B.: Lippincott Company, 1993. p. 980–1.
2. Sutor A.H., Niemeyer C., Sauter S. et al. Gerinnungsveränderungen bei Behandlung mit den Protokollen ALL-BFM-90 und NHL-BFM-90. Klinische Padiatrie 1992;204(4):264–73.
3. Esmon C.T. Regulation of blood coagulation. Biochim Biophys Acta 2000;1477:349–60.
4. Varadi K., Negrier C., Berntorp E. et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. J Thromb Haemost 2003;1(11):2374–80.
5. Turecek P.L., Varadi K., Schwarz H.P. Update on mechanism of action and future of activated prothrombin complex concentrates. Cur Hematol Rep 2004;3:331–7.
6. Johannessen M., Nielsen G., Nordfang O. Comparison of the factor VII:C clot analysis and a modified activated factor VII analysis for monitoring factor VII activity in patients treated with recombinant activated factor VII. Blood Coagul Fibrinol 2000;11(Suppl 1):159–64.
7. Aldouri M. The use of recombinant factor VIIa in controlling surgical bleeding in non-haemophilic patients. Pathophysiol Haemost Thromb 2002;32(Suppl 1):41–6.
8. Regazzoni C.J., Khoury M., Irrazabal C. et al. Neutropenia and the development of the systemic inflammatory response syndrome. Intensive Care Med 2003;29(1):135–8.
9. Andrew M., Vegh P., Johnston M. et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood 1992;80(8):1998–2005.
10. Oettermann H., Haetel S., Knaub S. Pharmacokinetics of Beriplex P/N prothrombin complex concentrate in healthy volunteers. Thromb Haemost 2007;98:790–7.
11. Youssef W.I., Salazar F., Dasarathy S. et al. Role of fresh frozen plasma infusion in correction of coagulopathy of chronic liver disease: A dual phase study. Am J Gastroenterol 2003;98(6):1391–4.
12. Dara S.I., Rana R., Afessa B. et al. Fresh frozen plasma transfusion in critically ill medical patients with coagulopathy. Crit Care Med, 2005;33:2667–71.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *FLT3*, *c-KIT* И *NPM1* У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Л.В. Гук¹, Т.В. Савицкая², Д.А. Домнинский¹, В.О. Бобрынина¹,
М.М. Шнейдер¹, А.А. Масчан¹, О.В. Алейникова²

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва;

²ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Контакты: Лариса Викторовна Гук larisaguk@mail.ru

Прогноз пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), получающих интенсивную химиотерапию, определяется как кариотипическими аномалиями, так и мутациями в генах, ответственных за выживание и самоподдержание лейкемических клеток. В данной работе проанализирована частота возникновения мутаций в генах *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1*, имеющих принципиальное прогностическое значение у взрослых. Мутации в киназном домене *FLT3* выявлены у 18 (21,6%) из 83 пациентов с подлежащими анализу образцами. Клинико-гематологическая ремиссия получена у 2 (11%) из 18 больных, 5 (27,7%) из 18 пациентов с мутациями *FLT3* оказались рефрактерными к проводимому лечению, 2 умерли от осложнений проводимого лечения, у 9 (50%) из 18 развился рецидив ОМЛ. Живы в ремиссии лишь 2 (11%) пациента из 18. Мутации *c-KIT* выявлены у 14,2% (2 из 14 пациентов), а мутации *NPM1* представляли собой аллельный полиморфизм. Таким образом, мутации киназного домена *FLT3* являются крайне неблагоприятными в прогностическом отношении.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, дети, гены *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1*

ANALYSIS OF INCIDENCE AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE *FLT3*, *c-KIT* AND *NPM1* GENES MUTATION IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

L.V. Guk¹, T.V. Savitskaya², D.A. Domninsky¹, V.O. Bobrinina¹, M.M. Schneider¹, A.A. Maschan¹, O.V. Aleinikova²

¹Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow;

²Republic Centre for Paediatric Oncology and Haematology, Minsk, Belarus

Prognosis of patients with acute myeloid leukemia receiving intensive chemotherapy is defined as karyotyping anomalies, and mutations of genes responsible for surviving and self-maintenance leukemic cells. In the giving work incidence of mutation involving genes *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* having prognostic value in adults is analysed. Kynase domain *FLT3* mutation in 18 from 83 patients (21.6%) was detected. 2 from 18 patients (11%) achieved complete remission, 5 from 18 patients (27.7%) with *FLT3* mutations were refractory to therapy, two patients died from treatment complications, 9 from 18 (50%) relapsed. Only 2 patients (11%) are alive in continuous complete remission. *c-KIT* mutations detected in 14.2% (2/14 patients), and *NPM1* mutations represented allelic polymorphism. Thus, kynase domain *FLT3* mutation are prognostic unfavorable.

Key words: acute myeloid leukemia, children, *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* genes

Острые миелобластные лейкозы (ОМЛ) составляют генетически гетерогенную группу заболеваний, общей чертой которых является накопление незрелых миелоидных клеток на разных стадиях дифференцировки. Спектр молекулярно-генетических нарушений, выявленных при ОМЛ, может служить иллюстрацией почти всех известных сегодня механизмов клеточной трансформации. Это и различные хромосомные aberrации (анеуплоидия, хромосомные транслокации, делеции и инверсии), и генные мутации, и эпигенетические нарушения регуляции активности генов. Клеточные процессы, которые подвергаются патологическим изменениям в результате этих молекулярных нарушений, включают процессы регуляции пролиферации клеток, их дифференци-

ровки и выживания, а также клеточные реакции, отвечающие за репарацию ДНК, стабильность и модулирование хроматина. Несмотря на широкую генетическую гетерогенность ОМЛ, считается, что в каждом конкретном случае развитие заболевания может быть вызвано очень небольшим числом (но не менее двух) генетических aberrаций. Была предложена двухшаговая модель развития ОМЛ, в которой гены, вовлеченные в патогенез, условно разбили на 2 группы комплементации. Одна группа (класс I) включает гены, мутации в которых вызывают активацию определенных путей сигнальной трансдукции, что, в свою очередь, приводит к повышенной пролиферации и/или выживанию лейкозных клеток-предшественников. К этой группе относят мутации, приво-

дящие к активации тирозинкиназных рецепторов FLT3 или KIT, а также мутации генов семейства RAS. Другая группа комплементации (класс II) включает мутации и/или хромосомные изменения, которые воздействуют на активность и специфичность факторов транскрипции или компонентов комплекса активации транскрипции и модулирования хроматина. Такого рода мутации приводят к возникновению блока дифференцировки кроветворных клеток-предшественников. Результатом мутаций II класса являются химерные гены, возникающие при хромосомных транслокациях t(8;21), inv(16), t(16;16) и t(15;17), а также при многочисленных хромосомных абберациях, затрагивающих локус 11q23 (ген *MLL*). К той же группе относят и мутации в генах *CEBPA* и, возможно, *NPM1* [1, 2]. Для развития лейкоза необходимо, чтобы мутационные изменения затронули, как минимум, по одному из генов в каждой из этих групп комплементации. Например, был проведен широкомасштабный анализ геномных изменений у детей с ОМЛ *de novo*, который показал, что развитие лейкоза более чем в 50% случаев связано с наличием ≤ 3 генетических изменений [3]. Кроме того, единственный опубликованный на сегодня результат секвенирования всего генома раковой клетки, полученный как раз у больного ОМЛ, идентифицировал всего 10 приобретенных генных мутаций, 2 из которых были ранее описанными онкогенными мутациями, часто встречающимися при острых лейкозах, а 8 — новыми, до этого в опухолях не выявляемыми, онкогенные функции которых неизвестны [4].

Результаты лечения ОМЛ у детей, несмотря на существенное улучшение, связанное с применением интенсивной химиотерапии (ХТ) и проведением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), по-прежнему существенно уступают таковым при остром лимфобластном лейкозе. Основным фактором, определяющим прогноз пациентов с ОМЛ при использовании современной терапии, является кариотип лейкоэмических клеток. Наилучший прогноз (безрецидивная и общая выживаемость — 80 и 90% соответственно) имеет промиелоцитарный лейкоз с транслокацией t(15;17), не намного хуже и результаты терапии у пациентов с ОМЛ с транслокациями t(8;21) и inv 16. В то же время у больных ОМЛ с наличием моносомий 7, 5, inv 3 и сложных кариотипических аномалий заболевание характеризуется химиорезистентностью и даже самая интенсивная ХТ и ТГСК позволяют добиться выживаемости не более 20—30%.

У 30—50% больных, составляющих подгруппу ОМЛ с нормальным кариотипом, не удается выявить никаких цитогенетических отклонений. В последние годы у таких пациентов выявлен целый спектр онкогенных мутаций, представляю-

щих собой в основном точковые мутации и дупликации небольших генных фрагментов. Данные мутации встречаются в разных цитогенетических и возрастных подгруппах ОМЛ, имеют важное прогностическое значение. В последнее время именно эти мутации стали существенным фактором определения стратегии лечения [5, 6]. К наиболее часто наблюдаемым из них относят мутации в гене нуклеофосмина (*NPM1*, хромосомная локализация — 5q35), который кодирует ядерный фосфопротеин с многочисленными функциями [7]. Мутации в гене *NPM1* являются самой часто встречающейся генетической абберацией при ОМЛ, которая обнаруживается приблизительно в 25% всех случаев заболевания у детей и связана с благоприятным прогнозом [8]. У 30% пациентов с ОМЛ выявляют мутации в гене *FLT3* (13q12.2), кодирующем тирозинкиназный рецептор III класса. Наиболее распространенными мутациями в гене *FLT3* являются внутренние тандемные дупликации (ITD) в подмембранном домене и точечные мутации в тирозинкиназном домене (TKD), которые приводят к постоянной активации рецептора и ассоциируются с плохим или промежуточным прогнозом [9]. К этому же классу тирозинкиназных рецепторов относят KIT-рецептор, кодируемый геном *KIT* (4q12). Частота встречаемости мутаций в гене *KIT* широко варьирует в различных генетических и возрастных подгруппах ОМЛ [10]. Мутации в гене *KIT* обычно связывают с неблагоприятным прогнозом, однако в литературе по этому поводу есть разночтения. Активирующие мутации в кодонах 12, 13 или 61 в гене *NRAS* (1p13) встречаются примерно у 25% больных ОМЛ [2, 5]. Прогностическое значение данных мутаций для ОМЛ остается пока спорным. Приблизительно у 10—15% пациентов с ОМЛ обнаруживают мутации, приводящие к инактивации гена *C/EBPα* (19q13.1), нормальное функционирование которого играет важную роль в дифференцировке кроветворных клеток [11]. Мутации в гене *C/EBPα* связаны с благоприятным прогнозом [12, 13].

В последние годы опубликовано много работ, посвященных исследованию частоты встречаемости и прогностического значения генетических аббераций, наблюдаемых при ОМЛ [5, 14—16]. Однако следует отметить, что в данном случае тестируемые группы включали, как правило, небольшое число пациентов (несколько десятков, в отличие от тестирования больших групп взрослых больных ОМЛ, содержавших 450—4100 пациентов), методы детекции мутаций и набор тестируемых мутаций также существенно отличались в разных работах. Именно эти факторы, вероятно, привели к тому, что результаты разных исследований существенно отличаются между собой [17, 18]. Например, в одной работе частота встречае-

мости FLT3/ITD-мутаций при ОМЛ у детей оценивается в 12%, что примерно в 2 раза меньше, чем у взрослых пациентов [19], а в другом исследовании частота встречаемости этой мутации составляет лишь 4,7% [20]. Нужно подчеркнуть, что в первой работе анализировались пациенты, возраст которых был от 0 до 21 года. Этот факт может лежать в основе наблюдаемых разногласий, так как сегодня уже ясно, что этиология лейкоза у детей до 5 лет, у которых еще сохраняются очаги эмбрионального кроветворения, существенно отличается от этиологии лейкоза у детей более старшего возраста и взрослых [21, 22]. Нами приведены результаты молекулярно-генетического исследования мутаций в генах *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* у детей с ОМЛ, а также данные исследований этих генов в контрольной группе.

Материалы и методы

В исследование включены 124 ребенка — 79 (63,7%) мальчиков и 45 (36,8%) девочек — с диагнозом ОМЛ, получавших лечение по протоколам Москва—Минск-2000 и -2006 в Москве (РДКБ — 48, Морозовская ГКБ — 7 пациентов) и Минске (НПЦДОГ — 69 больных). Возраст пациентов варьировал от 1 мес до 18 лет включительно (медиана — 9 лет). Диагноз ОМЛ ставился на основании критериев ФАБ и ВОЗ. Вариант М2 диагностирован у 33%, М5 — у 16,9%, М4 — у 16,1%, М1 — у 15,3%, М3 — у 5,6%, М6 — у 4,8%, М7 — у 2,4%, М0 — у 2,4%, МХ — у 1,6%, М4Е0 — у 1,6% больных.

Контрольная группа была представлена 32 здоровыми донорами-добровольцами, не являвшимися родственниками пациентов.

В качестве материала исследования использовали архивные образцы: замороженные образцы костного мозга ($n=11$) и венозной крови (при наличии blasts-ми, $n=3$) больных, препараты костного мозга пациентов на предметных микроскопических стеклах ($n=41$), свежеприготовленные образцы костного мозга ($n=69$), замороженные образцы венозной крови здоровых доноров-добровольцев ($n=32$).

ДНК из архивных образцов выделяли с помощью набора ДНК-сорб-В («АмплиСенс»,

Москва) ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с методикой производителя. Геномную ДНК из свежеприготовленных образцов выделяли с использованием протеинкиназы К и фенольной экстракции [23].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) из архивных образцов проводили по стандартной двух-праймерной схеме. Все праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Россия). Последовательность праймеров представлена в табл. 1.

Реакционная смесь для генов *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* в конечном объеме 25 мкл содержала: 0,25 мг ДНК, по 5 пкмоль каждого праймера, по 25 ммоль дНТФ, 1 ЕД активности Taq ДНК-полимеразы (производства «Изоген»), ПЦР-буфер (производства «Изоген»), $MgCl_2$ в соответствии с условиями, подобранными при оптимизации ПЦР.

ПЦР осуществляли в автоматическом режиме с применением амплификатора Dyad.

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных для проведения ПЦР

Праймер	Последовательность 5'—3'
FLT/ITD 11F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
FLT/ITD 12R	CCT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
FLT3 14exF	GAC TCA TCA TTT CAT CTC TGA AGC
FLT3 14exR	CAT TTG GCA CAT TCC ATT CTT AC
FLT3 15exF	ACG TAC TCA CCA TTT GTC TTT GC
FLT3 15exR	TGC TGT CCT TCC ACT ATA CTG TAC C
FLT3 20exF	ACT CTG GTG TCA TTC TTG ACA GTG
FLT3 20exR	GAA ATA GCA GCC TCA CAT TGC
FLT3 AL F	CCG CCA ACG TGC TTG
FLT3 AL R	CAC AGT AAT ATT CCA TAT GAC CAG Aa TC
CKIT 8exF	ACA TAT GGC CAT TTC TGT TTT CC
CKIT 8exR	TGC CAA AAA TAA TCA TCT CAC CTC
CKIT 9exF	TTC TTC CCT TTA GAT GCT CTG C
CKIT 9exR	ATA TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC
CKIT 10-11exF	TCC ACA TTT CTC TTC CAT TG TAGA G
CKIT 10-11exR	AGC CCC TGT TTC ATA CTG ACC
CKIT 17exF	TCT CCT CCA ACC TAA TAG TGT ATT CAC
CKIT 17exR	TCA AGC AGA GAA TGG GTA CTC AC
CKIT 18exF	TGT GCT TCT ATT ACA GGC TCG AC
CKIT 18exR	TGG CAA GGA TCA TTT TAC CTA AAG
NPM1 12exF	GAA GTG TTG TGG TTC CTT AAC CAC
NPM1 12exR	CAG TTA AAT AAG TCA ATA GAA ACC GTG C

Примечание. В праймер FLT3 AL R внесена нуклеотидная замена (g на t), которая приводит к появлению сайта узнавания EcoRV (выделена жирным шрифтом).

Амплификацию для генов *FLT3*, *c-KIT* проводили в следующем режиме:

95°C — 5 мин	} 35 циклов
94°C — 15 с	
60°C — 15 с	
72°C — 45 с	
72°C — 10 мин	

Амплификацию для гена *NPM1* проводили в следующем режиме:

95°C — 5 мин	} 10 циклов
94°C — 15 с	
65°C — 15 с	
72°C — 45 с	
94°C — 15 с	} 20 циклов
55°C — 15 с	
72°C — 45 с	
72°C — 10 мин	

Очистку продукта амплификации проводили осаждением 96% этиловым спиртом в присутствии ацетата аммония. Качество продукта ПЦР и его концентрацию определяли методом вертикального электрофореза. Растворенный в воде амплификат (2 мкл) наносили на 8% полиакриламидный гель (соотношение акриламида и бис-акриламида 29:1,3). Гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,1 мкг/мл) в течение 10 мин и визуализировали продукты ПЦР в ультрафиолетовом свете.

В реакции секвенирования по протоколу Applied Biosystems BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing использовали 3—25 нг продукта ПЦР. Очистку продукта секвенирования проводили осаждением 96% этиловым спиртом в присутствии этилендиаминтетраацетата (ЭДТА).

Определение нуклеотидной последовательности образцов происходило методом автоматического секвенирования на приборе Applied Biosystems 3130xl согласно протоколу фирмы-производителя для BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Для анализа результатов использовали программу Sequencing Analysis 5.2.

Анализ мутаций в гене *FLT3* из свежеприготовленных образцов выполняли по описанной ранее методике K. Mills и соавт. [24].

ПЦР с праймерами *FLT3/ITD* проводили по стандартной двухпраймерной схеме. Последовательность праймеров представлена в табл. 1. ПЦР осуществляли в следующем режиме:

95°C — 5 мин	} 35 циклов
95°C — 1 мин	
56°C — 1 мин	
72°C — 1 мин	
72°C — 10 мин	

Качество продукта ПЦР и его концентрацию определяли методом электрофореза на агарозном геле. Длину ITD вычисляли как разницу длин ПЦР-фрагмента нормального гена *FLT3* и мутантного ПЦР фрагмента.

ПЦР для выявления мутаций в активационной петле (AL) гена *FLT3* проводили по стандартной двухпраймерной схеме. Последовательность праймеров представлена в табл. 1. ПЦР осуществляли в следующем режиме:

95°C — 5 мин	} 35 циклов
95°C — 1 мин	
60°C — 30 с	
72°C — 30 с	
72°C — 10 мин	

В петле активации киназного домена *FLT3* определяли точечные мутации, приводящие к замене остатка аспарагиновой кислоты в позиции 835 и/или остатка изолейцина в позиции 836 (D835/I836). Возникновение этих мутаций приводит к потере в данном геномном локусе сайта узнавания для рестриктазы *EcoRV* (GATATC), что позволяет различать между собой нормальную и мутантную формы гена *FLT3*.

Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продуктов выполняли методом автоматического секвенирования на приборе Applied Biosystems 3130 согласно протоколу фирмы-производителя BigDye V1.1 («Applied Biosystems»).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были проанализированы кодирующие последовательности 14, 15 и 20-го экзона гена *FLT3*, 8, 9, 10, 11, 17 и 18-го экзона гена *c-KIT*, 12-го экзона гена *NPM1*, в том числе области экзон-интронных соединений, поскольку именно в этих экзонах наиболее часто встречаются мутации при ОМЛ у взрослых (www.ensembl.org).

При молекулярно-генетическом исследовании 14, 15 и 20-го экзона гена *FLT3*, мутации *FLT3/ITD* обнаружены у 18,1% (15 из 83) больных, мутации D385 — у 6,9% (3 из 43). При изучении архивных образцов (высушенные на воздухе мазки костного мозга; $n=41$) выявлено 0% (0 из 41) мутаций, при изучении архивных, замороженных без криопротекторов костного мозга ($n=11$) и венозной крови ($n=3$) — 21,4% (3 из 14), свежеприготовленных образцов костного мозга — 21,7% (15 из 69); данные представлены в табл. 2. Заслуживает внимания тот факт, что у 50% пациентов с мутациями *FLT3* обнаружены другие транслокации и численные аномалии кариотипа. Для анализа мутаций в генах *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* необходимо использовать свежеприготовленные образцы костного мозга или замороженные без криопротекторов образцы костного мозга и венозной крови.

