

Материалы VI симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, 29—31 января 2009 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ LNA В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Абрамов^{1,2}, А.С. Белохвостов^{1,2}, А.Р. Зарецкий^{1,2}, А.Г. Притыко², С.А. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²НПЦ медицинской помощи детям с пороками развития черепно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы, Москва

Введение. Развитие опухоли сопровождается выходом опухолевой ДНК в кровоток. Однако определение мутантных генов опухолевого происхождения в биологических жидкостях осложняется наличием большого избытка тех же генов дикого типа (без мутаций) за счет неопухолевых клеток организма. Использование комплементарных LNA-олигонуклеотидов (locked nucleic acids), где вместо обычных рибонуклеотидов находятся рибонуклеотиды с замкнутым кольцом рибозы в позициях С₂ и С₄ и метильная группа, повышает температуру плавления цепей примерно на 20°C по сравнению с обычными нуклеотидами. Наличие мутации в гене снижает температуру плавления гибрида с LNA почти на 15—20°C. Таким образом, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицируются только мутантные копии гена и далее проводится SSCP-электрофорез или определение замены нуклеотида секвенированием.

Материалы и методы. В стандартную ПЦР-смесь добавляли LNA-олигонуклеотиды, комплементарные с последовательностью В-гаф, а также специальную полимеразу, во избежание нуклеазной активности по отношению к LNA. ПЦР проводили по стандартной программе со стандартными праймерами.

Результаты. Установлено, что в контрольных пробах без мутации амплификации продукта не происходит, так же как и в ряде исследуемых проб от пациентов. Контрольные пробы с наличием мутации показывали хороший продукт амплификации. При этом их амплификация при добавлении 10-кратного количества контроля без мутаций никак не изменялась, так же как и не изменялась при добавлении 20-кратного количества LNA. В последующем такой же продукт амплификации был получен в ряде проб исследуемых пациентов. Таким образом, метод LNA-ПЦР позволяет повысить эффективность исследования мутантных генов при онкодиагностике.

ОСОБЕННОСТИ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Т.П. Аносова¹, М.П. Аносов¹, С.В. Черно²

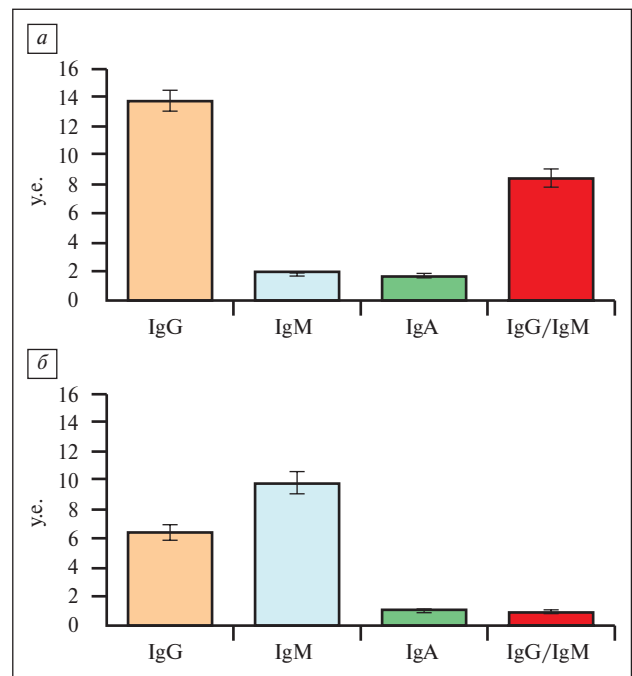
¹Институт экологии человека СО РАН, Кемерово;

²ГОУ Кемеровская государственная медицинская академия

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы крови мужчин больных раком легкого — РЛ ($n=110$) и здоровых ($n=100$), без заболеваний легких в анамнезе. Определение антител к конъюгату бензо(а)пирен-бычий сывороточный альбумин (БП—БСА) проводили с помощью модифицированного иммуноферментного метода, разработанного в нашей лабора-

тории. Полученные результаты выражали в условных единицах (у.е./мл).

Результаты. Обнаружено, что в сыворотке крови как у больных РЛ, так и у здоровых мужчин содержатся антитела к конъюгату БП—БСА классов А, G, M, причем их содержание в опытной и контрольной группах достоверно различается по всем 3 классам иммуноглобулинов (Ig). На основании полученных результатов нами был введен условный показатель — отношение содержания антител класса IgG к антителам класса IgM. При сравнении опытной и контрольной групп выяснилось, что при развитии РЛ значение этого показателя увеличивается почти на порядок во всех рассматриваемых группах (см. рисунок).



Отношение содержания антител классов А, G, M к конъюгату БП—БСА и соотношение IgG/IgM у больных РЛ (а) и у здоровых доноров (б)

Выводы. Достоверные различия между больными РЛ и здоровыми мужчинами обнаружены по всем 3 классам Ig, при этом у пациентов с РЛ наблюдается увеличение содержания антител класса IgG и снижение содержания антител класса IgM к БП—БСА, а значение показателя IgG/IgM возрастает почти на порядок по сравнению с контрольной группой.

СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЫ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

И.М. Бархатов¹, С.А. Румянцев², Е.Б. Владимировская², Б.В. Афанасьев¹

¹ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. В условиях монослойной культуры клетки пуповинной крови (ПК) способны прикрепляться к пластику и по своей морфологии напоминают культивируемые в сходных условиях мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга. Однако присутствие в прилипающей фракции ПК МСК до сих пор не является очевидным. Данное исследование выполнено с целью определения состава и ряда функциональных свойств МСК-подобных клеток в монослойной культуре ПК (МКПК) человека.

Материалы и методы. Исследованы 43 образца ПК, полученные в процессе срочных родов на фоне неосложненной беременности у рожениц при атравматичном заборе. Исследования проводили после 19–31 ч хранения образца. Ядросодержащие клетки выделяли на градиенте плотности фиколла (1,077 г/мл), затем помещали в полную культуральную среду, содержащую среду DMEM LG, 30% эмбриональную телячью сыворотку, пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл). Анализ фенотипа МК ПК и ее моноклеарной фракции проводили на проточном цитофлуориметре FACScan. Были использованы следующие конъюгированные флуорохромами антитела: CD34 PE; CD34 FITC, CD45 FITC; CD45 PE; CD14 FITC; CD31 PE; CD31 FITC; CD61 FITC; CD3 FITC; CD19 PE; CD117 PE; HLA ABC FITC; HLA DR. Для определения гемостимулирующих свойств МК ПК проводили клонирование гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (КОЕ-ГМ) в культуральной системе «агаровая капля-жидкая среда». В качестве источника колониестимулирующей активности ПК использовали МКПК. Клетками-мишенями были КОЕ-ГМ моноклеарной фракции ПК, дающие клональный рост в агаровой культуре. Для индукции дифференцировки МСК-подобных клеток ПК в адипогенном и остеогенном направлениях клетки помещали в полную среду с добавлением дексаметазона (1×10^{-7} М), инсулина (1×10^{-9} М) или β -глицерофосфата (7×10^{-3} М); дексаметазона (1×10^{-8} М); аскорбиновой кислоты (2×10^{-4} М) соответственно. Оценка экспрессии генов (*CDH11*, *VCAM1*, *ITGB1*, *IL6ST*, *TFRC*, *ALCAM*, *MPL*, *TPO*, *ENG*, *NTSE*, *IL6R*, *BGLAP*, *COL1A2*, *AFP*, *LPL*, *ACTA1*, *TNNI3*, *TPM1*) проводилось методом RT-PCR (амплификация продуктов обратной транскрипции).

Результаты. В большинстве случаев культура клеток, прилипших к пластику, была гетерогенна: имели место узкие веретенообразные клетки и большие полигональные. В ряде образцов обнаруживали небольшие колонии (до 100 клеток). В 3 из 43 исследованных образцов ПК наблюдали крупные колонии численностью >1000 плотноупакованных, имеющих типичную для фибробластов веретенообразную форму клеток. При анализе преобладающих клеточных типов выявлено, что большую часть прикрепленных к пластику клеток составляли гемопоэтические стволовые клетки — ГСК (медиана — 60,17%). Около трети всей CD45-положительной популяции — CD14-положительные клетки. Остальные негемопоэтические клетки представляли собой фенотипически гетерогенную популяцию. На фоне длительного культивирования и последовательного пассирования фенотип культуры меняется — отмечаются элиминация из культуры ГСК и увеличение доли МСК и ЭКП. При инициации культуры значительно изменяется соотношение ГСК- и ЭКП-подобных клеток среди CD34-положитель-

ной популяции в пользу ЭКП. МСК-подобные клетки МКПК способны к дифференцировке в адипоциты и остеобласты, что подтверждается специфической окраской и свидетельствует об их функциональной состоятельности. В ряде культур индукция дифференцировки инициировала открепление большей части клеток. Прилипающая фракция первичной монослойной культуры оказывает стимулирующее влияние на колониобразование КОЕ-ГМ, по характеру и силе воздействия близкое стандартному лейкоцитарному фидеру. Преимущественное влияние на их пролиферативную активность оказывают клеточные элементы с маркерами МСК (CD90⁺CD31⁻). Удлинение временных параметров получения и хранения образцов ПК приводит к снижению гемостимулирующей активности. При сравнении экспрессии ряда генов выявлено, что профиль экспрессии МСК костного мозга и клеток МКПК идентичен за исключением тромбозина, экспрессия гена которого не отмечалась в МКПК.

Выводы. ПК содержит субпопуляции клеток негемопоэтического происхождения, фенотипически и функционально сходных с МСК костного мозга. Однако их низкая концентрация, а также сниженная репопулирующая активность в стандартных культуральных условиях ставят под сомнение возможное использование ПК в качестве альтернативного источника МСК.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Е.В. Боякова^{1,2}, А.Б. Пашенко^{1,2}, Н.В. Короткова^{1,2}, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Число трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови (ПК) в последние годы постоянно возрастает. Основным осложнением трансплантации ГСК является реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), развитие которой связывают с попаданием реципиенту лимфоцитов донора.