При исследовании 8, 9, 10, 11, 17 и 18-го экзона гена *c-KIT* у 14,2% (2 из 14) больных выявлены следующие мутации: у одного пациента инсерция 6 нуклеотидов в 9-м экзоне, у другого — точечная замена в кодоне 546 гена *c-KIT* — происходит замена аденина на гуанин в положении 1638, что не приводит к замене лизина в 546-м кодоне (p.546 Lys>Lys, c.1638 A>G) в 10-м экзоне. Несмотря на

Таблица 2. Мутации гена *FLT3* в исследуемой группе пациентов

Возраст, годы — диагноз	46XY	Мутации FLT3/ITD	FLT3-D835	Исход
11 — ОМЛ M2	46XY	+	—	Рефрактерный лейкоз, умер
13 — ОМЛ M2	46XY	+	—	Рефрактерный лейкоз, умер
5 — ОМЛ M2	46XY t(15;17)	+	—	Рефрактерный лейкоз, умер
15 — ОМЛ M3	46XY	+	—	Умер от развития инфекционных осложнений
6 — ОМЛ M2	46XY	+	—	Рецидив, умер
15 — ОМЛ M5	46XX	+	—	Рецидив
9 — ОМЛ M4	46XY	—	D835-Y835	Рефрактерный лейкоз, умер
15 — ОМЛ M2	46XY t(6;14)	+	—	Рефрактерный лейкоз, умер
14 — ОМЛ M1	46 XY t(9;11)	+	—	Рецидив
1 — ОМЛ M5	46 XY t(4;10)	—	D835-H835	Рецидив
15 — ОМЛ M1	47XX,+8	+	—	Рецидив
9 — ОМЛ M1	45,XY t(8;21)	+	—	Рецидив
11 — ОМЛ M2	46 XX	+	—	Ремиссия
17 — ОМЛ M2	47XX,+8	—	D835-Y835	Ремиссия
15 — ОМЛ M4	Данных нет	+	—	Умер от развития инфекционных осложнений
11 — ОМЛ M2	46 XY	+	—	Рецидив
4* — ОМЛ M1	46 XY t(9;11)	+	—	Рецидив
4 — ОМЛ M1	46XY	+	—	Рецидив

*Возраст — 4 мес.

то что в контрольной группе точечной замены в кодоне 546 не обнаружено, мы более склонны считать ее полиморфизмом, тем более что в данном случае не происходит замены аминокислоты. У пациентов с t(8;21) мутации гена *c-KIT* имели место в 10% (1 из 10) случаев. Данные исследования, описание пациентов, найденные мутации, их местоположение, а также исход заболевания представлены в табл. 3.

При молекулярно-генетическом исследовании 12-го экзона гена *NPM1* у 68,4% (13 из 19) детей выявлена делеция одного нуклеотида. По нашему мнению, это полиморфизм, так как делеция зафиксирована в контрольной группе в 68,72% случаев. Результаты исследования, данные пациентов, найденные мутации, их местоположение, а также исход заболевания отражены в табл. 4. Из табл. 4 видно, что 61,5% (8 из 13) больных достигли клинико-гематологической ремиссии, у 23,3% (3 из 13)

развился рефрактерный лейкоз с летальным исходом, у 7,6% (1 из 13) — рецидив, в 7,6% (1 из 13) случаев данные отсутствуют.

Нами также проведено молекулярно-генетическое исследование контрольной группы 32 здоровых доноров-добровольцев, в ходе которого выявлен аллельный полиморфизм гена *c-KIT* у 6% (2 из 32) человек в 10-м экзоне (замена аденина на цитозин в положении 1521 приводит к замене метионина на лейцин в кодоне 541 и 12-м экзоне гена *NPM1* в 68,72% (22 из 32) случаев (делеция одного нуклеотида). Мы предполагаем, что это аллельный полиморфизм, а не соматическая мутация, произошедшая в опухолевом клоне.

На основании данного исследования можно сделать выводы о том, что проведение скрининга на наличие мутаций в гене *FLT3* при ОМЛ у детей оправдано с учетом их крайне неблагоприятного прогностического значения, а также наличия пре-

Таблица 3. Выявленные мутации гена *c-KIT* в исследуемой группе пациентов

Возраст — диагноз	Цитогенетика	Мутация	Исход
5 лет — ОМЛ M2	t(8;21)AML/ETO	<i>c-KIT</i> , 9-й экзон, инсерция 6 нуклеотидов	Рецидив, умер
1 мес — ОМЛ M5a	Данных нет	<i>c-KIT</i> , 10-й экзон, замена p.546 Lys>Lys (c.1638 A>G)	Данных нет

Таблица 4. Мутации гена *NPM1* в исследуемой группе пациентов

Возраст, годы — диагноз	Цитогенетика	Полиморфизм <i>NPM1</i>	Исход
11 — ОМЛ М2	Нормальный кариотип	FLT3/ITD полиморфизм <i>NPM1</i>	Смерть от прогрессии заболевания
1 — ОМЛ М2	Нормальный кариотип	+	Клинико-гематологическая ремиссия
3 — ОМЛ М4	t(8;21) AML/ETO	+	Смерть от прогрессии заболевания
1* — ОМЛ М5a	Данных нет	+	Данных нет
8 — ОМЛ М5a	Нормальный кариотип	+	Клинико-гематологическая ремиссия
9 — ОМЛ М3	t(15;17) PML/RARA	+	Клинико-гематологическая ремиссия
14 — ОМЛ М6	Нормальный кариотип	+	Смерть от прогрессии заболевания
6 — ОМЛ М3	t(15;17) PML/RARA	+	Клинико-гематологическая ремиссия
7 — ОМЛ М2	Нормальный кариотип	+	Клинико-гематологическая ремиссия
14 — ОМЛ М5b	Нормальный кариотип	+	Клинико-гематологическая ремиссия
14 — ОМЛ М5a	Inv.16 CBFB/MYH11	+	Клинико-гематологическая ремиссия
10 — ОМЛ М3	t(15;17) PML/RARA	+	Клинико-гематологическая ремиссия
6 — ОМЛ М4	t(8;21) AML/ETO	+	Прогрессия заболевания, жив

*Возраст — 1 мес.

паратов, ингибирующих функцию FLT3-тирозинкиназы (сорафениб), которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии. В отношении значения мутаций в гене *c-KIT* выводы

делать не представляется возможным в связи с небольшим числом пациентов. Тем не менее данные, полученные у взрослых пациентов, свидетельствуют о необходимости продолжения исследований.

Л и т е р а т у р а

- Dohner H. Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology* 2007;1:412—9.
- Kelly L., Gilliland D. Genetics of myeloid leukemias. *Ann Rev Genom Hum Genet* 2002;3:179—98.
- Radtke I., Mullighan C., Ishii M. et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *PNAS* 2009;106:12944—9.
- Ley T., Mardis E., Ding L. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008;456:66—72.
- Dohner K., Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93:976—82.
- Radich J. Molecular classification of acute myeloid leukemia: are we there yet? *J Clin Oncology* 2008;26:4539—41.
- Grisendi S., Pandolfi P. NPM mutations in acute myelogenous leukemia. *New Engl J Med* 2005;352(3):291—2.
- Wertheim G., Bagg A. Nucleophosmin (NPM1) mutations in acute myeloid leukemia: An ongoing (cytoplasmic) tale of dueling mutations and duality of molecular genetic testing methodologies. *J Mol Diagnost* 2008;10(3):198—202.
- Бавыкин А., Волкова М. FLT3-тирозинкиназа при острых нелимфобластных лейкозах. *Онкогематология* 2006;(1—2):15—24.
- Lennartsson J., Jelacic T., Linnekin D. et al. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase Kit. *Stem Cells* 2005;23:16—43.
- Gombart A., Hofmann W., Kawano S. et al. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 2002;99:1332—40.
- Leroy H., Roumier C., Huyghe P. et al. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19(3):329—34.
- Liu P., Tarle S., Hajra A. et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2b and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993;261:1041—4.
- Baldus C., Mrozek K., Marcucci G. et al. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 2007;137:387—400.
- Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology* 2008;1:1—11.
- Shipley J., Butera J. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology* 2009;37:649—58.
- Kaspers C., Zwaan C. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007;92:1519—32.
- Meshinchi S., Stirewalt D., Alonzo T. et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2009;111:4930—3.
- Meshinchi S., Arcenci R. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncologist* 2007;12:341—55.
- Krstovski N., Tosic N., Janic D. et al. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med Oncol* 2009;http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
- Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2003;7:233—45.
- Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms and epidemiology. *JNCI Monographs* 2008;39:87—90.
- Маниатис Т., Фрис Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. с. 265—6.
- Mills K., Gilkers A., Walsh V. Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *Br J Haematol* 2005;130:203—8.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

О.С. Татарина¹, Е.Ю. Осипова², С.А. Румянцев²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e_ossipova@mail.ru

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина». В обзоре литературы проанализированы данные об эффективности, безопасности и технологических особенностях использования МСК в клинической практике. Обсуждаются биологические свойства МСК, полученных в результате длительного культивирования, и механизмы их взаимодействия с другими клеточными элементами.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», длительное культивирование

MESENCHYMAL STEM CELLS BIOLOGICAL PROPERTIES AND POSSIBILITIES OF CLINICAL USE

O.S. Tatarinova¹, E.Yu. Osipova², S.A. Roumiantsev²

¹Lomonosov Moscow state university; ²Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow

Autolog and allogeneic mesenchymal stem cells (MSC) transplantation currently is used in clinical practice for hematopoietic progenitor engraftment acceleration and graft versus host disease prophylactic and treatment. In this literature review data concerning efficacy, safety and technologies of MSC clinical use are analyzed. Biological properties of MSC received in long-term culture and mechanisms of their interaction with other cells are discussed.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), hematopoietic stem cells transplantation, MSC transplantation, graft versus host disease, long-term culture

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1, 2]. Эффективность при РТПХ связана с тем, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами, способны оказывать антипролиферативное влияние на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти [3, 4]. Кроме того, МСК понижают секрецию интерферона- γ (ИНФ- γ) и усиливают (либо не изменяют) секрецию интерлейкина-4 (ИЛ-4), что может способствовать переключению иммунного ответа с преимущественно опосредованного Th1 (с выделением провоспалительных цитокинов) на опосредованный Th2 (с выделением противовоспалительных цитокинов), более предпочтительного при терапии РТПХ.

Помимо этого, установлено, что МСК продуцируют цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки крове-

творных предшественников [5, 6]. Показана клиническая эффективность применения культивированных *ex vivo* МСК при аутологичной и аллогенной трансплантации кроветворных предшественников для сокращения сроков приживления [7, 8].

Однако применение МСК при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) может иметь ряд негативных последствий. В силу того что МСК оказывают неспецифическое иммуносупрессивное действие, у пациентов, получающих терапию МСК, повышается риск развития вирусных, грибковых и бактериальных инфекционных заболеваний, а также, возможно, рецидива лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза» [9].

Кроме того, остается неизвестным, оказывает ли терапия МСК значимое влияние на лейкозные клетки, которые даже в состоянии ремиссии, необходимой для проведения трансплантации ГСК (ТГСК), присутствуют в костном мозге в виде минимальной резидуальной болезни, в частности, на их чувствительность к противоопухолевой терапии, которая является важным прогностическим

фактором. С одной стороны, МСК играют важную роль в поддержании гемопоэза и выделяют цитокины и ростовые факторы, стимулирующие пролиферацию и дифференцировку ГСК и бластных клеток костного мозга, а также улучшают приживление ГСК при трансплантации. Можно предположить, что МСК могут оказывать аналогичное действие на лейкозные клетки, которые являются гемопоэтическими предшественниками. С другой стороны, МСК оказывают антипролиферативное влияние на лимфоциты.

В последнее время появляются работы, согласно которым различные линии МСК могут оказывать антипролиферативное действие на лейкозные клетки, препятствовать апоптозу, индуцируемому химиопрепаратами и бессывороточной средой, повышать экспрессию антиапоптотических факторов, не изменяя экспрессию гена множественной лекарственной резистентности (MDR1), что может приводить к снижению чувствительности лейкозных клеток к химиотерапии (ХТ) *in vitro*.

Определение МСК, их основные свойства

Существование в костном мозге, наряду со стволовыми кроветворными клетками, стволовых клеток стромы, образующих в культуре колонии фибробластоподобных клеток, было впервые показано А.Я. Фриденштейном и соавт. [10], которые выделили фибробластоподобную популяцию, обладающую адгезивными свойствами и способную восстанавливать (регенерировать) зачатки кости *in vivo*. Эти клетки получили название колониеобразующих предшественников фибробластов (КОЕ-ф). Установлено, что КОЕ-ф имеют стволовую природу, т.е. обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные мезенхимальные (адипогенную, хондрогенную, остеогенную) клеточные линии [11, 12] и немезенхимальные линии [13–15]. С учетом способности этих клеток к самоподдержанию и дифференцировке в различные клеточные линии мезенхимы, А.И. Caplan [16] ввел термин «мезенхимальные стволовые клетки».

Международным обществом клеточной терапии (ISCT) были внесены некоторые поправки в номенклатуру: введен термин «мультипотентные МСК» и определено, что не всегда МСК являются стволовыми клетками [17]. Кроме того, в терминологию включали источник выделения МСК: жировая ткань, костный мозг и т.д. ISCT был введен минимум критериев для определения мультипотентных МСК [18]:

- 1) способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования;
- 2) экспрессия молекул адгезии CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 или CD19 и HLA-DR;
- 3) способность дифференцировки в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

Кроме того, важным свойством МСК является их способность образовывать колонии веретенообразно-вытянутых клеток, по морфологии напоминающих фибробласты, при культивировании *ex vivo*.

Добавление различных факторов в среду для культивирования МСК может приводить к их дифференцировке [10–12].

В костном мозге недифференцированные МСК создают микроокружение для ГСК. Они продуцируют матриксные молекулы, включая фибронектин, ламинин и коллаген [19]. МСК также экспрессируют лиганды для поверхностных молекул клеток гемопоэтических линий: внутриклеточные молекулы адгезии 1-го и 2-го типов, молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа, функционально-связанный антиген лимфоцитов 3-го типа, молекулу адгезии активированного лейкоцита [20]. При совместном культивировании МСК формируют кластеры с ГСК, мегакариоцитами и остеобластными предшественниками и образуют линейно-специфические колониеобразующие единицы из CD34⁺-клеток костного мозга в долговременных культурах [6, 21]. Кроме того, МСК секретируют цитокины, необходимые для дифференцировки ГСК [6, 20].

Человеческие МСК экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) I класса, а под действием ИФН-γ — и II класса [22]. При исследовании уровня экспрессии поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) было показано, что МСК экспрессируют средние уровни молекул I класса, в то время как молекулы МНС II класса на поверхности клеток не выявлялись и были обнаружены лишь внутриклеточные депозиты аллоантигенов II класса в клеточных лизатах при помощи Western blotting-метода [23, 24], стимуляция ИФН-γ повышала содержание молекул как II, так и I классов на поверхности клеток [24]. Экспрессия молекулы HLA-I повышалась при дифференцировке МСК в клетки жировой, костной и хрящевой тканей, но экспрессия молекул II класса при этом не выявлялась [23].

В процессе изучения МСК были выделены из различных тканей, включая жировую ткань, пуповинную кровь, фетальные печень, кровь, костный мозг и легкое [25–28].

Возможности применения МСК для клеточной терапии

При культивировании *in vitro* после нескольких пассажей МСК могут быть применены в клинике для клеточной терапии (рис. 1). Однако остается неизвестным, происходит ли изменение МСК при их культивировании и пассировании; возможно, пролиферация на пластике может приводить к фенотипическим и функциональным изменениям МСК [30, 31], тем более, что даже отдельно взятые клоны МСК отличаются друг от друга по экс-

прессии генов, фенотипу, способности к дифференцировке и экспансии [12, 32, 33].

Направления клеточной терапии, связанные с основными свойствами МСК, могут быть разделены на 3 группы:

1) поддержка кроветворения при котрансплантации с ГСК;

2) замещение и восстановление функции поврежденных негемопоэтических тканей (кости, хряща, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани, печени и др.);

4) подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах.

На двух направлениях для использования МСК — для поддержания гемопоэза и подавления иммунных конфликтов — мы остановимся более подробно позже.

Второе направление для использования МСК возможно благодаря тому, что МСК проявляют себя *in vivo* как мультипотентные клетки. Было показано, что после введения новорожденным мышам или инфузии *in utero* клетки внедряются в различные органы и в них происходит специфическая для данной ткани дифференцировка МСК [34, 35]. После внутривенного (в/в) введения МСК в небольшом количестве могут быть обнаружены в различных тканях, при этом МСК внедряются преимущественно в очаги повреждения [16, 36—38]. МСК восстанавливают не только мезенхимальные линии тканей: хрящ межпозвоночных дисков [39], кость [40, 41], кардиомиоциты [42], связки [43], но и онтогенетически менее родственные ткани, например нервную ткань [44], эпителиальную ткань кожи, легкого, печени, кишечника, почек и селезенки [36, 45, 46]. Кроме того, внутривенное введение МСК ускоряло регенерацию поврежденных легких, нервной ткани и почек у экспериментальных животных в основном благодаря паракринным механизмам и изменению продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в области повреждения [46—48]. Также можно применять МСК для лечения токсических осложнений ХТ, таких как радиационный гастроэнтерит и геморрагический цистит.

Котрансплантация МСК с ГСК

и роль МСК в поддержании гемопоэза

Это направление клеточной терапии связано с основными свойствами МСК: способностью

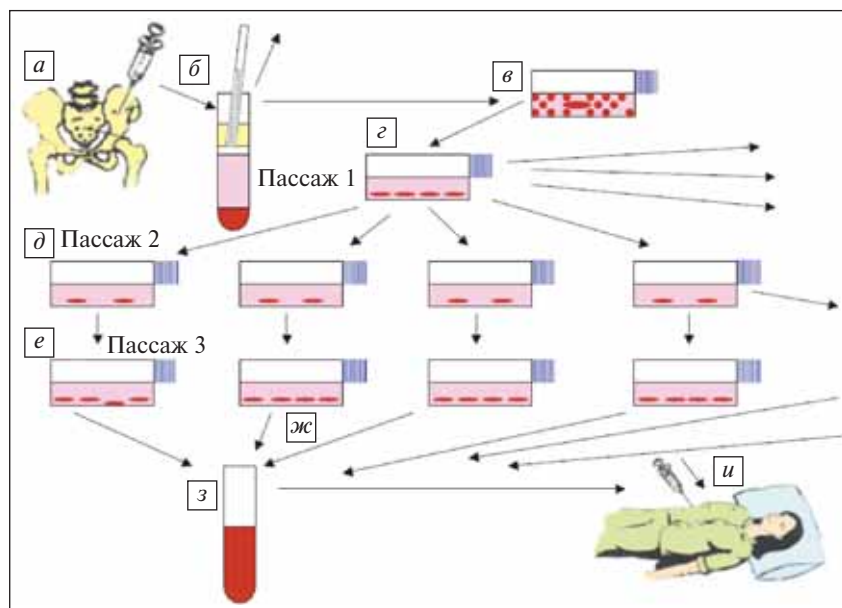


Рис. 1. Выделение МСК и их применение для исследовательской работы и в клинике [29]: а — аспирация костного мозга; б — выделение мононуклеарных клеток по градиенту плотности; в — культивирование клеток во флаконах в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку; г — когда клетки покрывают > 70% поверхности чашки, их снимают при помощи раствора трипсина и д, е — снова высаживают на чашки при меньшей плотности; ж—и — снятие клеток с чашек и использование для их клеточной терапии

формировать стромальное микроокружение кроветворного костного мозга; обеспечивать прикрепление кроветворных клеток и снабжение их необходимыми цитокинами и ростовыми факторами; участвовать в строительстве и васкуляризации костного плацдарма. Изначально основной функцией МСК считалось поддержание гемопоэза [49]. При последующих исследованиях было показано, что человеческие МСК усиливают приживление неродственных выделенных из пуповинной крови ГСК у NOD-SCID-мышей и эмбрионов овцы [50—53]. Лучшее всего усиливающий эффект выявлялся при небольшом количестве ГСК и распространялся на клетки миелоидной, лимфоидной и мегакариоцитарной линий [51—53]. В исследовании В. Maitra и соавт. [53] у 2 из 10 мышей приживление происходило при небольшом количестве ГСК, в то время как у 8 из 10 мышей значительное приживление наблюдалось при котрансплантации клеток пуповинной крови и МСК. Механизм усиления приживления ГСК при действии МСК *in vivo* неизвестен. Один из возможных механизмов — это усиление хоуминга и пролиферации ГСК под действием выделяемых в кровотоке цитокинов, что, однако, может не приводить к хоумингу МСК в костный мозг. В некоторых исследованиях наблюдались усиливающие эффекты, но МСК при этом в костном мозге не обнаруживались [52].

Таким образом, результаты доклинических испытаний котрансплантации МСК с кроветворными стволовыми клетками на экспериментальных

моделях позволили прийти к следующим заключениям:

- трансплантация МСК ускоряет и улучшает приживление ГСК;

- действие МСК, стимулирующее приживание и пролиферацию ГСК, не является линейно-специфическим, способствует в равной мере пролиферации миелоидных и лимфоидных клеток;

- действие МСК реализуется через высвобождение цитокинов, регулирующих приживание (SDF1), пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток (GM-CSF, G-CSF, SCF, ИЛ-6) и иммуносупрессивный эффект (Активин-А) [54].

Эти данные явились основанием для клинического использования МСК вместе с ГСК с целью повышения эффективности трансплантаций гемопоэтической ткани.