Цель исследования — изучение иммунологических характеристик лимфоцитов ПК и влияние на состав лимфоцитов процедуры выделения лейкоцитарной фракции ПК.

Материалы и методы. Материалом служила ПК 30 доношенных новорожденных, родившихся на 37–42-й неделе гестации. ПК забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5–15 мин после родов. Число субпопуляций лимфоцитов определялось при помощи проточной цитофлуориметрии до и после проведения процедуры выделения лейкоцитарной фракции ПК.

Результаты. Показано, что число CD3⁺-лимфоцитов не отличалось до и после процедуры концентрации и составляло 17,9±1,44 и 19,2±1,4% всех ядросодержащих клеток соответственно. Число и соотношение CD3⁺CD4⁻ и CD3⁺CD8⁻-клеток в процессе концентрации также не изменилось и составило: до концентрации CD3⁺CD4⁺-клетки 12,62±1,12%, CD3⁺CD8⁺-клетки 5,62±0,53%; после концентрации CD3⁺CD4⁺-клетки 13,23±1,12%, CD3⁺CD8⁺-клетки 5,52±0,48% всех ядросодержащих клеток. Доля натуральных киллеров (NK) CD16⁺CD56⁺-клеток среди ядросодержащих клеток ПК

равнялась $5,97 \pm 0,67\%$ и достоверно увеличилась после процедуры концентрации — $8,54 \pm 0,91\%$ ($p=0,027$). Доля $CD33^+CD13^+$ -клеток была $12,5 \pm 0,76\%$ и возросла — $15,82 \pm 0,81\%$ ($p=0,005$) после процедуры выделения, что может быть связано с большей потерей гранулоцитов при проведении выделения. Доля активированных лимфоцитов не изменилась и составила $0,40 \pm 0,08\%$ до выделения и $0,38 \pm 0,09\%$ после. Число $CD14^+$ -клеток не увеличилось: $8,65 \pm 1,58\%$ до выделения и $9,11 \pm 1,76\%$ после. Число $CD15^+$ -клеток имело тенденцию к снижению, по-видимому, вследствие большей потери при процедуре выделения по сравнению с остальными субпопуляциями лейкоцитов, и составило $39,32 \pm 3,45\%$ до выделения и $35,23 \pm 3,26\%$ после.

Вывод. Полученные данные позволили охарактеризовать состав лимфоцитов ПК и продемонстрировали отсутствие влияния процедуры концентрации ПК на число и состав $CD3^+$ -лимфоцитов в сочетании с достоверным увеличением после концентрации доли NK- и $CD33^+CD13^+$ -клеток.

СУБПОПУЛЯЦИИ $CD34^+$ - И $CD133^+$ -КЛЕТОК ПУПОВИНОЙ КРОВИ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Е.В. Боякова^{1,2}, А.Б. Пашенко^{1,2}, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. В последние годы все больше внимания уделяется пуповинной крови (ПК) как источнику гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации при ряде гематологических и онкологических заболеваний. Целью настоящего исследования стала оценка состава пула стволовых клеток ПК и влияния процесса выделения лейкоцитарной фракции ПК на число стволовых клеток.

Материалы и методы. В качестве материала взята ПК 47 доношенных новорожденных, родившихся на 37–42-й неделе гестации. ПК забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5–15 мин после родов. Состав пула стволовых клеток определяли при помощи проточной цитофлуориметрии до и после проведения процедуры выделения лейкоцитарной фракции ПК.

Результаты. Показано, что доля $CD34^+$ -клеток в ПК составила $1,3 \pm 0,21\%$ общего числа ядросодержащих клеток. Число наиболее ранних клеток-предшественников — $CD34^+CD133^+$ — $0,46 \pm 0,05\%$, мезенхимальных стволовых клеток — $CD133^+CD106^+$ — $0,48 \pm 0,07\%$, а эндотелиальных клеток-предшественников — $CD133^+CD31^+$ — $0,88 \pm 0,11\%$. Число субпопуляций стволовых клеток после процедуры концентрации было следующим: $CD34^+$ -клетки — $1,23 \pm 0,27\%$, $CD34^+CD133^+$ — $0,44 \pm 0,05\%$, $CD133^+CD106^+$ — $0,46 \pm 0,06\%$, $CD133^+CD31^+$ — $0,80 \pm 0,08\%$ общего числа ядросодержащих клеток. Число субпопуляций $CD34^+$ -клеток в процессе процедуры выделения не изменилось и составило: $CD34^+CD61^+$ — $0,45 \pm 0,07\%$; $CD34^+CD38^+$ —

$0,77 \pm 0,12\%$; $CD34^+CD71^+$ — $0,96 \pm 0,22\%$ до процедуры выделения и $CD34^+CD61^+$ — $0,42 \pm 0,08\%$; $CD34^+CD38^+$ — $0,74 \pm 0,15\%$; $CD34^+CD71^+$ — $0,79 \pm 0,19\%$ — после. Число $CD34^+CD38^+$ - и $CD34^+CD71^+$ -клеток в процессе процедуры выделения также осталось без изменений и составило: $CD34^+CD38^+$ -клетки — $14,99 \pm 2,27\%$; $CD34^+CD71^+$ — $23,8 \pm 3,22\%$ до процедуры выделения и $CD34^+CD38^+$ — $16,43 \pm 2,83\%$; $CD34^+CD71^+$ — $22,12 \pm 3,14\%$ после.