Клинические испытания подтвердили, что МСК могут быть выделены в достаточном количестве из аспирата костного мозга и после 4—7 пассажей в культуре введены пациенту в количестве до 50×10^6 без осложнений и побочных эффектов. При этом МСК, выделенные из костного мозга реципиентов в различные сроки после трансплантации, демонстрируют черты частичного, а чаще полного химеризма [7, 55, 56].

Исследования, проведенные на достаточно большом контингенте больных со злокачественными и незлокачественными заболеваниями, показали, что котрансплантация ГСК с МСК, выращенными в культуре (4—7 пассажей) и введенными в/в в количестве $1\text{—}5 \times 10^6$, приводила к ускорению приживления ГСК, восстановлению показателей периферической крови (абсолютное число нейтрофилов и тромбоцитов), а также к снижению частоты и интенсивности острой и хронической РТПХ [8, 55, 56].

Иммуномодулирующие свойства МСК и их применение для лечения иммуноконфликтных состояний

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и способны уменьшать воспаление. Человеческие МСК подавляют аллореактивность лимфоцитов *in vitro* в смешанных культурах лимфоцитов (MLC) благодаря HLA-независимым механизмам [22, 57—59].

Взаимодействие МСК и лимфоцитов *in vitro*

МСК экспрессируют маркеры, характерные для эпителия тимуса, и молекулы адгезии, необходимые для взаимодействия с Т-клетками [20, 28]. При отсутствии иммуносупрессии или механизмов, вызывающих иммунную толерантность, аллогенные клетки отторгаются иммунной системой. Клетки, экспрессирующие МНС-молекулы и подходящие костимулирующие молекулы, стимулируют Т-клетки только прямым путем. Человеческие МСК не экспрессируют молекулы CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) или CD40 даже после стимуляции

ИФН- γ . Аллогенные клетки могут также активировать Т-клетки опосредованно, когда МНС-антигены презентуются антиген-презентирующими клетками (АРС). Недифференцированные МСК, МСК, экспрессирующие аллоантигены II класса после воздействия ИФН- γ , и МСК, дифференцированные в адипоциты, остеокиты и хондроциты, не могут индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов даже в присутствии АРС или после проведения костимулирующих сигналов с использованием CD28-специфических антител и CD80-или CD86-генной трансдукции [22, 24, 53, 57, 59—61]. Показателем аллореактивности лимфоцитов может служить продукция активированными лимфоцитами ИФН- γ . МСК не стимулируют продукцию ИФН- γ мононуклеарными клетками периферической крови [24, 41, 53, 58, 61]. В присутствии МСК снижалась экспрессия маркеров, связанных с активацией лимфоцитов: CD25 (ИЛ-2-стимулирующий рецептор), CD38 и CD39 [4, 24]. Однако под действием МСК все-таки наблюдался прайминг лимфоцитов. При совместном культивировании Т-клеток и МСК и последующем культивировании Т-клеток с неразделенной культурой лимфоцитов, выделенных у доноров МСК, активация Т-клеток была практически аналогична таковой при культивировании только с лимфоцитами, выделенными от того же донора [24].

МСК не только не активируют CD4⁺, но также не подвергаются лизису CD8⁺-цитотоксическими лимфоцитами [3, 62]. Даже несортированные донорские лимфоциты, стимулированные *in vitro* РВМС (мезенхимальные клетки периферической крови), лизируют только лимфоциты, но не МСК, выделенные у того же донора [3]. Дальнейшие исследования показали, что МСК запускают abortивную программу активации в полностью дифференцированных CD8⁺-Т-клетках, при этом главные эффекторные функции не активируются. Кроме того, МСК не подвергаются специфическому лизису NK-клетками [3].

Взаимодействие МСК и Т-лимфоцитов

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и ингибируют ответ наивных Т-клеток и клеток памяти в смешанной лимфоцитарной культуре (СКЛ) и культуре, индуцированной митогенами [4, 24, 53, 57, 63, 64]. Супрессия не зависит от МНС и наиболее выражена, если МСК добавляются в первый день 6-дневной культуры. Степень супрессии является дозозависимой. Значительное ингибирование наблюдается, когда используется большое количество МСК (лимфоциты >1:10). При добавлении меньшего количества МСК (1:100—1:10 000) пролиферация Т-клеток усиливалась [59, 60, 65]. Супрессивный эффект МСК сохранялся и при их дифференцировке в остеокиты, адипоциты и хондроциты и усиливался при предшествующей обработке ИФН- γ [23]. Супрессивное

действие человеческих МСК проявлялось при разделении МСК и лимфоцитов при помощи проницаемой мембраны [3, 22, 24, 58, 63].

Субпопуляцию наивных $CD4^+$ -Т-клеток, экспрессирующих CD25, называют регуляторными Т-клетками, они имеют потенциальную супрессорную активность [66, 67]. МСК увеличивают количество

$CD4^+CD25^{hi-}$, $CD4^+CTLA4^+$ и $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ -клеток среди стимулированных ИЛ-2 лимфоцитов и в MLC [68, 69] (рис. 2).

Под действием МСК снижалась экспрессия CXCR4, 5 и CCR7. При соотношении МСК:лимфоциты 1:10 МСК стимулировали секрецию антител В-клетками [70].

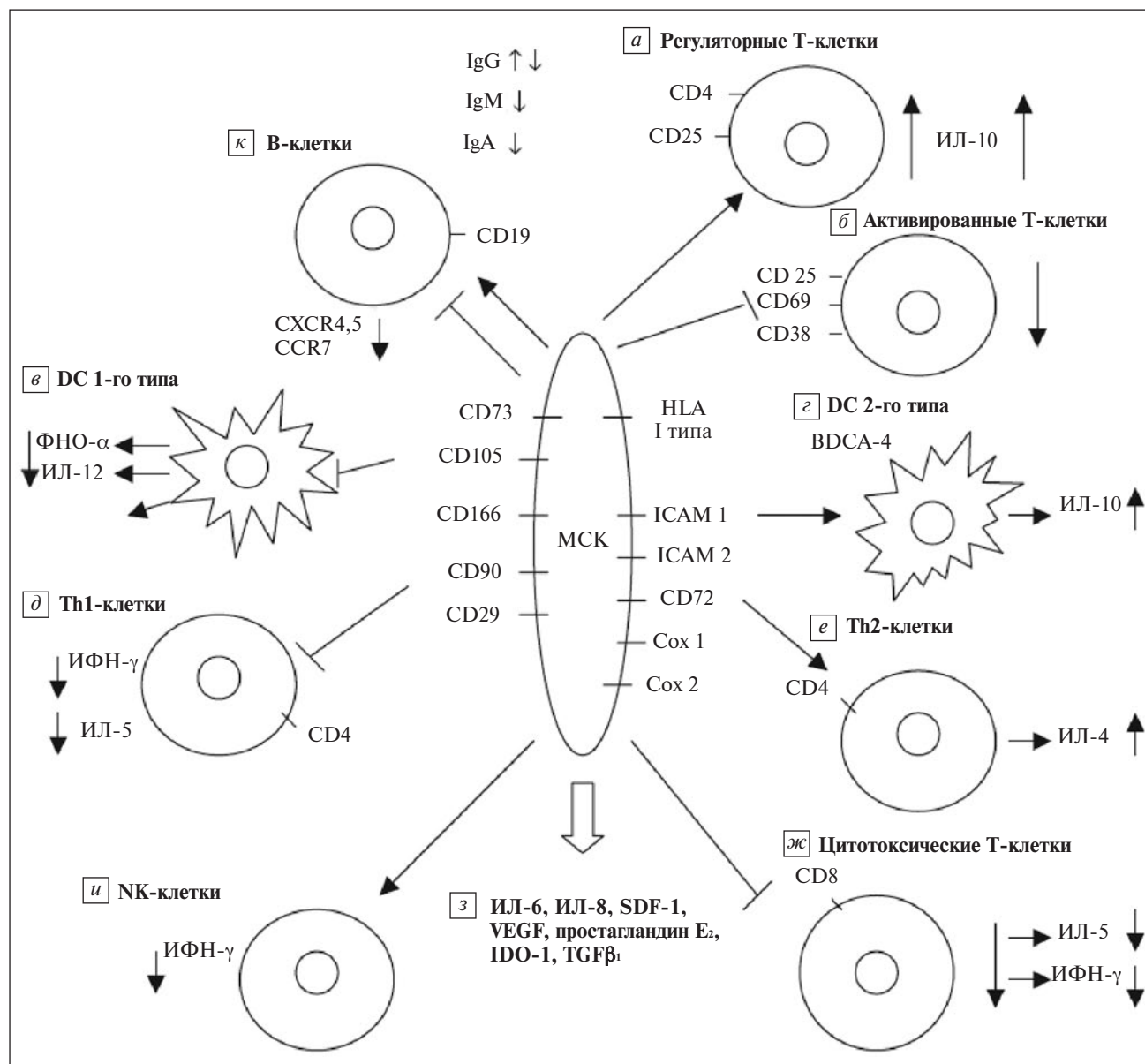


Рис. 2. Влияние МСК на клетки иммунной системы [29]: а — МСК увеличивают соотношение $CD4^+$ -, $CD25^+$ -клеток и продукцию ИЛ-10; б — уменьшают экспрессию маркеров активации Т-клеток, CD25, CD69 и CD38; замедляют созревание APC и уменьшают экспрессию HLA-DR; в — дендритные клетки — DC) 1-го типа снижали продукцию ФНО-α и ИЛ-12 при культивировании с МСК; г — МСК повышают секрецию ИЛ-10 ЛПС-стимулированными DC 2-го типа, снижают секрецию ИЛ-5 $CD4^+$ -клетками; д — образование ИФН-γ Th1-клетками значительно снижалось под действием МСК; е — Th2-клетки; ж — МСК ингибируют смешанные культуры лимфоцитов и последующее развитие цитотоксических Т-клеток благодаря растворимым факторам; з — растворимые факторы, вырабатываемые МСК: ИЛ-6, ИЛ-8, фактор роста стромального происхождения-1 (SDF-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). К растворимым факторам, ингибирующим активацию Т-клеток, относят простагландин E_2 , индуцирующий регуляторные Т-клетки, индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), образование IDO стимулируется ИФН-γ, IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин и ингибирует Т-клеточный ответ путем деплеции триптофана. К растворимым факторам, ингибирующим Т-клеточный ответ, относят TGFβ₁, фактор роста гепатоцитов; и — при культивировании с МСК чистой культурой NK-клеток значительно снижалось образование ИФН-γ; к — МСК снижали пролиферацию В-клеток и секрецию иммуноглобулинов В-клетками при соотношении МСК:лимфоциты 1:1

Количество CD25⁺- и CD38⁺-клеток в митоген-стимулированной культуре лимфоцитов уменьшалось в присутствии МСК [4, 71]. Деpletion CD25⁺ до стимуляции митоген-активированными моноцитами не влияет на способность МСК ингибировать пролиферацию Т-клеток [61]. МСК также продуцируют костный морфогенный протеин-2, который вызывает иммуносупрессию посредством образования CD8⁺-регуляторных Т-клеток [72].

В присутствии стимуляторов образования Т-хелперов 1-го типа (Th1), таких как CD3, CD28, ИЛ-4, ИЛ-2 и ИЛ-12, наивные Т-клетки превращаются в клетки, секретирующие ИФН- γ . В присутствии МСК секреция ИФН- γ снижалась (см. рис. 2) [68]. МСК стимулируют Th2-дифференцировку. При добавлении в MLC МСК уменьшали лизис под действием CD8⁺-Т-клеток [3], а при добавлении МСК в цитотоксической фазе цитотоксический эффект не проявлялся [3, 60, 62, 69]. МСК могут ингибировать аллореактивный процесс и предотвращать образование цитотоксических Т-клеток, однако при активации цитотоксических Т-клеток они неэффективны.

Человеческие МСК подавляют развитие CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток благодаря растворимым факторам [3, 24, 63]. Факторы, оказывающие супрессорное действие (предполагается, что их несколько), вырабатываются МСК непостоянно, так как супернатанты культуры МСК не подавляют пролиферацию Т-клеток (см. рис. 2) [4, 53, 60, 73]. Пролиферация чистой культуры Т-клеток частично восстанавливается при добавлении антител против фактора роста гепатоцитов и трансформирующего ростового фактора β_1 (TGF β_1) [59, 62, 63]. Некоторые авторы считают, что основную роль играют ИФН- γ , ИЛ-10, фактор некроза опухоли (ФНО- α) и ИЛ-2 [22, 24, 53, 57, 60, 61]. J. Liu и соавт. [65] показали, что антитела, специфичные к FasL и TGF β_1 , ослабляют супрессивное действие МСК на стимулированные конканавалином А MLC, эффект был дозозависимым, антитела к ИЛ-10 эффекта не оказывали. МСК могут ингибировать пролиферацию Т-клеток путем продукции IDO. Образование IDO стимулируется ИФН- γ [74], IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин и ингибирует Т-клеточный ответ путем depletion триптофана [75]. ИФН- γ оказывает дозозависимый стимулирующий эффект на активность IDO. Добавление триптофана восстанавливает пролиферацию Т-клеток, предполагают, что активность IDO может действовать как эффекторный механизм ингибирования Т-клеток. Активация регуляторных Т-клеток может происходить под действием простагландина E₂ (PGE₂), который синтезируется с помощью фермента циклооксигеназы (ЦОГ) [76]. МСК постоянно вырабатывают ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [68, 77]. При совместном культивировании Т-клеток с МСК повышалась продукция ЦОГ-2 и PGE₂ [22, 68]. Ингиби-

торы синтеза PGE₂ сохраняли пролиферацию фитогемагглютин-активированных (ФГА) лимфоцитов при культивировании с МСК [68].

W.T. Tse и соавт. [22] исследовали аллореактивные лимфоциты и сравнили их с митоген-стимулированными культурами. Полученные результаты свидетельствовали о том, что продукция МСК ИЛ-10, TGF β , PGE₂ и depletion триптофана не играли роли в супрессии MLC.

В противоречивости результатов может быть несколько причин. W.T. Tse и соавт. [22] исследовали культуры неразделенных моноклеарных клеток-респондеров, в других исследованиях использовали чистую культуру Т-клеток. Ранее было показано, что результаты изменяются в зависимости от способа активации лимфоцитов [64]. При культивировании МСК с MLC в лимфоцитах повышались транскрипция и трансляция ИЛ-2 и растворимых рецепторов к ИЛ-2, после митогенной стимуляции лимфоцитов уровни экспрессии снижались. При добавлении МСК к культуре лимфоцитов в MLC повышалась секреция ИЛ-10, в ФГА-стимулированных культурах — не изменялась. Добавление индометацина, ингибирующего синтез PGE₂, частично восстанавливало ингибирующий эффект МСК на ФГА-стимулированные лимфоциты, но не MLC [64].

Степень проявления иммуномодулирующих свойств МСК вариабельна [22]. Противоречивость результатов может быть объяснена использованием различных культур лимфоцитов, различием условий и кинетики. Как было отмечено ранее, существуют видоспецифические различия. Могли изменяться дозы МСК. В некоторых работах соотношение МСК:лимфоциты было $\geq 1:1$ [53, 61, 63, 69, 78], в то время как в большинстве исследований клетки используют в соотношении 1:10 [3, 4, 22—24, 59, 63, 64, 69]. В исследованиях зависимости эффектов МСК от их количества было обнаружено, что большее число МСК оказывало иммуносупрессивный эффект, в то время как небольшое их количество иногда даже усиливало пролиферацию лимфоцитов [59, 65]. Как бы то ни было, соотношение МСК:лимфоциты 1:10 *in vitro* значительно отличается от физиологического, так как содержание МСК в костном мозге $< 1:10\,000$ моноклеарных клеток [79]. Таким образом, большее число МСК, необходимое для получения эффекта, является чрезмерным для экспериментов *in vivo* и терапевтического применения.

Влияние МСК на APC

МСК снижают активацию Т-клеток опосредованно через уменьшение образования DC из моноцитов [69]. Кроме того, МСК ингибируют дифференцировку и функционирование образуемых из моноцитов DC в трансвелл-системах [80]. После удаления МСК ингибирующий эффект не наблюдался [61]. МСК снижали позитивную регуляцию

CD1A, CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR и повышали регуляцию CD83 при созревании DC [61, 68, 69, 81]. Важно, что DC, выделенные из культур, культивируемых с МСК, имели более низкую способность активировать CD4⁺ в MLC [80].

Мезенхимальные стволовые клетки уменьшали секрецию ИФН- γ , ИЛ-12 и ФНО- α DC, при этом продукция супрессорного цитокина ИЛ-10 повышалась (см. рис. 2) [61, 64, 68, 80]. ФНО- α ингибирует созревание DC, их миграцию и способность стимулировать аллореактивные Т-клетки и, кроме того, может играть роль в индукции иммуносупрессивных эффектов МСК. Похожим образом мышинные стромальные клетки селезенки увеличивали образование ИЛ-10 и уменьшали образование ИФН- γ DC, демонстрируя тем самым, что МСК, дифференцированные в стромальные клетки, имеют аналогичные свойства [82]. CD14⁺-моноциты активируют секрецию МСК-растворимых факторов, включая ИЛ-1 β , который ингибирует аллореактивные Т-клетки [71]. Скорее всего влияние МСК на APC приводит к ингибированию активации Т-клеток.

Влияние МСК на NK-клетки

МСК уменьшают секрецию ИФН- γ NK-клетками, стимулированными ИЛ-2 (см. рис. 2) [68]. МСК не ингибируют лизис K562-клеток NK-клетками [3]. При соотношении МСК:лимфоциты 1:1 наблюдалось ингибирование цитотоксической функции CTL и NK-клеток, данные эффекты не сохранялись при соотношении 1:10 [69]. Таким образом, можно предположить, что только высокие дозы МСК могут уменьшить экспансию CD8⁺-Т- и NK-клеток. Однако столь высокие концентрации МСК не могут быть применены *in vivo*.

Влияние МСК на В-лимфоциты

МСК могут ингибировать пролиферацию лимфоцитов, индуцированную митогенами В-клеток, митогеном фитолакки и протеином *A Staphylococcus aureus* [59, 65, 73, 78, 83]. Тем не менее стимуляция лимфоцитов митогеном фитолакки зависит от Т-клеток, и протеин А стимулирует пролиферацию Т- и В-клеток [84]. В связи с этим нельзя разделить пролиферацию В- и Т-клеток. МСК ингибировали стимуляцию В-клеток благодаря растворимым факторам анти-CD40 и анти-ИЛ-4 [78, 83]. Пролиферация В-клеток останавливалась в фазе G₀/G₁ клеточного цикла, апоптоза при этом не наблюдалось. При добавлении МСК к активированной чистой культуре В-клеток в соотношении 1:1 снижались количество Ig-продуцирующих клеток и уровни IgM, IgG и IgA, при уменьшении числа МСК данные эффекты не наблюдались [77]. МСК не снижали продукцию ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-10. МСК снижали продукцию рецепторов CXCR4, CXCR5 и CCR7B к хемокинам, а также хемотаксис к CXCL12 CXCR4-лиганда, CXCR5-лиганда

к CXCL13; возможно, большее количество МСК может действовать на хемотаксические свойства В-клеток. При концентрации МСК в 10 раз ниже концентрации лимфоцитов происходила стимуляция В-клеток крови и селезенки, приводящая к продукции IgG в Elispot [70]. При разделении МСК и клеток селезенки при помощи полупроницаемой мембраны стимуляция продукции IgG определялась в нефракционированных клетках селезенки, но не в обогащенных В-клетках. Таким образом, активация В-клеток МСК может происходить под действием растворимых факторов, продуцируемых обкладочными клетками. МСК могут как ингибировать, так и стимулировать В-клетки в зависимости от дозы, источника для выделения МСК и тест-системы (см. рис. 2). Эти результаты могут противоречить потенциальному использованию МСК для лечения аутоиммунных заболеваний, при развитии которых основную роль играют В-клетки. Ингибирование В-клеток *in vitro* выявило при высоких дозах МСК, которые могут быть небезопасны для терапевтического использования. В меньших дозах МСК активировали В-клетки.

Иммуномодулирующие свойства МСК *in vivo* и их терапевтическое значение

Иммуномодулирующие эффекты МСК исследованы на различных животных моделях при аллореактивных иммунных (трансплантация органов и стволовых клеток), аутоиммунных процессах или противоопухолевом иммунитете. Одно из первых исследований *in vivo* показало, что инфузия аллогенных МСК, выделенных из костного мозга павиана, продлевала выживаемость аллогенных кожных трансплантатов до 11 дней в сравнении с 7 днями у животных, не получавших МСК [57]. Кроме того, было показано, что инфузия сингенных МСК хозяина приводила к снижению отторжения аллогенных трансплантатов стволовых клеток на мышинных моделях аллогенной трансплантации костного мозга [85], хотя иммунологические механизмы, лежащие в основе этих наблюдений, не были объяснены.

Один из наиболее ярких эффектов МСК наблюдается при лечении болезни «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК. Системное введение выращенных в культуре МСК, выделенных из жировой ткани, позволяло снизить летальность от РТПХ у мышей, которым проводилась ТГСК от гаплоидентичного донора [86]. Это исследование показало, что только ранняя инфузия МСК после трансплантации была эффективна для контроля РТПХ. Более того, предполагалось, что только повторные инфузии МСК могут приводить к уменьшению проявлений РТПХ и это может объяснить последние наблюдения, при которых однократное введение МСК одновременно с ТГСК не влияло на частоту развития и серьезность РТПХ у мышей [87].

В исследовании E. Zappia и соавт. [48] мышечные МСК уменьшали проявления экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита на модели человеческого рассеянного склероза путем индукции толерантности периферических Т-клеток против патогенных антигенов [88]. Инфузия МСК была эффективна только при введении в начале и в период разгара болезни (пика). С другой стороны, инфузия МСК была неэффективна при коллаген-индуцированном артрите (КИА) при работе на мышечных моделях ревматоидного артрита (РА) [89].

G.D. Wu и соавт. [90] показали, что при трансплантации сердца у крыс хоуминг МСК происходил в области отторжения трансплантата.

F. Djouad и соавт. [72] установили, что МСК предотвращают отторжение аллогенных опухолевых клеток у иммунокомпетентных мышей. При системном введении МСК или при введении подкожно одновременно с B16 клетками меланомы происходило формирование опухолей, в то время как клетки меланомы, вводимые без МСК, элиминировались иммунной системой хозяина. Кроме того, МСК оказывали защитное влияние на ткани на моделях ишемии/реперфузии крысиной почки, возможно, обусловленное секрецией растворимых иммуномодулирующих факторов [47]. Инфузия крысиных МСК на экспериментальных крысиных моделях гломерулонефрита приводила к ускорению восстановления гломерул, вероятно, связанному с высвобождением ростовых факторов [91]. В один ряд с этими исследованиями можно поставить работы, демонстрирующие, что приживление МСК происходит преимущественно в области повреждения или опухолевого роста [92].

Иммуносупрессивные свойства МСК представляют огромный интерес для трансплантации органов и ГСК для предотвращения отторжения трансплантата и РТПХ после трансплантации. Первые клинические исследования были выполнены с целью оценки безопасности инфузии МСК. Клинические исследования, проведенные на больных раком легкого [8], показали, что инфузия МСК была безопасной и приводила к быстрому восстановлению гемопоэза. В мультицентровом клиническом исследовании выращенные в культуре МСК, выделенные из костного мозга HLA-идентичных сиблингов, вводились одновременно с HLA-идентичными ГСК 46 пациентам, перенесшим аллогенную ТГСК после миелоаблативных режимов кондиционирования [93]. МСК вводились за 4 ч до инфузии ГСК, при этом побочных эффектов, связанных с инфузией, эктопического формирования ткани или повышения частоты возникновения или тяжести РТПХ не наблюдалось. Также не отмечено ускорения приживления ГСК или отсутствия признаков отторжения трансплантата.

В Европейском мультицентровом исследовании I—II фазы принимали участие 13 детей, пере-

несшие ТГСК от гаплоидентичного донора в сочетании с трансплантацией МСК, выделенных у того же донора [94]. Побочных эффектов сразу после введения МСК не выявлено. В то же время отторжение трансплантата в контрольной группе наблюдалось у 20% из 52 больных. У всех пациентов, получивших МСК, имело место приживление и ускоренное восстановление лейкоцитарного пула в периферической крови, при этом скорость восстановления числа тромбоцитов и нейтрофилов не отличалась от контрольной группы. Кроме того, потенциальные преимущества терапии МСК были продемонстрированы при описании клинических случаев. Результаты этих клинических случаев свидетельствуют не только о возможности использования МСК для профилактики развития РТПХ, но и о лечении РТПХ кишечника после ТГСК [1]. Были описаны случаи лечения острой и хронической РТПХ при помощи МСК. Побочных эффектов после введения МСК не наблюдалось. Из 40 пациентов с тяжелой острой РТПХ у 19 наблюдалось полное выздоровление, у 9 — улучшение состояния, у 7 — ответ на терапию отсутствовал, у 4 — имела место стабилизация заболевания, состояние 1 больного не было оценено из-за короткого периода наблюдения. Двадцать один пациент выжил с периодом наблюдения от 6 нед до 3,5 года после трансплантации. У 9 из них наблюдалась экстенсивная хроническая РТПХ [2]. В двух проспективных рандомизированных европейских исследованиях III фазы изучалось использование МСК для лечения и профилактики острой РТПХ после аллогенной ТГСК.

Механизмы, лежащие в основе иммуномодулирующих эффектов МСК *in vivo*, в настоящий момент активно обсуждаются. Выделить МСК из костного мозга реципиентов, получивших ТГСК, очень сложно. Это может быть связано с тем, что МСК мигрируют в другие ткани и органы, где оказывают иммуносупрессивное действие. Исследования на животных показали, что МСК мигрировали в лимфоидные органы [48] и приживление их происходило в участках повреждения тканей или опухолевого роста [92]. В нескольких работах было отмечено, что МСК после системного введения неспецифически мигрируют в капиллярное русло различных тканей и органов, преимущественно легких [36]. Интересно, что исследование на мышах показало, что экспансия МСК *ex vivo* значительно уменьшает их способность к хомингу и приживлению [95].

Влияние МСК на пролиферацию, апоптоз, чувствительность лейкоэмических клеток к ХТ

В ряде работ, упомянутых ранее, было продемонстрировано, что МСК оказывают антипролиферативное влияние на клетки иммунной системы. Однако, по мнению ряда авторов, антипролиферативные эффекты МСК этим не ограничиваются

и наблюдаются также при воздействии МСК на клетки других органов и тканей, включая гемопоэтические и негемопоэтические опухолевые линии клеток.

При сравнении пролиферации, чувствительности к ХТ и уровня экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1) в лейкоэмических клетках линии K562 до и после культивирования с МСК были получены следующие результаты: совместное культивирование с МСК и наличие прямых межклеточных контактов приводило к подавлению роста и пролиферации K562 (увеличивалось количество лейкоэмических клеток в фазе G₀/G₁, уменьшалось число клеток в фазе S), усилению резистентности к ХТ клеток K562 (количество клеток K562 в состоянии индуцированного дауномицином апоптоза в культуре с МСК было меньше, чем в суспензии K562). В то же время экспрессия гена MDR1 в культуре с МСК не изменялась [96]. Похожие результаты, свидетельствующие о подавлении пролиферации лейкоэмических клеток при совместном культивировании со стромальными клетками, описаны в работах 2009 г. Установлено, что МСК оказывают ингибирующее влияние на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 [97, 98]. Рассматривалась роль молекулы DKK-1 (dickkopf-1), секретируемой МСК и являющейся негативным регулятором WNT-сигнальных путей, в ингибировании пролиферации. При нейтрализации DKK-1, анти-DKK-1 антителами или при снижении экспрессии гена DKK-1 ингибирующий эффект МСК на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 уменьшался. Экспрессия DKK-1 МСК регулируется NANOG — транскрипционным фактором, вырабатываемым в некоторых стволовых клетках. Выявлено, что МСК могут ингибировать пролиферацию K562 в гуморальном микроокружении. Тот же эффект наблюдался в первичных лейкоэмических гемопоэтических предшественниках, выделенных у пациентов [97].

В исследовании 2002 г. было показано, что стромальные клетки предотвращают апоптоз миелобластных клеток за счет повышения экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в них. В клетках линий HL-60 и NB-4 при совместном культивировании со стромальными клетками линии MS-5 снижались уровни апоптоза, индуцируемого бессывороточной средой и цитозаром. Подобный эффект зафиксирован при культивировании лейкоэмических клеток в кондиционированной MS-5-клетками среде и частично сохранялся, когда лейкоэмические клетки были отделены от стромальных при помощи микропористой мембраны. Совместное культивирование повышало экспрессию гена Bcl-2 в лейкоэмических клетках. В 57 образцах при совместном культивировании возрастал также уровень экспрессии Bcl-X_L. В клетках пациентов, резистентных к индукционной терапии, при куль-

тивировании со стромальными клетками значительно повышалась экспрессия Bcl-2, однако в клетках больных, чувствительных к химиотерапии, столь значимого повышения не отмечалось [99]. Похожие результаты, свидетельствующие об уменьшении индуцированного даунорубицином (DNR) апоптоза лейкозных клеток U937, вероятно, за счет повышения в них экспрессии генов, связанных с апоптозом, в первую очередь Bcl-X_L, под действием МСК, были получены Y.M. Lin и соавт. [100] в 2006 г. Помимо снижения уровня индуцируемого DNR апоптоза, имело место снижение пролиферации U937 (человеческих клеток миеломоноцитарной лейкемии) под действием МСК, выделенных из костного мозга здоровых доноров: увеличивалось количество клеток в фазах G₀/G₁, число клеток в фазах G₂/M уменьшалось в сравнении с чистой культурой U937. Из 487 генов, связанных с апоптозом, при инкубации с МСК изменялась экспрессия 39. Среди 37 активированных генов наиболее активно экспрессировался ген Bcl-X_L. Экспрессия двух генов снижалась. Совместное культивирование с МСК не индуцировало образование MDR1 мРНК в клетках U937 [100].

В работе 2003 г. проводилось совместное культивирование лейкоэмических клеток линии HL-60 с HFCL (human bone marrow fibroblastoid stromal cell line — человеческие фибробластоподобные стромальные клетки). Клетки культивировали в трансвелл-системах и при непосредственном контакте культур без разделения. Исследование показало, что совместное культивирование с HFCL ингибирует пролиферацию HL-60 в сравнении с чистой культурой HL-60. При совместном культивировании с HFCL снижались митотический индекс культуры HL-60, экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) HL-60-клетками в сравнении с чистой культурой HL-60. Кроме того, процент клеток HL-60 в G₁-фазе при совместном культивировании с HFCL был выше, чем в культуре без HFCL, а доля клеток в S-фазе была ниже. Также установлено, что совместное культивирование с HFCL подавляет экспрессию VEGF в клетках HL-60 [101].

При изучении влияния линии HFCL на пролиферацию, дифференцировку и чувствительность к ХТ AML-клеток (линий U937, HL-60 и мультирезистентной культуры — MDR HL60/VCR) культивирование клеточных линий производилось аналогичным образом: при непосредственном контакте с клетками линии HFCL или при разделении при помощи трансвелл-системы. Продемонстрировано, что HFCL подавляют пролиферацию лейкозных клеток в сравнении чистой культурой AML-клеток (процент лейкоэмических клеток в фазе G₁ был выше при совместном культивировании с HFCL, нежели в чистой культуре, а доля клеток в S-фазе была ниже). Также было показано, что

HFCL могут индуцировать дифференцировку моноцитов при совместном культивировании: несколько увеличивалось число NBT-положительных клеток и повышалась экспрессия CD11b и CD14.

HFCL могут препятствовать ТРТ-индуцированному апоптозу HL-60- и HL-60/VCR-клеток за счет модуляции Bcl-2 и активированной каспазы 3-го типа. При терапии ТРТ HL-60- и HL-60/VCR-клетки имели морфологические признаки, характерные для апоптоза, увеличивались отношение G_0/G_1 HL-60-и HL-60/VCR-клеток и количество клеток в фазе sub- G_1 . Процент Annexin V-положительных клеток и апоптотических клеток увеличивался при экспрессии активированной каспазы-3 и снижении экспрессии Bcl-2. При культивировании с HFCL-клетками доля Annexin V-положительных и апоптотических клеток уменьшалась, а также сокращалось число клеток в фазе sub- G_1 . После культивирования с HFCL в трансвелл-системе экспрессия активированной каспазы-3 снижалась, а экспрессия Bcl-2 повышалась.

При культивировании с HFCL без разделения в течение 96 ч в HL-60-клетках возрастала экс-

прессия 582 генов и снижалась — 1323, по меньшей мере в 2 раза (данные получены при помощи Affymetrix GeneChip Human Genome U133 set A). Изменение экспрессии некоторых генов выявлено при помощи полимеразной цепной реакции в режиме обратного времени и northern blot [102].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что различные линии МСК могут оказывать антипролиферативное действие на лейкозные клетки, препятствовать апоптозу, индуцируемому химиопрепаратами и бессывороточной средой, повышать экспрессию антиапоптотических факторов, не изменяя экспрессии MDR1, что может приводить к снижению чувствительности лейкозных клеток к ХТ *in vitro*.

Как подобные эффекты будут проявляться *in vivo* и влиять на прогноз пациентов, получающих терапию МСК, остается неизвестным. Однако в последнее время появляются работы, свидетельствующие о том, что при котрансплантации МСК и ГСК увеличивается частота развития рецидивов лейкоза у пациентов со злокачественными заболеваниями крови [103].

Л и т е р а т у р а

1. Le Blanc K., Rasmuson I., Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439—41.
2. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579—86.
3. Rasmuson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003;76:1208—13.
4. Le Blanc K., Rasmuson I., Götherström C. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;60:307—15.
5. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585—92.
6. Cheng L., Qasba P., Vanguri P., Thiede M.A. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and proplatelet formation from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000;184:58—69.
7. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L. et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557—64.
8. Кос О.Н., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfection of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307—16.
9. Horowitz M.M., Gale R.P., Soudel P.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555—62.
10. Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куралесова А.И., Фролова Г.П. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга. *Цитология* 1968;5:557—67.
11. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71—74.
12. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143—7.
13. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247—56.
14. Caplan A.I., Bruder S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7:259—64.
15. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291—302.
16. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641—50.
17. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393—5.
18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315—7.
19. Chichester C.O., Fernandez M., Minguell J.J. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1993;1:93—9.
20. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57—66.
21. Majumdar M.K., Banks V., Peluso D.P., Morris E.A. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000;185:98—106.
22. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389—97.
23. Le Blanc K., Tammik L., Zetterberg E., Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890—6.

24. Klyushnenkova E., Mosca J.D., Zernetkina V. et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005;12:47–57.
25. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–42.
26. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first – trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396–402.
27. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., in't Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870–8.
28. De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A. et al. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–9.
29. Le Blanc K., Ringden O.K. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262(5):509–25.
30. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28:707–15.
31. Banfi A., Bianchi G., Notaro R. et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2002;8:901–10.
32. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113(7):1161–6.
33. Tremain N., Korkko J., Ibberson D. et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 2001;19:408–18.
34. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282–6.
35. Pochampally R.R., Neville B.T., Schwarz E.J. et al. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9282–5.
36. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169:12–20.
37. Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003;5:1028–38.
38. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999–3001.
39. Crevensten G., Walsh A.J., Ananthakrishnan D. et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004;32:430–4.
40. Arinzech T.L., Peter S.J., Archambault M.P. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85A:1927–35.
41. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfect. *Science* 2004;303:1198–201.
42. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93–8.
43. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464–74.
44. Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol* 2003;228:1–30.
45. Deng Y., Guo X., Yuan Q., Li S. Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1649–54.
46. Ortiz L.A., Gambelli F., McBride C. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8407–11.
47. Togel F., Hu Z., Weiss K. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:31–42.
48. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755–61.
49. Dexter T.M., Spooncer E., Schofield M. et al. Hematopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells* 1984;10:315–39.
50. Almeida-Porada G., Flake A.W., Glimp H.A., Zanjani E.D. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 1999;27:1569–75.
51. Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E. et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:413–20.
52. Anker P.S., Noort W.A., Kruisselbrink A.B. et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:881–9.
53. Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:597–604.
54. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкогенеза: Цикл лекций. М.: Династия, 2007.
55. Lee S.T., Jang J.H., Cheong J.W. et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002;118:1128–31.
56. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21(8):1733–8.
57. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42–8.
58. Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722–9.
59. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11–20.
60. Potian J.A., Aviv H., Ponzio N.M. et al. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003;171:3426–34.
61. Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214–9.
62. Angoulvant D., Clerc A., Benchalal S. et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to

- alloantigens. *Biorheology* 2004;41:469—76.
63. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838—43.
64. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005;305:33—41.
65. Liu J., Lu X.F., Wan L. et al. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc* 2004;36:3272—5.
66. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151—64.
67. Blazar B.R., Taylor P.A. Regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:46—9.
68. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815—22.
69. Maccario R., Podesta M., Moretta A. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516—25.
70. Rasmusson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007;65:336—43.
71. Groh M.E., Maitra B., Szekely E., Koc O.N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005;33:928—34.
72. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837—44.
73. Augello A., Tasso R., Negrini S.M. et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005;35:1482—90.
74. Meisel R., Zibert A., Laryea M. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619—21.
75. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191—3.
76. Akasaki Y., Liu G., Chung N.H. et al. Induction of a CD4⁺ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004;173:4352—9.
77. Arikawa T., Omura K., Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004;200:400—6.
78. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107:367—72.
79. Friedenstein A., Kuralesova A.I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 1971;12:99—108.
80. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120—6.
81. Zhang W., Ge W., Li C. et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:263—71.
82. Svensson M., Maroof A., Ato M., Kaye P.M. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 2004;21:805—16.
83. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821—7.
84. Ringden O., Rynnel-Dagö B. Activation of human B and T lymphocytes by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 1978;8:47—52.
85. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;108:2114—20.
86. Yanez R., Lamana M.L., Garcia-Castro J. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus-host disease (GVHD). *Stem Cells* 2006;24:2582—91.
87. Sudres M., Norol F., Trenado A. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2006;176:7761—7.
88. Zhang J., Li Y., Chen J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005;195:16—26.
89. Djouad F., Fritz V., Apparailly F. et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor α in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1595—603.
90. Wu G.D., Nolta J.A., Jin Y.S. et al. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 2003;75:679—85.
91. Kunter U., Rong S., Djuric Z. et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202—12.
92. Studeny M., Marini F.C., Champlin R.E. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- β delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603—8.
93. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389—98.
94. Ball L.M., Bernardo M.E., Locatelli F. et al. Cotransplantation of haploidentical bone marrow derived mesenchymal stem cells overcomes graft dysfunction and improves hematological and lymphocyte recovery in haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108: Abstract 3118.
95. Rombouts W.J., Ploemacher R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003;17:160—70.
96. Lin Y.M., Bu L.M., Yang S.J. et al. Influence of human mesenchymal stem cells on cell proliferation and chemosensitivity of K562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006;14(2):308—12.
97. Zhu Y., Sun Z., Han Q. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009;23(5):925—33.
98. Ding Y., Lu H., Lu S.F. et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009;17(1):137—40.
99. Konopleva M., Konoplev S., Hu W. et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16(9):1713—24.
100. Lin Y.M., Zhang G.Z., Leng Z.X. et al. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Med J (Engl)* 2006;119(11):905—10.
101. Liang R., Huang G.S., Chen X.Q. et al. Effects of human fibroblastoid stromal cell line on proliferation of HL-60 cells and expression of VEGF. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003;11(5):476—9.
102. Liang R., Huang G.S., Wang Z. et al. Effects of human bone marrow stromal cell line (HFCL) on the proliferation, differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cell lines U937, HL-60 and HL-60/VCR. *Int J Hematol* 2008;87(2):152—66.
103. Ning H., Yang F., Jiang M. et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008;22(3):593—9.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ И МОБИЛИЗОВАННОЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

**Р.Ш. Ибрагимов¹, Е.В. Райкина^{1,2}, Е.Ю. Осипова^{1,2},
Н.Н. Зимина³, О.А. Майорова¹, М.В. Яковлева², С.А. Румянцев^{1,2}**

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава;

²ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e_ossipova@mail.ru

Клеточный состав пуповинной крови (ПК) является быстропроходящим следствием родового стресса и напоминает клеточный состав периферической крови взрослых, полученной в результате мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), реализующим свое биологическое действие с помощью ряда вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния. В исследовании продемонстрирована сравнительная характеристика клеточного состава, в том числе субпопуляций лимфоцитов, CD34⁺- и CD133⁺-клеток, колониобразующей активности гемопоэтических клеток-предшественников, а также концентраций мобилизующих цитокинов (интерлейкин-8, матриксные металлопротеиназы 2 и 9) в ПК доношенных новорожденных и периферической крови после мобилизации при помощи Г-КСФ.

Соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством CD34⁺-клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя родовый стресс и позволяет объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

Ключевые слова: пуповинная кровь, мобилизация, CD34⁺-клетки, CD133⁺-клетки, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF HEALTHY NEWBORNS CORD BLOOD CELL COMPOSITION AND G-CSF-MOBILIZED BLOOD FROM HEALTHY DONORS

R.Sh. Ibragimov¹, E.V. Raikina^{1,2}, E.Yu. Osipova^{1,2}, N.N. Zimina¹, O.A. Maiorova¹, M.V. Yakovleva², S.A. Roumiantsev^{1,2}

¹Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow;

²Moscow Stem cells bank; ³Moscow Center of family planning and reproduction

Cord blood cell composition is a short-lasting delivery stress consequence and is similar on adult G-CSF-mobilized peripheral blood. G-CSF realizes biological effect by number of secondary messengers, many of which are also natural effectors of stress. In this research comparative characteristics of cell composition, including lymphocytes subpopulations, CD34⁺ and CD133⁺ cells, hematopoietic progenitor cells colony-forming activity and mobilizing cytokines concentration (IL-8, MMP-2, MMP-9), between term newborns cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood is shown.

Mobilized cytokines concentration ratio in combination with CD34⁺ cells count in cord blood and mobilized peripheral blood suggests that delivery stress possibly is not single cause of cord blood features.