Вывод. Полученные данные позволили охарактеризовать состав пула стволовых клеток ПК и продемонстрировали отсутствие влияния процедуры концентрации ПК на число и состав стволовых клеток.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ ВНОВЬ РАЗРАБОТАННЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ НОВОГО КЛАССА В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Е.Ю. Григорьева, Ю.В. Стукалов, Е.Ю. Колдаева
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Принципиальным требованием к препаратам—носителям опухолеспецифических веществ является их низкая токсичность. Носитель, связывающий опухолеспецифическое вещество с терапевтическим агентом (радионуклид, токсин), должен быть не токсичен в дозах, используемых для противоопухолевой терапии. К основным токсикологическим характеристикам вещества относятся: порог острого действия (Lim ac), максимально переносимая (МПД), среднесмертельная (LD50) и абсолютно смертельная (LD100) дозы, возникающие побочные эффекты. Токсичность также характеризует средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных при введении вещества в различных дозах.

Материалы и методы. В эксперименте использовали мышей Valb/c. Соединения вводили внутривенно однократно в 0,2 мл 10% ДМСО в физиологическом растворе в дозах: полигидроксиаминоен-06 — 62,5, 125, 187,5, 250, 375, 500, 750 и 1000 мг/кг; полигидроксиаминоен-07 — 62,5, 125, 187,5, 250, 375, 500, 750, 1000, 1250 и 1500 мг/кг; гидроксильированный полигидроксиаминоен-07 — 100, 250, 400, 550, 700, 850, 1000 и 1200 мг/кг. Указанные дендримеры отличаются химическим строением исходных дендронов. Структуры исследованных дендримеров не приводятся вследствие прохождения стадии их патентования. Наблюдение за животными осуществляли в течение 1 мес. У павших мышей макроскопически оценивали изменения внутренних органов. Определяли значения Lim ac, МПД, LD100 и по методу Кербера — LD50. Рассчитывали зону острого токсического действия (LD50/Lim ac) и СПЖ при разных дозах.

Результаты и выводы. В ходе проведенных исследований были определены параметры токсикометрии исследуемых соединений (см. таблицу).

Соединение	МПД, мг/кг	LD100, мг/кг	LD50, мг/кг	LD50/Lim ac	СПЖ при LD50, ч
Полигидроксиаминоен-06	250	1000	500	2,00	72±15,6
Полигидроксиаминоен-07	375	1500	771	2,05	96±14,4
Гидроксильированный полигидроксиаминоен-07	550	1200	804	1,46	72±14,5

Введение в сублетальных дозах не сопровождалось видимыми нарушениями в состоянии и поведении животных. Введение доз выше МПД вызывало в течение первых 30 мин наступление сопорозного состояния без признаков атаксии или местных парезов. При летальных дозах смерть наступала в течение 0,5—144 ч в зависимости от дозы. На вскрытии: сердце, почки, селезенка и легкие макроскопически без выраженной патологии, печень гиперемирована, желчный пузырь увеличен в объеме. Тонкий кишечник содержал кровь. На основании вышеизложенного можно говорить о гепато-, энтеро- и нейротоксичности соединения в высоких дозах. У выживших животных отмечали транзиторную потерю 5—10% массы тела в течение первых 5 дней после введения испытываемого вещества. Впоследствии у мышей восстанавливалась исходная масса тела. Признаков хронической интоксикации не наблюдали. Полученные результаты согласуются с данными Merck Index (13.1), показавшего низкую токсичность исходного соединения в опытах на крысах (LD50 при пероральном введении крысам составляет 12,76 г/кг массы тела). Таким образом, изученные дендримеры могут быть использованы в создании конструкций для таргетной терапии опухолей, поскольку их концентрации, вводимые с конструкцией в организм, намного меньше $Lim\ as$ и МПД, а побочных эффектов в данных дозах не наблюдается.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *c-kit* У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Л.В. Гук

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

Введение. Ген *c-kit*, расположенный в локусе 4q12, является членом семейства тирозинкиназных рецепторов и в норме играет ключевую роль в пролиферации, выживании и дифференцировке кроветворных клеток-предшественников. Рецептор *c-kit* экспрессируется на CD34⁺ стволовых клетках и гемопоэтических предшественниках. При патологии, экспрессия *c-kit* встречается на бластных клетках при всех FAB-типах острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) и при хроническом миелоидном лейкозе в стадии бластного криза. Экспрессия *c-kit* обнаруживается на миелобластах в 60—80% случаев развития ОМЛ, в 75% случаев миелодиспластического синдрома, в 4% случаев острого лимфобластного лейкоза. Также экспрессия *c-kit* обнаруживается в 95% случаев рецидива ОМЛ. У взрослых пациентов с ОМЛ был проведен обширный мутационный анализ гена *c-kit*, который показал, что мутантная форма гена встречается в 30% случаев так называемой СВФ подгруппы ОМЛ, которая ассоциирована с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)* или *t(8;21)(q22;q22)* и составляет приблизительно 10—15% всех случаев ОМЛ. При других формах ОМЛ мутации в гене *c-kit* встречаются значительно реже. Кроме того, было показано, что мутации гена *c-kit*, особенно те из них, которые затрагивают 17-й экзон, связаны с плохим прогнозом. Анализ небольшого числа случаев развития ОМЛ у детей показал, что мутации в гене *c-KIT* встречаются у 11% пациентов.

Цель исследования — выявить у пациентов с ОМЛ мутации в кодирующей последовательности 8, 9, 10, 11, 17, 18-го экзонов гена *c-kit*, включая области экзон-интронных соединений, при использовании метода прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы. В исследование включены 59 пациентов с диагнозом ОМЛ, с различными вариантами основного заболевания по FAB-классификации. М1 — 2 пациента (3,3%), М2 — 17 (28,8%), М3 — 6 (10,%), М4 — 9 (15,2%), М5 — 7 (11,8%), М5а — 4 (6,7%), М5b — 2 (3,3%), М6 — 3 (5%), М7 — 3 (5%), вторичный ОМЛ — 1 (1,69%), недифференцированный вариант ОМЛ — 2 (3,3%), другие диагнозы — 3 (5%). Возраст пациентов варьировал в пределах от 1 мес до 17 лет (медиана 8,5 года), из них 37 (62,7%) мальчиков и 22 (37,2%) девочки. Соотношение пациентов мужского и женского пола — 1,68:1. В качестве контрольной группы использовалась венозная кровь 32 здоровых людей.

Выделяли ДНК из костного мозга, венозной крови и из мазков со стекол в соответствии с методикой производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной двухпраймерной схеме. Определение нуклеотидной последовательности образцов выполняли методом прямого автоматического секвенирования на приборе Applied Biosystems 3130xl согласно протоколу фирмы-производителя.

Результаты. В таблице представлено краткое описание пациентов, найденные мутации и их местоположение.

№	Возраст	Диагноз	Цитогенетика	Ген, экзон	Мутация
10	9 лет	ОМЛ М4	t(6;11)dup11MLL/MLL	<i>c-KIT</i> , 8	Инсерция
11	16 лет	ОМЛ М4	Inv.16CBFB/МУН11	<i>c-KIT</i> , 8	Инсерция
14	5 лет	ОМЛ М2	t(8;21)AML/ЕТО	<i>c-KIT</i> , 9	Инсерция
12	1 мес	ОМЛ М5а	Данных нет	<i>c-KIT</i> , 10	Замена p.546 Lys>Lys (c.1638A>G)
70	15 лет		Транслокаций не выявлено	<i>c-KIT</i> , 10	Замена p.546 Lys>Lys (c.1638A>G)

Вывод. При анализе 8, 9, 10, 11, 17, 18-го экзонов гена *c-kit* выявлены мутации: в 8-м экзоне — в 3,3% случаев, в 9-м в 1,69% и в 10-м в 3,3%.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *FLT3* У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Л.В. Гук

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

Введение. Ген *FLT3* является членом семейства тирозинкиназных рецепторов и в норме играет важную роль в пролиферации, выживании и дифференцировке кроветворных клеток-предшественников. Ген *FLT3* экспрессируется CD34⁺ стволовыми клетками и незрелыми гемопоэтическими клетками. При патологии экспрессия *FLT3* обнаруживается в бластных клетках при остром миелобластном (ОМЛ) и остром лимфобластном лейкозах, а также при хроническом миелоидном лейкозе в стадии бластного криза. Лейкемические клетки экспрессируют *FLT3* в 70—100% случаев ОМЛ. Точечные мутации в гене *FLT3* найдены приблизительно в 10% случаев ОМЛ всех типов, в 11—

14% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом и в 14—24% случаев ОМЛ с *inv* (16). Кроме точечных мутаций, при ОМЛ часто выявляются внутренние тандемные дупликации (ITDs, *internal tandem duplications*) определенных участков *FLT3* гена. Мутации *FLT3*-ITD обнаруживаются приблизительно в 20% случаев всех типов ОМЛ и в 28—34% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом.

Цель исследования — выявить у пациентов с ОМЛ мутации в кодирующей последовательности 14, 15, 20-го экзона гена *FLT3*, включая области экзон-интронных соединений, при использовании метода прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы. В исследование включены 59 пациентов с диагнозом ОМЛ, с различными вариантами основного заболевания по FAB-классификации. M1 — 2 пациента (3,3%), M2 — 17 (28,8%), M3 — 6 (10,%), M4 — 9 (15,2%), M5 — 7 (11,8%), M5a — 4 (6,7%), M5b — 2 (3,3%), M6 — 3 (5%), M7 — 3 (5%), недифференцированный вариант ОМЛ — 2 (3,3%), вторичный ОМЛ — 1 (1,69%), другие диагнозы — 3 (5%). Возраст пациентов варьировал в пределах от 1 мес до 17 лет (медиана 8,5 года), из них 37 (62,7%) мальчиков и 22 (37,2%) девочки. Соотношение пациентов мужского и женского пола 1,68:1. В качестве контрольной группы использовалась венозная кровь 32 здоровых людей.