Key words: cord blood, mobilization, CD34⁺ cells, CD133⁺ cells, granulocyte colony stimulated factor

Известно, что пуповинная кровь (ПК) не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенности ее клеточного состава являются быстропроходящими последствиями родового стресса, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью [1]. С учетом того, что состав мобилизованной при помощи препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) крови в значи-

тельной степени отличается от физиологического состояния, что обусловлено действием вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния, представляется интересным сравнить клеточный состав ПК с кровью доноров после применения препаратов Г-КСФ.

Ранее было показано, что экспрессия рецептора к Г-КСФ (CD114), через который реализуется эф-

фект Г-КСФ на клетку, на поверхности CD34⁺-клеток довольно незначительна и составляет 4—5% [2—5]. Такой уровень экспрессии рецептора к Г-КСФ дает основания предполагать, что Г-КСФ не оказывает непосредственного влияния на CD34⁺-клетки, а действие его опосредовано другими клетками, несущими на поверхности CD114. Гранулоциты и, в меньшей степени, моноциты имеют большое число рецепторов к Г-КСФ и, вероятно, являются основными мишенями для реализации биологического действия Г-КСФ в организме. Динамика количества клеток в результате использования Г-КСФ демонстрирует нарастание доли CD15⁺CD114⁺-клеток и уменьшение — CD14⁺CD114⁺-клеток за счет более интенсивного роста гранулоцитов в ответ на Г-КСФ во всех исследованных группах [2, 3].

Установлено, что повышение числа CD34⁺-клеток в периферической крови может быть результатом действия других цитокинов [6—14]. В последнее время появились данные о мобилизации CD34⁺-клеток под действием интерлейкина-8 (ИЛ-8). Так, в исследовании J.F. Pruijt и соавт. [15] на макаках-резусах, показано, что ИЛ-8 стимулирует быстрое нарастание уровня фермента матрикс-металлопротеиназы-9 (ММП-9) параллельно со значительным повышением числа CD34⁺-клеток в периферической крови. В исследовании T. Watanabe и соавт. [15] выявлено, что при мобилизации CD34⁺-клеток при помощи Г-КСФ в сыворотке крови происходит 20-кратное повышение уровня ИЛ-8 при отсутствии изменений в концентрации других исследованных цитокинов (макрофагальный воспалительный белок-1α — МВБ-1α, фактор некроза опухоли-α — ФНО-α, интерферон-γ — ИФН-γ) [15].

Эти данные позволяют предположить, что в ответ на связывание Г-КСФ с рецептором зрелые гранулоциты индуцируют секрецию ИЛ-8, который, в свою очередь, вызывает повышение в крови уровня ММП-9, разрушающей молекулы адгезии, фиксирующие CD34⁺-клетки к строме костного мозга, и приводящей таким образом к выходу CD34⁺-клеток в периферическую кровь.

Таким образом, Г-КСФ, вероятно, не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), поскольку реализует свой эффект мобилизации CD34⁺-клеток через клетки-мишени, имеющие рецепторы к Г-КСФ, которыми являются нейтрофильные гранулоциты и, возможно, моноциты [9—11, 16]. Эти клетки после получения сигнала от Г-КСФ инициируют выработку вторичных посредников, которыми могут быть другие цитокины (ИЛ-8, ИЛ-3, гранулоцитарно-макрофагальный КСФ — ГМ-КСФ, SDF-1 — stromal cell-derived factor-1, фактор, продуцируемый стромальными клетками-1) или ферменты (коллагеназы), разрушающие связь CD34⁺-клеток со стромальными элементами костного мозга и усиливающие миграцию CD34⁺-клеток в периферическую кровь [2, 11].

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ПК 1013 доношенных новорожденных, родившихся на 37—41-й (медиана — 40) неделе гестации в ЦПСИР ДЗ и Родильном доме №10 Управления здравоохранения ЮЗАО Москвы в период с 2005 по 2008 г.

Материал мобилизации CD34⁺-клеток крови и кровь 23 здоровых доноров ГСК, которые получали препараты Г-КСФ с целью мобилизации CD34⁺-клеток в периферическую кровь для сбора и последующей аллогенной трансплантации в ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава в период с 2000 по 2008 г.

Получение ПК. ПК получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37—41-я неделя гестации, медиана — 40) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережата и пересечения пуповины производили пункцию ее сосудов специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA. Сбор крови осуществляли в течение 2—15 мин после родов [< 5 мин — 849 (84,4%) случаев, 5—10 мин — 90 (8,7%) и > 10 мин — 69 (6,9%)] до отделения плаценты ($n=998$, 98,5%). При сборе крови после отделения плаценты ($n=15$, 1,5%) плацента помещалась в специальную стерильную стойку и проводилась аналогичная процедура сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 ч после процедуры сбора ПК.

Определение клеточного состава ПК. Подсчет клеток крови осуществляли следующими методами:

— все 1013 образцов пуповинной крови были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови ABX Pentra 60 C+ в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов по объему, двумерную диаграмму, отражающую плотность популяции лейкоцитов и ее состав, а также дифференцировку лейкоцитов по 5 параметрам — лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, выявление атипичных лимфоцитов (ALY), больших незрелых клеток (LIC) и нормобластов (NRBC);

— для определения точной морфологической характеристики клеток ПК использовали мазки, окрашенные по методу Паппенгейма — Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая — Грюнвальда и краской Романовского). Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоцитарная формула) проводился при использовании иммерсионных объективов ($\times 40$ и 100). При подсчете лейкоцитарной формулы анализировали не менее 200 клеток;

— число нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100 лейкоцитов).

Определение числа субпопуляций лейкоцитов и ГСК. Количество субпопуляций лейкоцитов и ГСК вычисляли по экспрессии мембранных маркеров (CD — clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, 4, 8, 13, 14, 16, 19, 25, 30, 31, 33, 34, 38, 44, 45, 56, 61, 62L, 62E, 71, 90, 106, 117, 133, HLA-DR при помощи метода проточной цитометрии на приборе FACSCalibur («Becton Dickinson», США).

Определение колониеобразующей активности. Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции ПК определяли двумя методами.

1. Культивирование в течение 14 сут в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста MethoCult 4338, «Stem Cell Technologies», Canada) с подсчетом числа колониеобразующих единиц (КОЕ): смешанных — КОЕ-mix; гранулоцитарно-макрофагальных — КОЕ-ГМ; гранулоцитарных — КОЕ-Г; моноцитарных — КОЕ-М; эритроцитарных — КОЕ-Э. Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на 1×10^5 эксплантированных клеток. Для вычисления абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл ПК полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

2. Культивирование в полутвердой среде в системе агаровая капля — жидкая среда в течение 7 сут с расчетом следующих показателей:

— колониеобразующая (КОС) и кластерообразующая (КЛОС) способность — число колоний (малые 20—40, средние — 41—100 и большие — > 100 клеток) и кластеров (малые — 5—9, большие — 10—19) на 1×10^5 эксплантированных клеток;

— ЭК — общее число колоний и кластеров на 1×10^5 эксплантированных клеток;

— для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл крови или костного мозга полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови и на число миелокарицитов в 1 мл костного мозга;

— пролиферативный потенциал (ПП) — отношение числа колоний к кластерам в культуре.

Определение уровней спонтанного апоптоза и некроза клеток. Устанавливали уровни некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов пуповинной крови. Иссле-

дование проводили при помощи метода проточной цитофлюориметрии двумя способами: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidium iodid (PI) и числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием Annexin V FITC («Phar Mingen») согласно инструкциям производителей.

Результаты реакции анализировали на проточном цитофлюориметре FACScan («Becton Dickinson», США). Обработку полученных данных осуществляли при помощи программы WinMDI 2.8 for Windows. Уровни спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов клеток ПК определяли как сумму PI⁺/Annexin V⁺ и PI⁺/Annexin V⁺-клеток, а уровень некроза — как количество PI⁺/Annexin V⁺-клеток.

Мобилизация ГСК в периферическую кровь. Для мобилизации CD34⁺-клеток у здоровых доноров препараты Г-КСФ вводили в дозе 5—10 мкг/кг/сут в течение 5 дней. На 5-й день от начала стимуляции проводили 1-й сеанс цитафереза.

Получение CD34⁺-клеток периферической крови. Периферические CD34⁺-клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе Baxter CS-3000 Plus. Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Сепарации всегда подвергали постоянный объем

Таблица 1. Клеточный состав Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК ($\times 10^9/\text{л}$)

Показатель	ПК (n=1013)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=23)	p
Лейкоциты	17,24 $\pm$ 0,16	32,8 $\pm$ 2,2	<0,0001
Нейтрофилы	8,41 $\pm$ 0,1	27,6 $\pm$ 2	<0,0001
Лимфоциты	5,54 $\pm$ 0,06	2,9 $\pm$ 0,4	<0,0001
Моноциты	2,42 $\pm$ 0,03	2,2 $\pm$ 0,4	0,28
Эозинофилы	0,64 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,21	<0,0001
Базофилы	0,23 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,04	0,37

Таблица 2. Содержание субпопуляций лимфоцитов в Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=62)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
Доля (%) от лимфоцитов:			
CD3 ⁺	56,03 $\pm$ 1,67	67,8 $\pm$ 3,04	0,002
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,44 $\pm$ 1,4	48,76 $\pm$ 2,76	0,004
CD3 ⁺ CD8 ⁺	15,65 $\pm$ 0,81	19,27 $\pm$ 2,07	0,065
CD19 ⁺	14,61 $\pm$ 0,62	17,87 $\pm$ 3,33	0,115
CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,85 $\pm$ 1,83	8,62 $\pm$ 0,96	0,169
Абсолютное число ($\times 10^6/\text{мл}$):			
CD3 ⁺	2,07 $\pm$ 0,15	2,94 $\pm$ 0,08	0,002
CD19 ⁺	0,55 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,05	0,928
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1,44 $\pm$ 0,1	1,89 $\pm$ 0,07	0,016
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,68 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,08	0,453
CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,76 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,05	0,048

периферической крови (7000 мл), поэтому в зависимости от массы тела за 1 сеанс через гемосепаратор проходило >1 объема циркулирующей крови (ОЦК) донора. Объем ОЦК донора определяли по таблицам в зависимости от массы тела и возраста.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для количественного определения концентрации Г-КСФ, ИЛ-8, ММП-9, ММП-2, тканевых ингибиторов металлопротеиназы (TIMP) 1 и 2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА сэндвич-типа. Принцип этой реакции следующий: антигены исследуемых сывороток реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антителами. После удаления избытка смеси в реакцию вводятся меченные ферментом антитела, которые связываются уже иммобилизованным антигеном. В данном случае ферментативная активность находится в прямо пропорциональной зависимости с количеством антигена в исследуемой сыворотке.

В качестве ферментных меток использовали пероксидазу. При действии фермента на хромоген образуется окрашенный продукт, о содержании которого можно судить по оптической плотности фотометрируемого раствора.

Таблица 3. Количество CD34⁺-клеток в Г-КСФ мобилизованной крови и ПК

Число CD34 ⁺ -клеток	%	CD34	мм ³
В ПК доношенных новорожденных: количество наблюдений среднее значение	618 0,827±0,023		618 100±3
В Г-КСФ-мобилизованной периферической крови здоровых доноров: количество наблюдений среднее значение <i>p</i>	23 0,24±0,09 <0,0001		23 44±10 <0,0001

Таблица 4. Число субпопуляций CD34⁺- и CD133⁺-клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=47)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	<i>p</i>
Доля (%) от лимфоцитов:			
CD34 ⁺ CD133 ⁺	0,46±0,05	0,09±0,036	<0,0001
CD34 ⁺ CD133 ⁻	0,31±0,02	0,12±0,031	<0,0001
CD34 ⁺ CD38 ⁻	0,77±0,09	0,19±0,042	<0,0001
CD34 ⁺ CD71 ⁺	0,96±0,1	0,22±0,065	<0,0001
CD34 ⁺ CD62L ⁺	0,59±0,06	0,15±0,045	<0,0001
CD34 ⁺ CD44 ⁺	0,82±0,07	0,26±0,068	<0,0001
CD34 ⁺ CD117 ⁺	0,49±0,05	0,16±0,026	<0,0001
CD34 ⁺ CD61 ⁺	0,45±0,058	0,16±0,053	0,356
CD34 ⁺ CD38 ⁺	0,77±0,086	0,31±0,086	0,006
CD133 ⁺ CD106 ⁺	0,48±0,07	0,1±0,042	0,004
CD133 ⁺ CD31 ⁺	0,88±0,11	0,7±0,24	0,45
Абсолютное число/мкл			
CD34 ⁺ CD133 ⁺	59±7	3±0,9	<0,0001
CD34 ⁺ CD61 ⁺	58±8	5±1,1	<0,0001
CD34 ⁺ CD38 ⁺	103±16	9±1	0,002
CD34 ⁺ CD71 ⁺	131±20	6±0,9	<0,0001
CD133 ⁺ CD106 ⁺	58±8	3±0,9	<0,0001
CD133 ⁺ CD31 ⁺	116±17	20±2	0,002

В настоящем исследовании использовали следующие наборы реагентов: Human MMP-9 (total), Human/mouse MMP-2(total), Human TIMP-2 (Quantikine®, «R&D Systems Inc.», США), Human TIMP-1 («Biosource International Inc.», США), Human ИЛ-8 ELISA Kit II (BD OptEIA™, «BD Biosciences Pharmingen», США). К каждому набору прилагалась собственная инструкция для выполнения эксперимента.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с применением однофакторного дисперсионного анализа и оценок по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена — Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением — с помощью критерия Крускала — Уоллеса и Манна — Уитни. Для оценки равенства долей использовали Z-тест. Корреляционный анализ осуществляли с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена — для рядов с непараметрическим распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Результаты и обсуждение

Сравнение клеточного состава ПК и крови доноров показало, что Г-КСФ мобилизованная периферическая кровь содержит статистически значимо большее число лейкоцитов за счет статистически значимого большего количества нейтрофилов (табл. 1), в то время как число эозинофилов и базофилов не различается, а количество лимфоцитов, напротив, больше в ПК.

Мобилизованная при помощи Г-КСФ периферическая кровь содержит больше CD3⁺-лимфоцитов и меньше CD16⁺CD56⁺ (NK) -клеток (табл. 2).

Если рассматривать ПК с точки зрения идентичного механизма мобилизации при помощи того же набора цитокинов, концентрация которых в ПК повышается в ответ на родовой стресс, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль, что терапевтическая концентрация Г-КСФ в периферической крови выше, чем в ПК, и, соответственно, выше уровень остальных цитокинов, участвующих в процессе мобилизации. Тем не менее число CD34⁺-клеток в Г-КСФ-мобилизованной

крови статистически значимо ниже, чем в ПК (табл. 3) за счет всех исследованных субпопуляций (табл. 4), что дает возможность предположить, что аналог мобилизации в процессе родового стресса является не единственной причиной повышенного количества CD34⁺-клеток в ПК. Это предположение отчасти подтверждается тем, что эффективность клонирования Г-КСФ мобилизованной периферической крови также ниже, чем таковая в ПК, а ГСК в основном представлены гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками (табл. 5).

Уровни спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК статистически значимо не различались, но имели, однако, тенденцию к значительному снижению в Г-КСФ-мобилизованной крови (табл. 6). Этот факт может быть связан с тем, что ПК перед началом тестирования проходила определенные технологические этапы сбора и транспортировки в Банк стволовых клеток, тогда как периферическую кровь у доноров тестировали сразу после сбора, а Г-КСФ, известный как мощный анти-апоптотический фактор [17–19], приводит к выбросу в циркуляцию наиболее жизнеспособных клеток. При этом уровень спонтанного апоптоза CD34⁺-клеток, подавляющая часть которых (96,6±1,2%) находится в G₀-фазе клеточного цикла, был наиболее низким и не различался (табл. 6).

При сравнении уровней Г-КСФ в периферической крови и ПК оказалось, что в ПК показатель Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальное значение сыровоточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг/сут в течение 5 сут содержание сыровоточного Г-КСФ в крови у доноров возрастает приблизительно в 1000 раз. Таким образом, уровень Г-КСФ в сыровотке ПК доношенных новорожденных не отличается от нормального уровня Г-КСФ в сыровотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении числа лейкоцитов и CD34⁺-клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой стресс,

позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ-индуцированной мобилизации лейкоцитов и CD34⁺-клеток. При изучении содержания ИЛ-8 в сыровотке ПК и Г-КСФ-мобилизованной периферической крови показано, что статистически значимое повышение концентрации ИЛ-8 после применения Г-КСФ имело место на всех клинических моделях независимо от степени угнетения кроветворения. При этом концентрация ИЛ-8 в сыровотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 7).

Концентрация ММП-9 в сыровотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как содержание ММП-9 в сыровотке ПК не отличалось

Таблица 5. Эффективность клонирования Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=226)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
ЭК (×10 ⁵ эксплантированных мононуклеарных клеток):			
всего	116,8±4,47	19,2±3,6	<0,0001
КОЕ-ГЕММ*	41,95±2,2	1,3±0,6	<0,0001
КОЕ-ГМ	23,22±1,38	7,1±1,2	0,003
КОЕ-Г	20,44±1,04	4,6±0,6	<0,0001
КОЕ-М	15,93±1,14	3,8±0,6	0,007
КОЕ-Э	15,28±1,26	2±0,5	0,007
Число клеток-предшественников в 1 мл:			
всего	5490,2±419,3	478,6±112	0,002
КОЕ-ГЕММ	1789±121,9	38±6	<0,0001
КОЕ-ГМ	1144±117,1	181±24	0,036
КОЕ-Г	988,8±101,9	114±21	0,028
КОЕ-М	875,7±136	94±18	0,141
КОЕ-Э	692,8±76,4	46±11	0,03
Соотношение клеток-предшественников:			
КОЕ-ГЕММ	35,33±1,35	7,9±1,2	<0,0001
КОЕ-ГМ	19,28±0,75	37,8±4,7	<0,0001
КОЕ-Г	18,72±0,77	24,5±3,8	0,067
КОЕ-М	13,69±0,87	20,2±3,7	0,065
КОЕ-Э	12,99±0,88	10,6±2,9	0,495

*КОЕ-ГЕММ — колониеобразующая единица гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарная.

Таблица 6. Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Уровень апоптоз, %	ПК (n=440)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
Лейкоциты	9,18±1,19	3,4±0,6	0,387
Лимфоциты	4,32±0,7	3,6±0,15	0,855
Моноциты	15,35±2,02	3,8±0,72	0,309
Гранулоциты	28,22±2,51	2,51±0,67	0,069
CD34 ⁺ -клетки	2,12±0,09	2,74±0,56	0,229

Таблица 7. Концентрация ИЛ-8 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Группа	Число пациентов, абс.	Концентрация ИЛ-8 в сыворотке до применения Г-КСФ	Концентрация ИЛ-8 в сыворотке после применения Г-КСФ	<i>p</i>
Здоровые доноры	6	6,07±0,39	47±6,18	0,022
Дети с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15±44,72	569±159	0,013
Больные медикаментозной цитопенией	21	485±158	1113±250	0,040
ПК	45	19,83±4,93		0,039*

*Здесь и в табл. 8 *p* — сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Таблица 8. Концентрация ММП-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Группа	Число пациентов, абс.	Концентрация ММП-9 в сыворотке до применения Г-КСФ	Концентрация ММП-9 в сыворотке после применения Г-КСФ	<i>p</i>
Здоровые доноры	6	225,4±33,6	3333,8±608,2	<0,0001
Дети с онкогематологическими заболеваниями	5	175±79,7	819,4±254,7	0,043
Больные медикаментозной цитопенией	10	24,2±7,7	826,5±180,3	<0,0001
ПК	45	182,4±23,7		0,521*

от такового в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 8).