Выделяли ДНК из костного мозга, венозной крови и с мазков на стеклах в соответствии с методикой производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной двухпраймерной схеме. Определение нуклеотидной последовательности образцов выполняли методом прямого автоматического секвенирования на приборе Applied Biosystems 3130xl согласно протоколу фирмы-производителя.

Результаты. В таблице представлено краткое описание пациентов, найденные мутации и их местоположение.

№	Возраст, годы	Диагноз	Цитогенетика	Ген, экзон	Мутация
1	11	ОМЛ M2	Транслокаций не выявлено	<i>FLT3</i> , 14	ITD части 13 интрона и первых 29 нуклеотидов 14-го экзона
4	13	ОМЛ M2	Транслокаций не выявлено	<i>FLT3</i> , 14	ITD части 13 интрона и первых 10 нуклеотидов 14-го экзона
5	5	ОМЛ M2	del16q23	<i>FLT3</i> , 14 интрон	ITD размером 76 нуклеотидов внутри 14-го экзона

Вывод. У 5% пациентов выявлены ITDs мутации в 14-м экзоне гена *FLT3*.

ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНАЯ СИСТЕМА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ГЕМОБЛАСТОЗОВ У ДЕТЕЙ
Д.А. Домнинский

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

Введение. Создание эффективных и высокочувствительных методов диагностики первичных генетических aberrаций в опухолевых клетках — важная задача современной онкологии. Именно первичные мутации являются уникальным маркером каждой опухолевой клетки, и хотя в процессе эволюции опухоли и возникают все но-

вые клеточные субклоны, несущие различные вторичные изменения, все они сохраняют первичную aberrацию.

Для большинства гематологических опухолей сегодня известны специфические первичные генетические aberrации. Они представляют собой реципрокные хромосомные транслокации, приводящие к слиянию частей двух разных генов и образованию патогенных химерных генов.

Материалы и методы. Мы предлагаем быстрый и надежный метод молекулярного мониторинга лечения на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) участков ДНК в области рекомбинации. Для этого используется усовершенствованная процедура инверсионного метода ПЦР с матрицы геномной ДНК, амплифицирующая в виде небольших (0,5—2,5 тыс. пар нуклеотидов) ДНК-фрагментов области рекомбинации (так называемые точки разрыва хромосом), содержащие последовательности обоих хромосом, участвующих в транслокации. Дальнейшее прямое секвенирование позволяет определить местоположение точек разрыва в хромосомах и подобрать пару праймеров для создания ПЦР-тест-систем на матрице геномной ДНК. Так как у разных пациентов точки разрыва ДНК локализируются в различных участках протяженных интронных последовательностей, полученная тест-система является, по сути, специфичной для конкретного пациента.

Приведены первые данные по идентификации точек разрыва и созданию тест-систем, полученные для нескольких пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, лейкозные клетки которых несут хромосомную транслокацию t(9;22).

Выводы. Предлагаемый метод имеет целый ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами ПЦР-диагностики хромосомных транслокаций:

— применение для анализа геномной ДНК, а не РНК позволяет существенно повысить надежность метода, исключив возможность контаминации;

— чувствительность метода на 2—3 порядка выше;

— изменение качественного и количественного характера анализа (тестируются все клетки, несущие хромосомную транслокацию, а не только те, которые экспрессируют химерный ген);

— анализ является индивидуальным, специфичным для каждого пациента (вероятность того, что у разных пациентов одна пара праймеров

будет давать идентичные ПЦР-фрагменты, крайне мала);

— метод позволяет тестировать любой, даже неизвестный ген-партнер, вовлеченный в хромосомную транслокацию.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК G62-СИНТЕАЗЫ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ

А.Е. Друй¹, Г.А. Цаур^{2,3}, А.М. Попов^{1,2,3}, Е.В. Шориков^{2,3}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{2,3}

¹Уральская государственная медицинская академия; ²Областная детская клиническая больница №1; ³ГУЗ СО Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Введение. Выявление поражения костного мозга (КМ) при нейробластоме необходимо для корректного определения клинической стадии заболевания, мониторинга остаточного поражения КМ, оценки контаминации опухолевыми клетками аутотрансплантата. Одним из часто применяемых молекулярных маркеров для детекции микрометастазов нейробластомы в КМ является матричная РНК (мРНК) гена $\beta 1,4$ -N-ацетилгалактозаминилтрансферазы (GD2-синтетазы).

Материалы и методы. Проведена сравнительная оценка экспрессии мРНК *GD2-синтетазы* в клетках нейробластомы линий IMR-32 и SK-N-MC, в КМ здоровых доноров, а также КМ и периферической крови (ПК) пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Информированное согласие на проведение диагностических мероприятий получено во всех случаях. На первом этапе для создания калибровочной кривой были приготовлены десятикратные разведения РНК, выделенной из опухолевых клеток клеточных линий нейробластомы, РНК, полученной из ПК доноров. РНК была выделена с использованием TriReagent («Sigma-Aldrich», США). Качественная и количественная оценка полученной РНК осуществлялась методом капиллярного электрофореза с одновременной детекцией флуоресценции на приборе Agilent 2100 («Caliper Technologies», США), а также спектрофотометрически. В реакцию обратной транскрипции брали 1 мкг РНК с показателем целостности не менее (Е.Р. Семенихина, 2006). Для оценки экспрессии мРНК *GD2-синтетазы* проводили мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием TaqF-полимеразы (ЦНИИЭ, Россия) на амплификаторе IQ5 («Bio-Rad», США). В ПЦР-РВ вносили 100 нг РНК. В качестве референсного гена был использован *ABL*. Экспрессия мРНК *GD2-синтетазы* выражалась в виде нормализованного числа копий, которое рассчитывалось как отношение числа копий *GD2-синтетазы* к количеству копий *ABL*, умноженное на 10 000. Все образцы тестировались в 2 повторах для исключения случайной ошибки.