Такое соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с числом CD34⁺-клеток в результате мобилизации и в ПК дает возможность

предположить, что хотя наличие родового стресса и позволяет объяснить многие тенденции в изменении клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

Л и т е р а т у р а

- Bailie K.E., Irvine A.E., Bridges J.M., McClure B.G. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res* 1994;35(2):164–8.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Механизм мобилизующего действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на клетки крови у детей. *Вопр практ педиатр* 2007;(3):23–9.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Экспрессия рецепторов к Г-КСФ и ИЛ; на клетках крови в динамике терапии Г-КСФ. *Клет трансплантол ткан инженер* 2007;(2):61–3.
- Shimoda K., Okamura S., Harada N. et al. High-frequency granuloid colony-forming ability of G-CSF receptor possessing CD 34 antigen positive human umbilical cord blood hematopoietic progenitors. *Exp Hematology* 1992;23:226–8.
- Shinjo K., Takeshita A., Ohnishi K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at a various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymph* 1997;25:37–46.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Концентрация ИЛ-8 и матрикс-металлопротеиназ в сыворотке крови в динамике терапии Г-КСФ. *Клет трансплантол ткан инженер* 2007;(2):43–5.
- Chakrabarti S., Patel K.D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leuk Biol* 2005;78:279–88.
- Domanovic D., Wozniak G., Cernelc P. et al. Matrix metalloproteinase-9 and cell kinetics during the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis. *Transfus Apheres Sci* 2005;33:37–45.
- Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 2005;175:2647–54.
- Jilma B., Hergovich N., Homoncik M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD 114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol* 2000;111:314–20.
- Pruitt J.F., Fibbe W.E., Opdenakker G. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10863–8.
- Robinson S.N., Pisarev V.M., Chavez J.M. et al. Use of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or FLT-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells* 2003;21:417–27.
- Robinson S.N., Seina S.M., Gohr J.C. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cell Develop* 2005;14:317–28.
- Thomas D.B., Yoffey J.M. Human fetal haemopoiesis. I. The cellular composition of fetal blood. *Br J Haematol* 1962;8:290–5.
- Watanabe T., Kawano Y., Kanamaru S. et al. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood* 1999;93(4):1157–63.
- Roberts A.W., Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood* 1995;86:1600.
- Philpott N.J., Prue R.L., Marsh J.C. et al. G-CSF-mobilized CD34 peripheral blood stem cells are significantly less apoptotic than unstimulated peripheral blood CD34 cells: role of G-CSF as survival factor. *Br J Haematol* 1997;97(1):146–52.
- Maiani N.A., Mul F.P., van Buul J.D. et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 2002;99(2):672–9.
- Maiani N.A., Roos D., Kuijpers T.W. Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 2004;172(11):7024–30.

МЕТОДОЛОГИЯ РАБОТЫ ДЕТСКОГО ПОПУЛЯЦИОННОГО КАНЦЕР-РЕГИСТРА

Д.Ю. Качанов^{1,2}, Р.Т. Абдуллаев^{1,2}, К.В. Добренков¹, С.Р. Варфоломеева^{1,2}

¹ФГУ Научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва;

²Московский областной онкологический диспансер, Балашиха

Контакты: Денис Юрьевич Качанов totti111@list.ru

Злокачественные новообразования (ЗН) являются одним из наиболее тяжелых заболеваний детского возраста. Разработка эффективных мероприятий противоопухолевого контроля невозможна без существования четкой системы мониторинга ЗН в детском возрасте. Популяционные канцер-регистры — основной элемент системы мониторинга, позволяющий оценивать заболеваемость, распространенность ЗН и результаты терапии на популяционном уровне. В статье представлены международные рекомендации по регистрации случаев ЗН у детей и анализ полученных данных.

Ключевые слова: дети, злокачественные новообразования, популяционные канцер-регистры

METHODOLOGY OF WORK OF CHILDHOOD POPULATION-BASED CANCER REGISTRY

D.Y. Kachanov^{1,2}, R.T. Abdullaev^{1,2}, K.V. Dobrenkov¹, S.R. Varfolomeeva^{1,2}

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

²Moscow Regional Oncological Hospital, Balashiha

Cancer represents one of the most devastating diseases in children. Development of effective cancer control actions is impossible without existence of accurate system of childhood cancer monitoring. Population-based cancer registries are the backbone of this system allowing estimating incidence, prevalence of childhood cancer and survival at the population level. In present article the international recommendations for population-based cancer registers on data collection and analysis are described.

Key words: children, childhood cancer, population-based cancer registries

Злокачественные новообразования (ЗН) остаются одним из наиболее тяжелых заболеваний детского возраста. Несмотря на относительно редкую встречаемость, ЗН, тем не менее, в развитых странах занимают 2-е место в структуре смертности детей старше года, уступая только травмам и несчастным случаям [1]. Кроме того, у лиц, излеченных от ЗН в детском возрасте, выявляется целый спектр отдаленных последствий терапии, включающих специфическую органную токсичность, нарушения интеллекта, роста, развития, репродуктивной функции [2]. В настоящее время очевидно, что проведение мероприятий, направленных на снижение заболеваемости и смертности от ЗН, улучшение качества жизни онкологических больных невозможно без адекватного учета и регистрации данной группы пациентов. Один из ведущих специалистов в области эпидемиологии ЗН С.С. Муиг подчеркивал, что канцер-регистры являются необходимым звеном любой рациональной программы по контролю за ЗН [3].

Под регистрацией случаев заболевания ЗН понимают постоянный и систематический сбор данных о частоте встречаемости ЗН и их характеристиках с целью обеспечения контроля за ЗН. Выделяют 2 вида регистров: популяционные и больничные (госпитальные) [4]. Госпитальные регистры соби-

рают информацию обо всех больных, поступивших в данное лечебное учреждение, независимо от места их проживания. Основной целью создания госпитальных регистров является оценка клинической и медико-экономической эффективности различных видов медицинской помощи, оказываемой больным, и получение статистических данных о поступивших в стационар пациентах. К недостаткам данной системы учета относятся селекция пациентов в одном лечебном учреждении и невозможность перенести полученные данные на всю популяцию онкологических больных.

Напротив, популяционные канцер-регистры накапливают информацию обо всех случаях заболевания, развившихся в определенной популяции людей, чаще всего проживающих в одном регионе [4]. Основными задачами популяционных канцер-регистров являются оценка распространенности ЗН в популяции, изучение их влияния на общественное здоровье и проведение эпидемиологических исследований. Популяционные регистры лишены многих недостатков, присущих госпитальным. Они, как правило, включают большее число случаев заболевания, используют в своей работе различные источники информации, лишены проблемы селекции больных и имеют полные данные об исходах заболе-

вания (при наличии доступа к свидетельствам о смерти). Основные различия госпитальных и популяционных регистров отражены в табл. 1.

Главной целью популяционных канцер-регистров (далее — канцер-регистры) является изучение показателя заболеваемости ЗН в популяции. Однако с момента создания первых регистров в 40–50-х годах XX в. их роль претерпела существенные изменения от представления только дескриптивных эпидемиологических данных до использования полученной информации в оценке выживаемости, эффективности различных программ профилактики, скрининга и ранней диагностики ЗН, объема и качества оказания медицинской помощи [5, 6].

Минимальный необходимый набор данных о случае заболевания содержит информацию, позволяющую идентифицировать пациента и сведения о ЗН [6, 7] (табл. 2). При этом следует особо отметить, что акцент делается не на количестве, а на качестве собираемой информации. Некоторые наи-

более успешные и хорошо функционирующие канцер-регистры собирают достаточно ограниченный объем информации.

Применительно к регистрации ЗН у детей важным пунктом является указание латеральности (стороны поражения) опухолевым процессом (для нефро- и ретинобластомы, ЗН костей и др.) [8].

Возможности канцер-регистра проводить анализ полученных данных напрямую зависят от объема включенной в него информации о каждом конкретном случае заболевания и, следовательно, от источников информации для получения данных.

Популяционные канцер-регистры должны стараться использовать максимальное больше число источников информации о случаях заболевания ЗН, что позволяет добиться наиболее полного учета всех случаев заболевания [6]. На практике основными источниками информации являются выписки из историй болезни стационаров и заключения патологоанатомических и цитологических лабора-

торий. Важным источником информации служат также свидетельства о смерти с указанием ЗН как основной или сопутствующей причины смерти [9]. Критическим моментом в работе канцер-регистра является обработка нескольких извещений об одном случае заболевания для исключения повторного внесения его в базу данных. Канцер-регистры позволяют регистрировать несколько ЗН у одного больного, и это происходит вне зависимости от характера развития ЗН (первично-множественная, вторая/вторичная опухоль). Правила кодирования множественных ЗН описаны ниже. Во многих зарубежных странах введены индивидуальные идентификационные номера для граждан, что существенно облегчает процесс обработки информации, полученной из различных источников. В странах, где персонифицированные коды не используются, для исключения повторного внесения больного сравнивают паспортные данные пациента и адрес проживания.

Тенденцией последнего времени является расширение баз данных канцер-регистров за счет внесения в них дополнительной клинической информации, что в дальнейшем позволяет проводить более детальный

Таблица 1. Основные характеристики госпитальных и популяционных канцер-регистров

Характеристики	Регистр	
	госпитальный	популяционный
Пациенты	Селекция	Селекции нет
Число случаев	Небольшое	Большое
Источники информации	Немного, гомогенные	Много, гетерогенные
Объем собираемой информации	Большой	Небольшой
Катамнез	Часто неполный	Часто полный
Цели	Оценка качества оказания помощи, результаты терапии	Популяционный мониторинг, эпидемиологические исследования

Таблица 2. Минимальный набор данных о случае заболевания ЗН [6]

Данные	Описание
Необходимые	Персональная идентификационная информация (имя и/или персональный идентификационный номер) Пол Дата рождения и/или возраст Адрес проживания Национальность (если популяция состоит из 2 национальностей и более) Дата заболевания Основание для постановки диагноза (по меньшей мере разграничение случаев с микроскопической верификацией и без таковой) Топография (локализация) первичной опухоли Морфология опухоли (гистология) Биологическое поведение опухоли (доброкачественная, неопределенная, <i>in situ</i> или злокачественная) Источник информации
Рекомендуемые	Дата последнего контакта Статус на момент последнего контакта (по меньшей мере жив или умер) Стадия или распространение опухоли на момент постановки диагноза Инициальное лечение

анализ качества оказания медицинской помощи не на госпитальном, а на популяционном уровне [10]. В ряде стран это достигается путем взаимодействия канцер-регистров с центрами проведения клинических исследований, позволяющих оптимизировать терапию ЗН (clinical trial for therapy optimization — TOS), которые собирают подробную информацию о больных [11].

В связи с этим интересным представляется опыт работы Немецкого детского канцер-регистра (German Childhood Cancer Registry — GCCR) [11, 12]. GCCR сотрудничает со всеми 26 центрами клинических исследований, проводимых в Германии на сегодняшний день, и всеми онкологическими клиниками, оказывающими помощь детям со ЗН. Разработана четкая схема передачи информации между онкологическими клиниками, центрами клинических исследований и канцер-регистром на всех этапах оказания специализированной помощи, с момента постановки диагноза до длительного наблюдения за больным после окончания специального лечения [11, 13]. Это позволяет получать точные и подробные данные о каждом случае заболевания в течение короткого периода времени.

Качество работы канцер-регистра напрямую определяет точность представляемых им данных. Критериями, характеризующими качество функционирования регистра, служат стандартизация кодирования и обработки данных (сопоставимость с другими канцер-регистрами), полнота учета случаев заболевания, точность и своевременность получаемой информации [14, 15].

Критическим моментом функционирования любого канцер-регистра является сопоставимость получаемой информации с данными канцер-регистров других регионов и стран. Сопоставимость собираемой и обрабатываемой информации достигается путем стандартизации работы регистра. Под этим подразумевается использование единых правил определения даты заболевания, единых классификационных схем и принципов кодирования [14].

ЗН у детей по сравнению со взрослой популяцией относительно редки. Показатель заболеваемости детей ЗН в возрасте 0—14 лет в развитых странах варьирует от 12 до 15 на 100 тыс. детского населения [1, 12]. На долю ЗН у детей младше 15 лет приходится только 1% ЗН, развивающихся во всех возрастных группах. ЗН детского возраста существенно отличаются по своей структуре от ЗН, характерных для взрослой популяции. В структуре заболеваемости ЗН детей и подростков преобладают опухоли мезенхимального происхождения и онкогематологические заболевания, тогда как большинство случаев ЗН у взрослых больных представлено эпителиальными ЗН. Оба этих факта свидетельствуют о том, что процесс регистрации ЗН и анализ полученных данных в детской практике

должен отличаться от таковых, принятых для пациентов старших возрастных групп.

ЗН у взрослых больных стратифицируются в зависимости от локализации первичной опухоли (по топографии), тогда как у детей, начиная с конца 80-х годов XX в., принята стратификация ЗН в зависимости от гистологического варианта опухоли (по морфологии). Своим началом классификация ЗН детского возраста обязана J.M. Birch и H.V. Marsden [16], разработавшим и внедрившим новую классификационную схему в практику Детского регистра опухолей Манчестера, Великобритания (Manchester children's tumor registry). В 1995 г. была опубликована Международная классификация ЗН детского возраста (International classification of childhood cancer — ICCC) [17] — второе издание прежней классификации. Последняя версия Международной классификации ЗН детского возраста 3-го пересмотра (далее ICCC-3), опубликованная в 2005 г., является международным стандартом анализа и представления эпидемиологических данных о ЗН детского возраста (табл. 3) [18]. Новая версия ICCC-3 базируется на 3-м издании Международной классификации болезней в онкологии (International classification of diseases for oncology, 3 ed — ICD-O-3) [19].

В основе ICCC-3 лежат следующие принципы [18]:

- 1) применение системы правил, номенклатуры и системы кодирования (морфология, топография, биологическое поведение), используемых в ICD-O-3;
- 2) категории, разработанные в ICCC-3, соответствуют Международной гистологической и генетической классификации ЗН, публикуемой ВОЗ;
- 3) трехуровневая иерархическая система: 1-й уровень включает в себя 12 основных диагностических групп ЗН (см. табл. 3), 2-й — объединяет 47 диагностических подгрупп, 3-й — представляет собой еще более расширенную классификацию;
- 4) включение в состав только злокачественных опухолей (код биологического поведения — behavior — 3 по ICD-O-3) за одним исключением (пункт 5);
- 5) включение незлокачественных интракраниальных и интраспинальных опухолей.

Последний пункт является чрезвычайно важным, поскольку включение незлокачественных (доброкачественные опухоли, опухоли с неизвестным биологическим поведением) опухолей центральной нервной системы (ЦНС), требует особой организации работы регистра и сбора информации о пациентах с данным видом новообразований. Большинство больных с доброкачественными опухолями ЦНС получают лечение в специализированных нейрохирургических отделениях и не попадают в поле зрения детских онкологов, поскольку подобные опухоли не требуют проведения химио- и лучевой терапии. Корректный учет новых случаев

Таблица 3. *Международная классификация злокачественных новообразований у детей, 3-е издание [18]*

Диагностическая группа	морфология	Коды по ICD-O-3	топография
I. Лейкозы, миелопролиферативные заболевания, миелодиспластический синдром			
Лимфобластные лейкозы	9820, 9823, 9826, 9827, 9831—9837, 9940, 9948		
Острый миелобластный лейкоз	9840, 9861, 9866, 9867, 9870—9874, 9891, 9895—9897, 9910, 9920, 9931		
Хронические миелопролиферативные заболевания	9863, 9875, 9876, 9950, 9960—9964		
Миелодиспластический синдром	9945, 9946, 9975, 9980, 9982—9987, 9989		
и другие миелопролиферативные заболевания			
Неуточненные и другие уточненные лейкозы	9800, 9801, 9805, 9860, 9930		
II. Лимфомы и ретикулоэндотелиальные ЗН			
Лимфома Ходжкина	9650—9655, 9659, 9661—9665, 9667		
Неходжкинские лимфомы (за исключением лимфомы Беркитта)	9591, 9670, 9671, 9673, 9675, 9678—9680, 9684, 9689—9691, 9695, 9698—9702, 9705, 9708, 9709, 9714, 9716—9719, 9727—9729, 9731—9734, 9760—9762, 9764—9769, 9970		
Лимфома Беркитта	9687		
Различные лимфоретикулярные опухоли	9740—9742, 9750, 9754—9758		
Неуточненные лимфомы	9590, 9596		
III. Опухоли ЦНС и различные интракраниальные и интраспинальные опухоли			
Эпендимомы и опухоли сосудистого сплетения*	9383, 9390—9394		
Астроцитомы*	9380		C72.3
	9384, 9400—9411, 9420, 9421—9424, 9440—9442		
Интракраниальные и интраспинальные эмбриональные опухоли*	9470—9474, 9480, 9508		
	9501—9504		C70.0—C72.9
Другие глиомы*	9380		C70.0—C72.2, C72.4—C72.9, C75.1, C75.3
	9381, 9382, 9430, 9444, 9450, 9451, 9460		
Другие уточненные интракраниальные и интраспинальные опухоли*	8270—8281, 8300, 9350—9352, 9360—9362, 9412, 9413, 9492, 9493, 9505—9507, 9530—9539, 9582		
Неуточненные интракраниальные и интраспинальные опухоли*	8000—8005		C70.0—C72.9, C75.1—C75.3
IV. Нейробластома и другие опухоли периферической нервной системы			
Нейробластома и ганглионейробластома	9490, 9500		
Другие опухоли периферической нервной системы	8680—8683, 8690—8693, 8700, 9520—9523		
	9501—9504		C00.0—C69.9, C73.9—C76.8, C80.9
V. Ретинобластома	9510—9514		
VI. Опухоли почек			
Нефробластомы и другие неэпителиальные опухоли почек	8959, 8960, 8964—8967		
	8963, 9364		C64.9
Почечно-клеточный рак	8010—8041, 8050—8075, 8082, 8120—8122, 8130—8141, 8143, 8155, 8190—8201, 8210, 8211, 8221—8231, 8240, 8241, 8244—8246, 8260—8263, 8290, 8310, 8320, 8323, 8401, 8430, 8440, 8480—8490, 8504, 8510, 8550, 8560—8576		C64.9
	8311, 8312, 8316—8319, 8361		
Неуточненные злокачественные опухоли почек	8000—8005		C64.9
VII. Опухоли печени			
Гепатобластома	8970		

Продолжение табл. 3

Диагностическая группа	морфология	Коды по ICD-O-3 топография
Гепатоцеллюлярная карцинома	8010—8041, 8050—8075, 8082, 8120—8122, 8140, 8141, 8143, 8155, 8190—8201, 8210, 8211, 8230, 8231, 8240, 8241, 8244—8246, 8260—8264, 8310, 8320, 8323, 8401, 8430, 8440, 8480—8490, 8504, 8510, 8550, 8560—8576	C22.0, C22.1
Неуточненные злокачественные опухоли печени	8160—8180 8000—8005	C22.0, C22.1
VIII. Злокачественные опухоли костей		
Остеосаркома	9180—9187, 9191—9195, 9200	C40.0—C41.9, C76.0—C76.8, C80.9
Хондросаркома	9210, 9220, 9240	C40.0—C41.9, C76.0—C76.8, C80.9
Опухоли семейства саркомы Юинга	9221, 9230, 9241—9243 9260	C40.0—C41.9, C76.0—C76.8, C80.9
Другие уточненные злокачественные опухоли костей	9363—9365 8810, 8811, 8823, 8830	C40.0—C41.9 C40.0—C41.9
Неуточненные злокачественные опухоли костей	8812, 9250, 9261, 9262, 9270—9275, 9280—9282, 9290, 9300—9302, 9310—9312, 9320—9322, 9330, 9340—9342, 9370—9372 8000—8005, 8800, 8801, 8803—8805	C40.0—C41.9
IX. Саркомы мягких тканей и другие экстраоссальные саркомы		
Рабдомиосаркома	8900—8905, 8910, 8912, 8920, 8991	C00.0—C39.9, C44.0—C76.8, C80.9
Фибросаркома, опухоли оболочек периферических нервов и другие фиброзные опухоли	8810, 8811, 8813—8815, 8821, 8823, 8834—8835 8820, 8822, 8824—8827, 9150, 9160, 9491, 9540—9571, 9580 9140	C00.0—C39.9, C44.0—C76.8, C80.9
Саркома Капоши	8587, 8710—8713, 8806, 8831—8833, 8836, 8840—8842, 8850—8858, 8860—8862, 8870, 8880, 8881, 8890—8898, 8921, 8982, 8990, 9040—9044, 9120—9125, 9130—9133, 9135, 9136, 9141, 9142, 9161, 9170—9175, 9231, 9251, 9252, 9373, 9581 8830	C00.0—C39.9, C44.0—C76.8, C80.9
Другие уточненные саркомы мягких тканей	8963 9180, 9210, 9220, 9240 9260 9364 9365	C00.0—C63.9, C65.9—C69.9, C73.9—C76.8, C80.9 C49.0—C49.9 C00.0—C39.9, C47.0—C75.9 C00.0—C39.9, C47.0—C63.9, C65.9—C69.9, C73.9—C76.8, C80.9 C00.0—C39.9, C47.0—C63.9, C65.9—C76.8, C80.9
Неуточненные саркомы мягких тканей	8800—8805	C00.0—C39.9, C44.0—C76.8, C80.9
X. Герминогенные, трофобластические опухоли и опухоли гонад		
Интракраниальные и интраспинальные опухоли*	9060—9065, 9070—9072, 9080—9085, 9100, 9101	C70.0—C72.9, C75.1—C75.3
Злокачественные экстракраниальные и экстрагонадные герминогенные опухоли	9060—9065, 9070—9072, 9080—9085, 9100—9105	C00.0—C55.9, C57.0—C61.9, C63.0—C69.9, C73.9—C75.0, C75.4—C76.8, C80.9
Злокачественные герминогенные опухоли гонад	9060—9065, 9070—9073, 9080—9085, 9090, 9091, 9100, 9101	C56.9, C62.0—C62.9
Злокачественные эпителиальные опухоли гонад	8010—8041, 8050—8075, 8082, 8120—8122, 8130—8141, 8143, 8190—8201, 8210, 8211, 8221—8241, 8244—8246, 8260—8263, 8290, 8310, 8313, 8320, 8323, 8380—8384, 8430, 8440, 8480—8490, 8504, 8510, 8550, 8560—8573, 9000, 9014, 9015 8441—8444, 8450, 8451, 8460—8473	C56.9, C62.0—C62.9

Продолжение табл. 3

Диагностическая группа	Коды по ICD-O-3	
	морфология	топография
Другие и неуточненные злокачественные опухоли гонад	8590—8671	
	8000—8005	C56.9, C62.0—C62.9
XI. Другие злокачественные эпителиальные опухоли и злокачественная меланома		
Адренокортикальный рак	8370—8375	
Рак щитовидной железы	8010—8041, 8050—8075, 8082, 8120—8122, 8130—8141, 8190, 8200, 8201, 8211, 8230, 8231, 8244—8246, 8260—8263, 8290, 8310, 8320, 8323, 8430, 8440, 8480, 8481, 8510, 8560—8573	C73.9
Рак носоглотки	8330—8337, 8340—8347, 8350, 8010—8041, 8050—8075, 8082, 8083, 8120—8122, 8130—8141, 8190, 8200, 8201, 8211, 8230, 8231, 8244—8246, 8260—8263, 8290, 8310, 8320, 8323, 8430, 8440, 8480, 8481, 8500—8576	C11.0—C11.9
Злокачественная меланома	8720—8780, 8790	
Злокачественные эпителиальные опухоли кожи	8010—8041, 8050—8075, 8078, 8082, 8090—8110, 8140, 8143, 8147, 8190, 8200, 8240, 8246, 8247, 8260, 8310, 8320, 8323, 8390—8420, 8430, 8480, 8542, 8560, 8570—8573, 8940, 8941	C44.0—C44.9
Другие и неуточненные злокачественные эпителиальные опухоли	8010—8084, 8120—8157, 8190—8264, 8290, 8310, 8313—8315, 8320—8325, 8360, 8380—8384, 8430—8440, 8452—8454, 8480—8586, 8588—8589, 8940, 8941, 8983, 9000, 9010—9016, 9020, 9030	C00.0—C10.9, C12.9—C21.8, C.23.9—C39.9, C48.0—C48.8, C50.0—C55.9, C57.0—C61.9, C63.0—C63.9, C65.9—72.9, C75.0—C76.8, 80.9
XII. Другие и неуточненные злокачественные опухоли		
Другие уточненные злокачественные опухоли	8930—8936, 8950, 8951, 8971—8981, 9050—9055, 9110	
Другие неуточненные злокачественные опухоли	9363, 8000—8005	C00.0—C39.9, C47.0—C75.9, C00.0—C21.8, C23.9—C39.9, C42.0—C55.9, C57.0—C61.9, C63.0—C63.9, C65.9—C69.9, C73.9—C75.0, C75.4—C80.9

*В том числе незлокачественные опухоли.

заболевания незлокачественными опухолями ЦНС возможен только при условии тесного взаимодействия сотрудников регистра и нейрохирургов.

Необходимо остановиться на нескольких изменениях, внесенных в ICCS-3 по сравнению с предшествующей версией классификации. Прежде всего, миелодиспластический синдром (МДС) сегодня рассматривается как ЗН и включен в I диагностическую группу (лейкозы, миелопролиферативные и миелодиспластические заболевания). Ранее МДС канцер-регистрами не регистрировался. Вторым важным изменением является включение некоторых диссеминированных форм гистиоцитоза из клеток Лангерганса во II диагностическую группу (лимфомы и ретикулоэндотелиальные опухоли). Кроме того, ICCS-3 учитывает изменения классификации некоторых типов опухолей ЦНС. Важные изменения претерпела IX диагностическая группа (саркомы мягких тканей). В частности, теперь некоторые случаи фиброзной гистиоцитомы

относят к VIII диагностической группе (злокачественные опухоли костей).

Следует отметить, что ICCS-3 используется для стратификации ЗН не только у детей, но и у подростков. Более того, ряд исследователей предлагает расширить рамки ее использования и на популяцию взрослых пациентов молодого возраста (20—24 года), поскольку в данном возрасте не отмечается столь существенного превалирования злокачественных эпителиальных опухолей, как в старших возрастных группах [20].

J.M. Birch [21] предложена отдельная классификация ЗН у подростков и молодых взрослых, также основанная на морфологии первичной опухоли, подразделяющая все ЗН на 10 диагностических групп. В данной классификации более детально стратифицированы злокачественные эпителиальные опухоли.

Чрезвычайно важным является соблюдение единых стандартов определения даты заболевания

(даты верификации диагноза). В большинстве стран Европы используют рекомендации, разработанные Европейским объединением канцер-регистров — European Network of Cancer Registries — ENCR (табл. 4) [22].

Помимо стандартизации правил определения даты диагноза, критическим моментом является унификация принципов определения множественных ЗН у одного пациента. Наиболее часто со случаями развития нескольких ЗН у одного больного приходится сталкиваться специалистам, работающим со взрослым контингентом больных. Вместе с тем и в практике детской онкологии подобные случаи встречаются все чаще, что отражает, с одной стороны, улучшение выживаемости пациентов, а с другой — интенсификацию режимов терапии при некоторых видах ЗН детского возраста и, следовательно, возможность развития вторичных ЗН. Данные Автоматизированной системы по учету злокачественных новообразований у детей (Automated Childhood Cancer Registration System — ACCISS) в Европе, обобщившей результаты работы более 60 популяционных канцер-регистров, показывают, что частота развития множественных в структуре заболеваемости детей ЗН не превышает 1%. Однако за период проведения исследования отмечено статистически значимое повышение показателя заболеваемости множественными ЗН [23].

В настоящее время существует два свода правил по кодированию множественных ЗН, разработанных Программой регистрации статистических данных по онкологической заболеваемости и смертности (Surveillance, Epidemiology, and End Results program — SEER) в США [24] и Международной ассоциацией канцер-регистров (International Association of Cancer Registries — IACR) [25]. В большинстве стран Европы применяются рекомендации IACR. Тем не менее многие канцер-регистры в своей практической работе используют комбинацию двух

сводов правил, применяя правила IACR для кодирования солидных опухолей и правила SEER — для кодирования ЗН гемопоэтической и лимфоидной системы. Это связано с тем, что правила SEER в отношении кодирования множественных ЗН гемопоэтической и лимфоидной системы более точно отражают новую международную классификацию, разработанную для данной группы ЗН [26].

Основной целью работы любого регистра является регистрация всех случаев заболевания в определенной популяции. На практике это трудноосуществимо. Стандартом полноты охвата служит регистрация более 90% случаев заболевания. Так, например, Немецкий детский канцер-регистр регистрирует более 95% случаев заболевания [12]. Как правило, до достижения подобных результатов требуется 5—10 лет от начала функционирования регистра.

Оценка работы канцер-регистра возможна путем изучения двух характеристик, которые являются неотделимыми друг от друга: полноты охвата и точности собираемой информации [14, 15].

Существует большое число методов, позволяющих качественно (полуколичественно) или количественно оценить полноту охвата регистром случаев заболевания. Наиболее простыми методами полуколичественной оценки являются стабильность показателей заболеваемости во времени, сравнение частоты заболеваемости в различных популяциях, оценка формы кривой повозрастной заболеваемости [15].

Один из методов оценки полноты регистрации канцер-регистра — сравнение полученных повозрастных показателей заболеваемости с «ожидаемым» показателем заболеваемости. Минимальные и максимальные значения повозрастного показателя заболеваемости в зависимости от пола представлены в табл. 5 [27].

К более сложным методикам относят повторное независимое выявление случаев заболевания

Таблица 4. Рекомендации по определению даты диагноза [22]

Дата первого развившегося в хронологическом порядке события (из 6 приведенных ниже) является датой диагноза.

Инициально выбранная дата диагноза может быть изменена на более приоритетную (стоящую выше в списке) в течение 3 мес

1. Дата первого гистологического или цитологического подтверждения ЗН (за исключением гистологического/цитологического исследования при аутопсии). Она включает в себя даты:
 - а) забора материала (биопсии)
 - б) получения материала патологоанатомом
 - в) гистологического/цитологического заключения

2. Дата госпитализации в больницу в связи с данным ЗН

3. Если больной наблюдался только амбулаторно, дата первой амбулаторной консультации в связи с данным ЗН

4. Дата диагноза, отличная от 1, 2, 3

5. Дата смерти, в случае если другая информация отсутствует, за исключением данных о том, что пациент умер от данного ЗН

6. Дата смерти, в случае если опухоль выявлена при аутопсии

Какая бы дата ни была выбрана, дата заболевания не может идти позднее даты начала лечения, решения не проводить лечения или даты смерти. Дата диагноза не влияет на выбор метода его постановки.

(independent case ascertainment), метод захвата — повторного захвата (capture-recapture method), метод оценки соотношения показателя смертности к показателю заболеваемости (mortality/incidence ratio), методы, основанные на оценке свидетельств о смерти (death certificate methods) [14, 15].

Другой характеристикой, отражающей качество работы канцер-регистра, является точность собираемой информации. Под точностью понимают пропорцию случаев в базе данных с определенной характеристикой (например, локализация опухоли, возраст), которые имеют данный признак [14]. К точности собираемой информации относят число случаев:

- 1) с микроскопической верификацией;
- 2) с неопределенным точным гистологическим диагнозом;
- 3) установленных только на основании свидетельства о смерти;
- 4) с отсутствующей информацией.

Одной из характеристик точности информации служит частота случаев заболевания, подтвержденных гистологическим исследованием. Очевидно, что чем больше случаев ЗН подтверждено гистологически, тем более верифицирован диагноз и, соответственно, точнее информация, собираемая канцер-регистром. Однако, поскольку многие регистры кодируют миелограмму при онкогематологических заболеваниях как гистологическое исследование, на практике рассчитывают показатель числа случаев с микроскопической верификацией. Под микроскопической верификацией понимают случаи, имеющие гистологическое или цитологическое подтверждение [14]. Частота случаев с микроскопической верификацией применительно к практике регистрации случаев заболевания у детей должна быть > 90%. Однако следует отметить, что чрезвычайно высокий показатель микроскопической верификации, приближающийся к 100%, свидетельствует о недоучете случаев, диагностируемых только клиническими методами (например, некоторые виды опухолей ЦНС) [15].

Еще одним показателем точности собираемой информации является число случаев с неустановленным точным гистологическим диагнозом, относящимся к подгруппам ICCS-3 Ie, IIe, IIIf, VIc, VIIc, VIIe, IXe, Xe (только M-8000 — M-8005), XI f (только C76 — C80.9), XIIb [23]. Доля подобных случаев должна быть минимальной (< 5%).

Кроме того, свидетельства о смерти являются важным источником информации о случаях заболевания ЗН, которые не были диагностированы при жизни больного. В случае если свидетельство о смерти является первым и единственным источником информации о заболевании, регистром должны быть предприняты все меры по поиску и выявлению дополнительной клинической информации и микроскопической верификации. Если дополнительной информации выявить не удастся и единственным ее источником остается свидетельство о смерти, то подобный случай трактуется как выявленный только на основании свидетельства о смерти (Death Certificate Only case — DCO) [14, 15]. Свидетельства о смерти не являются столь же точным источником информации, как выписки из истории болезни и гистологические заключения. В связи с этим частота случаев, диагностированных только на основании свидетельства о смерти, не должна превышать 5%. В большинстве канцер-регистров, включенных в проект ACCISS, данный показатель был < 1% [23]. Следует подчеркнуть, что число случаев, установленных на основании только свидетельства о смерти, не является показателем полноты охвата всех случаев заболевания. Оно отражает возможности регистра по выявлению случаев заболевания.

Другим индикатором точности собираемой информации является пропорция случаев в регистре с любой отсутствующей единицей информации, например с отсутствием данных о первичной локализации опухоли, возрасте пациента. Доля подобных случаев должна быть минимальной [14]. Так, частота случаев с неизвестной локализацией первичной опухоли (Primary Site Unspecified — PSU) не должна превышать 5% от числа всех зарегистрированных пациентов.

Защита данных, хранящихся в регистре, является темой отдельного обсуждения, выходящего за рамки данной статьи. Вместе с тем необходимо предпринимать все меры по защите информации, поскольку в большинстве регистров хранятся персонифицированные данные больных.

Помимо сбора данных о случаях заболевания в популяции для расчета показателя заболеваемости, чрезвычайно интересным и необходимым как для практических, так и для исследовательских целей является получение информации о статусе больных после установления диагноза. Минимальные дан-

Таблица 5. Минимальные и максимальные значения повозрастного показателя заболеваемости в зависимости от пола (на 100 тыс. детского населения) [27]

Возраст, годы	Мальчики		Девочки	
	наименьшее значение	наибольшее значение	наименьшее значение	наибольшее значение
0—4	12,3	24,7	9,7	21,4
5—9	8,5	15,6	6,9	12,0
10—14	8,5	15,0	6,8	13,6

ные могут включать информацию о статусе пациента на момент последнего контакта (жив/умер). Эта задача облегчается при наличии доступа к свидетельствам о смерти с указанием ЗН как основной или сопутствующей причины смерти. В ряде стран канцер-регистр получает данные обо всех случаях смерти в регионе, что позволяет его сотрудникам отбирать необходимые свидетельства о смерти, а также отслеживать случаи смерти у излеченных от ЗН больных, погибших по другой причине.

Длительное наблюдение за пациентами, пережившими терапию по поводу ЗН в детском возрасте, позволяет оценивать ее результаты на популяционном уровне (выживаемость), отслеживать случаи развития вторых злокачественных опухолей, мониторировать отдаленные эффекты терапии [13]. В связи с этим необходимо налаживать взаимодействие между детскими и общими канцер-регистрами для длительного (возможно пожизненного) мониторинга больных. В настоящее время подобная система длительного мониторинга внедряется Немецким детским канцер-регистром [13].

Популяционный канцер-регистр может анализировать данные только при наличии доступа к информации о численности населения данной популяции/региона. При этом необходимы не только данные о численности детского населения в возрасте 0—14 лет, но и численности населения для возрастных групп младше 1 года, 1—4, 5—9, 10—14 лет отдельно для каждого пола [8].

Анализ дескриптивных эпидемиологических данных о ЗН детского возраста существенно отличается от такового у взрослых пациентов. Данные отличия включают расчет стандартизованного по возрасту показателя заболеваемости в возрастной группе 0—14 лет и отдельно для детей в возрасте <1 года жизни, указание латеральности (сторона поражения опухолью) при отдельных видах ЗН детского возраста (нефробластома, ретинобластома) [8].

Стандартизация по возрасту является критическим моментом при сравнении показателей заболеваемости в различных регионах одной страны или в разных странах. Сравнение только «грубых» показателей заболеваемости может дать ложную картину, поскольку не принимает во внимание различия в возрастном составе населения сравниваемых территорий [28]. Существуют прямые и непрямые методы стандартизации. Наиболее распространенным является метод прямой стандартизации по возрасту, при котором в качестве референтной категории используется мировая стандартная численность населения (world standard population) в возрасте до 15 лет (табл. 6) [8].

В случае если численность населения детей до 1 года известна, расчет стандартизованного по возрасту показателя заболеваемости проводят по следующей формуле:

$$ARS = [(r_0 \times 2,4) + (r_1 \times 9,6) + (r_2 \times 10) + (r_3 \times 9)]/31.$$

Если численность населения детей до 1 года не известна, то расчет осуществляют по аналогичной методике на основании обобщенных данных о численности населения в возрастной группе 0—4 года. Случаи заболевания с неизвестным возрастом из анализа исключаются [8].

Популяционные канцер-регистры служат эталоном мониторинга ЗН как у детей, так и у взрослых пациентов. Однако следует отметить, что несмотря на разработку единых стандартов регистрации и анализа эпидемиологических данных, международный опыт свидетельствует о том, что универсальной модели организации популяционного учета и мониторинга ЗН в детском возрасте не существует. Так, в США регистрация случаев заболевания ЗН во всех возрастных группах, в том числе и у детей, осуществляется Программой SEER, объединяющей 17 популяционных канцер-регистров в различных регионах, охватывающих 26% населения страны [29]. В Канаде организованы как общие канцер-регистры, фиксирующие случаи заболевания во всех возрастных группах, так и специализированные детские популяционные канцер-регистры в отдельных провинциях [30]. Опыт регистрации ЗН у детей в странах Европы также различается. В этом отношении интересным представляется анализ данных ACCISS в Европе [22]. В Скандинавских странах учет всех случаев заболевания осуществляется едиными национальными канцер-регистрами, охватывающими все население указанных стран. В Италии и Франции единые национальные канцер-регистры отсутствуют, но в отдельных регионах этих стран организованы специализированные детские канцер-регистры [1]. Наиболее известным является детский канцер-регистр в провинции Пьемонт (Италия), созданный в 1967 г. [31]. В Великобритании организован Национальный регистр детских опухолей, регистрирующий случаи заболевания у детей 0—14 лет в Англии, Уэльсе и Шотландии. Интересен также опыт

Таблица 6. Состав мировой стандартной численности населения в возрасте 0—14 лет [8]

Возраст, годы	Мировая стандартная численность населения	Повозрастной показатель заболеваемости
0	2400	r_0
1—4	9600	r_1
5—9	10 000	r_2
10—14	9000	r_3
0—14	31 000	

Германии, Беларуси, Венгрии и Нидерландов, в которых успешно сосуществуют как общие, так и специализированные детские национальные канцер-регистры (в Нидерландах только для случаев заболевания лейкозами). Наиболее крупным специализированным детским канцер-регистром в мире сегодня является Немецкий детский канцер-регистр, регистрирующий 1800 случаев заболевания в год [12]. Организованный в 1980 г., он охватывает всю территорию страны. При этом по существующему в Германии законодательству только этот регистр имеет право на сбор информации о случаях заболевания ЗН у детей и подростков младше 18 лет. После регистрации и обработки данных информация передается в общие популяционные канцер-регистры отдельных федеральных земель.

В заключение необходимо отметить, что проведение как мероприятий противоопухолевого контроля, так и эпидемиологических исследований не возможно без существования популяционных канцер-регистров, осуществляющих свою работу на основании международных стандартов и рекомендаций. Создание подобных канцер-регистров в нашей стране существенно улучшило бы мониторинг ЗН в детском возрасте и положительно повлияло на эффективность лечения ЗН у детей, так как позволило бы внедрить наиболее эффективные модели терапии. Популяционные канцер-регистры сделали бы возможным осуществление проспективной оценки как выживаемости в регионах в зависимости от вида лечения, так и своевременности проведения диагностических мероприятий в каждом конкретном случае и в регионе в целом.

Л и т е р а т у р а

- Desandes E., Clavel J., Berger C. et al. Cancer incidence among children in France, 1990—1999. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43(7):742—8.
- Robison L.L., Green D.M., Hudson M. et al. Long-term outcomes of adult survivors of childhood cancer. *Cancer* 2005;104(11 Suppl):2557—64.
- Muir C.S., Demaret E., Boyle P. The cancer registry in cancer control: an overview. In: *The role of the registry in cancer control*. D.M. Parkin, G. Wagner, C.S. Muir eds. Lyon: IARC Scientific Publications no. 66, 1985. p. 13—26.
- Jensen O.M., Storm H.H. Purposes and uses of cancer registration. In: *Cancer registration*. O.M. Jensen, D.M. Parkin, R. MacLennan et al. eds. Principles and methods. Lyon: IARC Scientific Publications no. 95, 1991. p. 7—21.
- Armstrong B.K. The role of the registry in cancer control. *Cancer Causes Control* 1992;3:569—79.
- Parkin D.M. The evolution of the population-based cancer registry. *Nat Rev Cancer* 2006;6:603—12.
- MacLennan R. Items of patients information which may be collected by registries. In: *Cancer registration*. O.M. Jensen, D.M. Parkin, R. MacLennan et al. eds. Principles and methods. Lyon: IARC Scientific Publications no. 95, 1991. p. 43—63.
- Parkin D.M., Kramarova E., Draper G.J. et al. International incidence of childhood cancer, vol. II. Lyon: IARC scientific publication no. 144, 1998.
- Powell J. Data sources and reporting. In: *Cancer registration*. O.M. Jensen, D.M. Parkin, R. et al. eds. Principles and methods. Lyon: IARC Scientific Publications no. 95, 1991. p. 29—42.
- Evaluation of clinical care by cancer registries. Ed by Sankila R., Black R., Coebergh J.W.C. et al. IARC Technical Publication no. 37, 2003.
- Michaelis J., Kaatsch P. Use of information from clinical trials for an integrated cancer registry. *Methods Inf Med* 1990;29:92—8.
- Kaatsch P., Spix C. German Childhood Cancer Registry — annual report 2006/07 (1980—2006). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics, University of Mainz, Germany, 2008. www.kinderkrebsregister.de
- Debling D., Spix C., Blettner M. et al. The cohort of long-term survivors at the German Childhood Cancer Registry. *Klin Padiatr* 2008;220:371—7.
- Bray F., Parkin D.M. Evaluation of data quality in the cancer registry: principles and methods. Part I — comparability, validity and timeliness. *Eur J Cancer* 2009;45:747—55.
- Parkin D.M., Bray F. Evaluation of data quality in the cancer registry: principles and methods. Part II — completeness. *Eur J Cancer* 2009;45:756—64.
- Birch J.M., Marsden H.B. A classification scheme for childhood cancer. *Int J Cancer* 1987;40:620—4.
- Kramarova E., Stiller C.A. The international classification of childhood cancer. *Int J Cancer* 1996;68:756—65.
- Steliarova-Foucher E., Stiller C., Lacour B., Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer. 3rd ed. *Cancer* 2005;103:1457—67.
- Fritz A., Percy C., Jack A. et al. eds. International Classification of Diseases for Oncology. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2000.
- Feltbower R.G., McNally R.J., Kinsey S.E. et al. Epidemiology of leukaemia and lymphoma in children and young adults from the north of England, 1990—2002. *Eur J Cancer* 2009;45(3):420—7.
- Birch J.M., Alston R.D., Kelsey A.M. et al. Classification and incidence of cancers in adolescents and young adults in England, 1979—1997. *Br J Cancer* 2002;87:1267—74.
- Recommendations for coding of incidence date. European Network of Cancer Registries. <http://www.enrcr.com.fr/inci-deng.pdf> [Access 25.08.2009]
- Steliarova-Foucher E., Kaatsch P., Lacour B. et al. Quality, comparability and methods of analysis of data on childhood cancer in Europe (1978—1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 2006;42:1915—51.
- <http://seer.cancer.gov/tools/mphrules/> [Access 25.08.2009]
- http://www.iacr.com.fr/MPRules_july2004.pdf. [Access 25.08.2009]
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W., eds. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2001.
- Cancer incidence in five continents. Vol. VIII. D.M. Parkin, S.L. Whelan, J. Ferlay et al. IARC Scientific Publication No. 155, 2002.
- Boyle P., Parkin D.M. Statistical methods for registries. In: *Cancer registration*. O.M. Jensen, D.M. Parkin, R. MacLennan et al. eds. Principles and methods. Lyon: IARC Scientific Publications no. 95, 1991. p. 126—58.
- <http://seer.cancer.gov/about/index.html>. [Access 25.08.2009]
- Greenberg M.L., Barr R.D., DiMonte B. et al. Childhood cancer registries in Ontario, Canada: lessons learned from a comparison of two registries. *Int J Cancer* 2003;105(1):88—91.
- Dalmaso P., Pastore G., Zuccolo L. et al. Temporal trends in the incidence of childhood leukemia, lymphomas and solid tumors in north-west Italy, 1967—2001. A report of the Childhood Cancer Registry of Piedmont. *Haematologica* 2005;90(9):1197—204.