Результаты. Выявлено, что клеточные линии IMR-32 и SK-N-MC по-разному экспрессируют мРНК *GD2-синтетазы*. Нормализованное число копий мРНК *GD2-синтетазы*, выделенной из 1 млн клеток, составило $10\,632 \pm 1553$ и 5599 ± 1301 соответственно. На втором этапе была определена чувствительность данного исследования. Для этого проведены разведения клеток линии IMR-32 смесью лейкоцитов, полученной из ПК 5 здоровых доноров. Максимальным разведением, в котором определялась экспрессия *GD2-синтетазы*, было 10^{-4} , и она составила $0,88 \pm 0,09$. Для оценки специфичности метода была произведена оценка экспрессии *GD2-синтетазы* в образцах КМ здоровых доноров. Поскольку при исследовании 11 образцов КМ здоровых доноров в 2 случаях имела место экспрессия *GD2-синтетазы*, то на следующем этапе мы определили пороговый уровень, при превышении которого образцы следует оценивать как позитивные. Пороговый уровень рассчитывался как среднее + 4SD. Среднее число копий мРНК *GD2-синтетазы* в КМ здоровых доноров составило $0,29 \pm 0,05$. Пороговый уровень был равен 0,49 и для удобства практического применения принят как 0,5. После этого была определена экспрессия мРНК *GD2-синтетазы* в КМ пациентов с ОЛЛ, величина которой составила $699,02 \pm 79,38$.

Заключение. В силу относительно невысокой специфичности использование мРНК *GD2-синтетазы* в качестве молекулярного маркера поражения КМ клетками нейробластомы, а также для оценки эффективности лечения нецелесообразно. В связи с этим планируется исследование экспрессии других молекулярно-генетических маркеров, таких как мРНК тирозингидроксилазы, и ряда других, с целью увеличения чувствительности и специфичности метода. Для выяснения природы клеток, экспрессирующих *GD2-синтетазу*, у пациентов с ОЛЛ необходимо проведение дальнейших исследований с использованием клеточной сортировки.

ПРИЖИЗНЕННАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЯ — НОВЫЙ МЕТОД ОБЪЕКТИВИЗАЦИИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ФУНКЦИОНИРУЮЩИЙ ГЕНОМ

А.В. Жукоцкий^{1,2}, В.Ф. Ситников², Н.И. Якубова^{1,2}, А.М. Колбцев^{1,2}, О.А. Каткова-Жукоцкая^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}, Э.М. Коган¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва

Введение. Как известно, наноматериалы обладают как минимум тремя характеристическими свойствами, исследование которых представляет особый интерес для биомедицины. Во-первых, высокая удельная поверхность наночастиц — НЧ (>100 м²/г) обеспечивает значительный запас свободной энергии, позволяющий им преодолевать гистогематические барьеры организма, проникать в цитоплазму, а также в интерфазный хроматин ядер клеток эукариот. Во-вторых, наличие размерных эффектов НЧ (зависимость физико-химических характеристик НЧ от их размеров) обеспечивает особый интерес к ним как к принципиально новому источнику диагностической информации. Например — использование НЧ «квантовых точек» в онкодиагностике. И, наконец, способность наноструктур к самоорганизации (самоорганизация дендример) представляет особый интерес для репаративной медицины.

Материалы и методы. Представлены данные о взаимодействии НЧ с геномом клеток эукариот на морфофункциональном уровне организации наследственного материала (интерфазный хроматин). Геном — полная генетическая система клеток, определяющая характер онтогенетического развития организма и наследственную передачу в ряду поколений всех его структурных и функциональных признаков. На надмолекулярном уровне геном, представленный у эукариот интерфазным хроматином (ИХ) ядер клеток, является ультрадисперсной наносистемой, следовательно, согласно принципу мишени, ИХ — лимитирующее звено надмолекулярных механизмов взаимодействия НЧ — геном, реализуемых конформационными переходами в ИХ. Нами разработана новая информационная биотехнология (ИТ), состоящая из метода компьютерной морфоденситометрии (КМДМ), позволяющая объективизировать субклеточные механизмы взаимодействия НЧ и ИХ. Практическая значимость данной ИТ определяется тем, что КМДМ, сопряженная с неинвазивной прижизненной микроскопией, позволяет количественно анализировать динамику взаимодействия НЧ с геномом эукариот.