ПРЕИМУЩЕСТВО ПРИМЕНЕНИЯ ТАСИГНЫ ПЕРЕД ГЛИВЕКОМ В ЛЕЧЕНИИ ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОГО ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПАНИИ «НОВАРТИС»

- Тасигна превосходит Гливек по всем показателям эффективности, оценивавшимся в исследовании, включая предотвращение прогрессирования заболевания при оценке через 12 мес [1]
- Через 12 мес приема Тасигны в дозе 300 мг 2 раза в сутки у значительно меньшего числа пациентов наблюдали прогрессирование в фазу акселерации или бластный криз, чем при приеме Гливека в дозе 400 мг 1 раз в сутки [1]
- Тасигна обладает хорошей переносимостью, вследствие возникновения нежелательных явлений терапию прекратили лишь небольшое число пациентов, принимавших по 300 мг 2 раза в сутки [1]
- Полученные результаты подтверждают возможность применения Тасигны у пациентов с впервые установленным диагнозом; компания «Новартис» планирует подать заявки на регистрацию препарата в различных странах

8 декабря 2009 г. в крупном клиническом исследовании III фазы, проведенном в Базеле (Швейцария), было продемонстрировано, что препарат Тасигна (нилотиниб) превосходит по эффективности Гливек® (иматиниб) при лечении взрослых пациентов с впервые диагностированным хроническим миелолейкозом (ХМЛ) с филадельфийской хромосомой (Ph⁺) в хронической фазе (ХФ).

В этом первом прямом сравнительном исследовании двух пероральных препаратов, применяемых в качестве начальной терапии данного вида лейкоза, зафиксировано статистически достоверное превосходство Тасигны над Гливексом по всем показателям эффективности, включая частоту достижения большого молекулярного (БМО) и полного цитогенетического (ПЦО) ответов и предотвращение прогрессирования в фазу акселерации или бластный криз [1]. Данные были представлены в виде внеочередного абстракта на 51-м ежегодном заседании Американского гематологического общества, проходившего в декабре в Новом Орлеане (США).

Прогрессирование в фазу акселерации или бластный криз через 12 мес при приеме Тасигны по 300 мг 2 раза в сутки наблюдалось значительно реже, чем при лечении Гливексом в дозе 400 мг 1 раз в сутки ($n=2$ и 11 соответственно [1]), что свидетельствует о статистически достоверном улучшении контроля заболевания.

«Превосходная частота ответа при приеме Тасигны в сочетании с очень низкой частотой прогрессирования заболевания убедительно показывает, что у пациентов, начавших лечение этим препаратом, может быть достигнуто долговременное улучшение выживаемости без прогрессирования, — утверждает Дж. Сальо, профессор Туринского университета, Клиники Сан-Луиджи, Орбасано (Италия), член руководящего комитета исследования. — Данные по эффективности и безопасности препарата Тасигна свидетельствуют о его возможно скором применении у пациентов с впервые поставленным диагнозом Ph⁺-ХМЛ».

При приеме Тасигны в дозе 300 мг 2 раза в сутки частота достижения БМО через 12 мес была в 2 раза выше, чем при приеме Гливека в дозе 400 мг 1 раз в сутки (44 и 22%, $p<0,0001$) [1]. Кроме того, при приеме Тасигны ПЦО был достигнут у 80% пациентов по сравнению с 65% при лечении Гливексом ($p<0,0001$) [1]. В группе Тасигны ответ на лечение достигался быстрее, чем в группе Гливека [1].

Согласно международным стандартам, БМО в данном исследовании определялся как снижение содержания патологического белка Bcr-Abl в крови до уровня $< 0,1\%$ от исходного [1]. Это можно интерпретировать следующим образом: из каждых 1000 клеток крови, содержащих Bcr-Abl до начала терапии, при наблюдении через 12 мес должна остаться только 1.

ПЦО означает, что в образце костного мозга, взятого у пациента, не должно быть клеток с Ph⁺.

Препарат Тасигна в данном исследовании переносился хорошо. В группе, получавшей Тасигну в дозе 300 мг 2 раза в сутки, меньшее число пациентов прекращали лечение вследствие возникновения нежелательных явлений, чем в группе, принимавшей Гливек по 400 мг 1 раз в сутки. Ни у одного из пациентов в исследовании не зафиксировано удлинения интервала QT > 500 мс. Ни при одном из видов лечения не зарегистрировано случаев внезапной смерти [1].

«Компания «Новартис» является пионером в области исследований таргетной терапии при Ph⁺-ХМЛ, результатом которых стало создание беспрецедентных по эффективности и безопасности препаратов, — сообщил Д. Эпштейн, президент и исполнительный директор подразделения онкологии и молекулярной диагностики компании «Новартис». — С учетом того, что при применении

препарата Гливек уже достигаются низкая частота трансформации в распространенную форму заболевания и прекрасные показатели долговременной выживаемости, фантастические данные по эффективности и безопасности препарата Тасигна при оценке в течение 12 мес свидетельствуют о возможности дальнейшего улучшения результатов лечения у пациентов с Ph⁺-ХМЛ».

Тасигна является мощным и селективным ингибитором белка Bcr-Abl, вызывающего образование опухолевых клеток при Ph⁺-ХМЛ [2, 3]. При поступлении первых сообщений о резистентности этого заболевания к Гливеку, по данным регистрационных исследований, ученые компании «Новартис» всего через год после поступления Гливек на рынок создали новый препарат — Тасигну. Первые клинические исследования начались уже через 21 мес после его открытия. Первое одобрение регуляторных органов было получено для применения данного препарата в качестве терапии 2-й линии в 2007 г.

Компания «Новартис» планирует подать заявки на получение одобрения препарата Тасигна для лечения взрослых пациентов с впервые установленным диагнозом Ph⁺-ХМЛ во многих странах. В настоящее время препарат одобрен к применению более чем в 80 странах (ЕС, США и др.) для лечения взрослых пациентов с Ph⁺-ХМЛ в ХФ или фазе акселерации с резистентностью к предшествующей терапии, включая Гливек.

Особенности проведения исследования

Клиническое исследование ENESTnd (Оценка эффективности и безопасности нилотиниба у пациентов с впервые поставленным диагнозом Ph⁺-ХМЛ — Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials of Newly Diagnosed Ph⁺ CML Patients) представляет собой рандомизированное открытое многоцентровое исследование III фазы по сравнению эффективности и безопасности препаратов Тасигна и Гливек у взрослых пациентов с впервые поставленным диагнозом Ph⁺-ХМЛ в ХФ [1]. Это крупнейшее из когда-либо проводившихся международных исследований, сравнивавшее 2 пероральных препарата для лечения Ph⁺-ХМЛ. Разработанное с целью выявления различий в частоте достижения БМО после 12 мес лечения препаратами Тасигна и Гливек, оно также являлось первым регистрационным исследованием, в котором в качестве основных конечных точек для рассмотрения регуляторными органами использовались следовые количества ключевых биомаркеров, специфичных для Ph⁺-ХМЛ. Второстепенные конечные точки данного исследования включали ПЦО, а также прогрессирование в фазу акселерации и бластный криз и общую выживаемость.

Исследование ENESTnd проводится в 220 центрах по всему миру, в него включены 846 пациентов. Больные были рандомизированы для полу-

чения Тасигны в дозе 400 мг 2 раза в сутки ($n=281$), 300 мг 2 раза в сутки ($n=282$) или Гливек — 400 мг/сутки ($n=283$). Основная конечная точка представляла собой оценку БМО, второстепенная — ПЦО, достигнутых через 12 мес. Планируемая продолжительность наблюдения составляет 5 лет [1]. Пациенты в группе Гливек при наличии у них субоптимального ответа или неэффективности терапии могут увеличить дозу и/или перейти на препарат Тасигна в рамках продолжения лечения по протоколу.

Анализ образцов на молекулярный ответ проводился в центральной лаборатории. Применяемый метод обладает значительно большей чувствительностью, чем стандартные цитогенетические анализы, в которых для визуального определения клеток с Ph-хромосомой требовалось взятие образца костного мозга [4], а также позволяет снизить инвазивность анализа и упростить процедуру его выполнения для пациентов.

Все пациенты на момент анализа, за исключением случаев досрочного прекращения терапии, получали лечение в течение ≥ 12 мес. Медиана продолжительности наблюдения составила 14 мес. В целом, при приеме Тасигны в дозе 400 и 300 мг 2 раза в сутки или Гливек — 400 мг/сут в исследовании осталось 84, 82 и 79% пациентов соответственно.

Частота достижения БМО при приеме Тасигны в дозе 300 мг 2 раза в сутки была статистически выше, чем при приеме Гливек — 400 мг/сут (44 и 22% соответственно, $p<0,0001$). Схожие результаты наблюдались при сравнении использования Тасигны в дозе 400 мг 2 раза в сутки и Гливек — 400 мг/сут (43 и 22%, $p<0,0001$). У пациентов с БМО медиана времени до его достижения при приеме Тасигны по 300 и 400 мг 2 раза в сутки была короче, чем при применении Гливек в дозе 400 мг/сут (5,7, 5,8 и 8,3 мес соответственно). Анализ молекулярного ответа проводили при помощи метода полимеразной цепной реакции в начале исследования, ежемесячно на протяжении 3 мес и далее каждые 3 мес.

Частота получения ПЦО при оценке через 12 мес при приеме Тасигны в дозе 300 мг 2 раза в сутки была достоверно выше, чем при приеме Гливек — 400 мг/сут (80 и 65%, $p<0,0001$). Аналогичные результаты отмечены при сравнении применения Тасигны в дозе 400 мг 2 раза в сутки и Гливек — 400 мг/сут (78 и 65%, $p<0,0005$). При приеме Тасигны в дозе 300 и 400 мг 2 раза в сутки прогрессирование в распространенные формы заболевания наблюдалось реже, чем при применении Гливек — 400 мг/сут ($n=2, 1$ и 11 соответственно).

Тасигна и Гливек в целом характеризовались хорошей переносимостью. Частота прекращения лечения вследствие возникновения нежелательных явлений или лабораторных отклонений при приеме

препарата Тасигна в дозе 300 и 400 мг 2 раза в сутки и Гливек — 400 мг/сут составила 7, 11 и 9% соответственно.

Ph⁺-ХМЛ

ХМЛ представляет собой заболевание, при котором в организме образуются злокачественные лейкоциты. Практически у всех пациентов с данным диагнозом наблюдается генетическое отклонение, известное как филадельфийская хромосома, приводящая к синтезу белка Bcr-Abl. Этот протеин вызывает пролиферацию злокачественных лейкоцитов [5]. В мире ХМЛ встречается приблизительно в 10—15% случаев лейкоза у взрослых [6]. Заболеваемость ХМЛ составляет приблизительно 1—2 случая на 100 000 человек в год [7].

Тасигна [2]

Тасигна одобрена к применению более чем в 80 странах (ЕС, США и др.) для лечения взрослых пациентов с Ph⁺-ХМЛ в ХФ или фазе акселерации с непереносимостью или резистентностью к предшествующей терапии, включая Гливек. Эффективность препарата Тасигна при этом показании основывается на результатах оценки частоты подтвержденных гематологического и цитогенетического ответов. Контролируемых исследований, свидетельствующих об улучшении обусловленной заболеванием симптоматики или увеличении продолжительности жизни, не проводилось.

Безопасность применения

Поскольку при приеме препарата Тасигна с пищей может увеличиваться его уровень в крови, данный препарат не следует принимать во время еды. Пациенты не должны ничего есть в течение 2 ч до и по крайней мере 1 ч — после приема Тасигны.

Наиболее распространенными нежелательными явлениями III и IV степени были гематологические — нейтропения и тромбоцитопения. Также наблюдалось повышение уровня билирубина, функциональных печеночных проб, липазы и глюкозы в крови. Эти изменения, как правило, были транзиторными и разрешались с течением времени. Они хорошо поддавались лечению и редко приводили к прекращению исследуемой терапии. Панкреатит был зафиксирован менее чем у 1% пациентов. Наиболее часто встречающиеся негематологические побочные эффекты включали сыпь, зуд, тошноту, утомляемость, головную боль, запор и диарею. Большинство из этих нежелательных явлений было легкой или средней степени тяжести.

Следует соблюдать меры предосторожности при назначении Тасигны пациентам с неконтролируемыми или серьезными заболеваниями сердца (например, инфаркт миокарда в недавнем анамнезе, застойная сердечная недостаточность, нестабильная стенокардия или клинически значимая брадикардия), а также больным с удлинением интервала QTc или вероятностью его развития. К этой

категории относятся пациенты с патологически низким уровнем калия или магния, с врожденным удлинением интервала QT, больные, принимающие антиаритмики или иные препараты, которые могут приводить к удлинению QT. Перед приемом Тасигны необходима коррекция низкого уровня калия или магния. Рекомендуются тщательное наблюдение за динамикой интервала QT и проведение эхокардиографии до начала терапии Тасигной и далее по клиническим показаниям.

Гливек

Гливек одобрен более чем в 90 странах, включая США, ЕС и Японию, в качестве препарата для лечения всех фаз Ph⁺-ХМЛ. Препарат также одобрен в США, ЕС и других странах для лечения пациентов с неоперабельными или метастатическими Kit (CD117)-положительными гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСТ). В США и ЕС Гливек в настоящее время одобрен в качестве препарата для послеоперационной терапии взрослых пациентов после выполнения радикальной резекции Kit (CD117)-положительных ГИСТ. В ЕС Гливек в сочетании с химиотерапией (ХТ) также одобрен в качестве препарата для лечения взрослых пациентов с впервые поставленным диагнозом Ph⁺-острого лимфолейкоза (Ph⁺-ОЛЛ) и в качестве монотерапии — у больных с рецидивирующим или рефрактерным Ph⁺-ОЛЛ. Препарат также одобрен для лечения взрослых пациентов с неоперабельной, рецидивирующей и/или метастатической выходящей дерматофибросаркомой, которым противопоказано оперативное вмешательство. Гливек одобрен и в качестве препарата для лечения миелодиспластических/миелопролиферативных заболеваний, гиперэозинофильного синдрома и/или хронического эозинофильного лейкоза.

Эффективность Гливек при ХМЛ основана на частоте достижения гематологического и цитогенетического ответов, а также выживаемости без прогрессирования; при Ph⁺-ОЛЛ, миелодиспластических синдромах/миелопролиферативных заболеваниях — на частоте получения гематологического и цитогенетического ответов; при системном мастоцитозе, гиперэозинофильном синдроме и/или хроническом эозинофильном лейкозе — на частоте достижения гематологического ответа; при неоперабельных или ГИСТ — на частоте получения объективного ответа и выживаемости без прогрессирования, при адъювантной терапии ГИСТ — на уровне безрецидивной выживаемости и при выходящей дерматофибросаркоме — на частоте достижения объективного ответа. Увеличение выживаемости в контролируемых исследованиях было продемонстрировано только для впервые установленного диагноза ХМЛ в ХФ и для ГИСТ.

Не в каждой стране препарат зарегистрирован сразу по всем перечисленным выше показаниям.

Безопасность применения

У большинства пациентов, получавших Гливек в клинических исследованиях, в какое-то время регистрировались нежелательные явления. Эти явления преимущественно были легкой или средней степени тяжести и не требовали прекращения лечения.

Профиль безопасности Гливека при всех показаниях был одинаковым. Наиболее распространенные побочные эффекты включали тошноту, поверхностные отеки, спазмы мышц, сыпь, рвоту, диарею, боли в животе, миалгии, артралгии, кровотечения, утомляемость, головную боль, боли в суставах, кашель, головокружение, диспепсию и одышку, дерматит, экзему и задержку жидкости, а также нейтропению, тромбоцитопению и анемию. Препарат продемонстрировал хорошую переносимость во всех проведенных исследованиях как в форме монотерапии, так и в сочетании с ХТ. Исключение составило транзитное токсическое воздействие на печень в форме повышения уровня трансаминаз и развития гипербилирубинемии при применении комбинации Гливека с высокодозной ХТ.

Редкие/серьезные нежелательные явления включали сепсис, пневмонию, депрессию, судороги, сердечную недостаточность, тромбоз/эмболию, кишечную непроходимость, панкреатит, печеночную недостаточность, эксфолиативный дерматит, ангионевротический отек, синдром Стивенса — Джонсона, почечную недостаточность, задержку

жидкости, отек (в том числе головного мозга и глаз, а также накопление жидкости в перикарде, брюшной полости и легких), кровотечение (в том числе в мозг, глаза, почки и желудочно-кишечный тракт), дивертикулит, перфорацию желудочно-кишечного тракта, кровоизлияние/некроз опухоли и остеонекроз/аваскулярный некроз шейки бедра.

Рекомендуется вести тщательное наблюдение за пациентами с заболеваниями сердца или факторами риска развития сердечной недостаточности. Требуется обследование и лечение пациентов с симптомами сердечной недостаточности и жалобами, соответствующими этому заболеванию. У больных с гиперэозинофильным синдромом и/или хроническим эозинофильным лейкозом, а также у пациентов с миелодиспластическими синдромами / миелопролиферативными заболеваниями с высоким уровнем эозинофилов необходимо проведение скрининга на заболевания сердца (эхокардиография, уровень тропонина в сыворотке).

Гливек противопоказан пациентам с гиперчувствительностью к иматинибу или каким-либо его компонентам в анамнезе. Женщинам детородного возраста рекомендуется воздержаться от беременности при приеме препарата.

Novartis International AG
Novartis Global Communications
CH-4002 Basel,
Switzerland

Л и т е р а т у р а

1. Saglio G., Kim D.W., Issaragrisil S. et al. Nilotinib demonstrates superior efficacy compared with imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: Results from the International Randomized Phase III ENESTnd Trial.
2. Tasigna (nilotinib) European Summary of Characteristics. Novartis AG. <http://www.tasigna.com/en/tasigna-product-information.jsp#>
3. Novartis data on file

4. NCCN Practice Guidelines in Oncology — v.1.2010. Chronic Myelogenous Leukemia.
5. National Cancer Institute. General Information About Chronic Myelogenous Leukemia (PDQ). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/CML/patient/> Accessed March 2009.
6. American Cancer Society. Detailed Guide: CML. What are the key statistics about CML? Available at: <http://www.can->

- cer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1x_What_Are_the_Key_Statistics_About_Chronic_Myeloid_Leukemia_CML.asp?rnav=crl Accessed April 2009.
7. Central European Leukemia Study Group. About CML. [Cited 2009 Jan 13] Available from: <http://www.cml-info.com/de/healthcare-professionals/about-cml.html>
8. Glivec® (imatinib) prescribing information. Novartis International AG; March 2009, Basel, Switzerland.