**ПРИМЕНЕНИЕ АНТИЛИМФОЦИТАРНОГО ГЛОБУЛИНА
В МИЕЛОАБЛАТИВНЫХ РЕЖИМАХ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ
ПРИ АЛЛОГЕННЫХ НЕРОДСТВЕННЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЯХ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Ю.Р. Залялов, А.А. Ганапиев, А.Ю. Зинченко,
Б.В. Афанасьев

*НИИ детской гематологии и трансплантологии
им. Р.М. Горбачевой, ГОУ ВПО Санкт-Петербургский го-
сударственный медицинский университет им. И.П. Пав-
лова*

Введение. Аллогенная неродственная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является основным методом при отсутствии в семье совместимого по системе HLA родственного донора. Применение миелоаблативных режимов кондиционирования перед аллогенной ТГСК приводит к полной элиминации иммунокомпетентных клеток реципиента, что позволяет уменьшить частоту отторжений донорского трансплантата и вероятность прогрессии основного заболевания, особенно у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, эффект «трансплантат против лейкоза» у которых выражен слабее, чем при миелопролиферативных заболеваниях. До настоящего времени нет единого мнения о необходимости применения дополнительной иммуносупрессии антитимоцитарным глобулином (АТГ) в миелоаблативных режимах кондиционирования при выполнении аллогенных неродственных ТГСК от HLA-идентичных доноров.

Материалы и методы. Мы проанализировали результаты аллогенной неродственной трансплантации от HLA-совместимых доноров у 31 пациента, который получил миелоаблативные режимы кондиционирования с бусульфамом и циклофосфаном. Профилактика реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) проводилась с применением циклоспорина (А) и коротких курсов метотрексата (М). В зависимости от использования в режимах кондиционирования АТГ они были разделены на 2 группы. В контрольной группе представлено 25 пациентов, которые получили АТГАМ в курсовой дозировке 60 мг/кг. У 20 (80%) из них были лимфопролиферативные заболевания и у 21 (84%) высокий риск прогрессии основного заболевания. В основном, в качестве источника стволовых клеток использовалась периферическая кровь (80%). Медиана возраста пациентов контрольной группы — 12 (1–30) лет. В исследуемой группе было 6 пациентов, 4 (66%) из которых имели диагноз лимфопролиферативного заболевания, 5 (83%) — с высоким риском рецидива/прогрессии основного заболевания. В 83% использовалась периферическая кровь как источник ГСК. Медиана возраста в этой группе составила 18 (5–25) лет.

Результаты. Отторжение трансплантата произошло у 1 (16%) больного из исследуемой группы, тогда как у пациентов, получивших АТГ, не было ни одного случая неприживления донорского трансплантата ($p=0,04$). Вероятность развития острой РТПХ II–IV и III–IV степени составила 100% против 32% ($p=0,005$) и 40% против 8% ($p=0,05$) в исследуемой и контрольной группах соответственно. Не было статистически достоверного отличия в обеих группах по частоте возникновения распространенной формы хронической РТПХ: 50 и 39% ($p=0,6$). Ни у кого из исследуемой группы в течение 3 лет не отмечено рецидива/прогрессии основного заболевания, тогда

как вероятность этого осложнения у пациентов с АТГ в режиме кондиционирования составила 27% за тот же период времени ($p=0,3$). Общая 3-летняя выживаемость была сравнима в обеих группах: 47 и 33%, с АТГ и без него ($p=0,7$).

Выводы. Таким образом, несмотря на идентичность по антигенам системы HLA между донором и реципиентом при выполнении аллогенных ТГСК, сохраняется вероятность развития тяжелых посттрансплантационных осложнений. Дополнительная иммуносупрессия АТГ в миелоаблативных режимах кондиционирования позволяет уменьшить частоту осложнений в раннем посттрансплантационном периоде и не приводит к статистически достоверному увеличению риска прогрессии основного заболевания.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТАТУСА ГЕНА FLT3
У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

М.И. Зарайский, Я.С. Кувалкина, И.Ю. Сабурова
*ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. И.П. Павлова*

Введение. Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) является гетерогенным заболеванием, как с точки зрения клиники, так и с точки зрения молекулярной диагностики. Исследование различных генетических нарушений, специфичных для данного заболевания, снабжает клиницистов данными по прогнозу течения заболевания и по риску развития рецидива. Однако приблизительно у 50% пациентов с ОМЛ при стандартном цитогенетическом обследовании выявляется нормальный кариотип. Это обстоятельство повышает интерес к другим молекулярным маркерам, вовлеченным в патогенез заболевания и имеющим клиническое значение.

Цель исследования — определение диагностической значимости повреждений гена *FLT3* у пациентов с ОМЛ без изменений кариотипа.

Материалы и методы. Проанализирована геномная ДНК 35 пациентов с диагнозом ОМЛ (с нормальным кариотипом) и 5 здоровых доноров, выделенная с помощью стандартных методик. Выявление внутренних тандемных дупликаций (ВТД) гена *FLT3* проводилось по оригинальной методике, включающей амплификацию с использованием двух праймеров, специфичных 11-му и 12-му экзонам, и третьего внутреннего праймера, специфичного к ВТД. Определение мутации D835Y гена *FLT3* проводилось путем амплификации участка 17-го экзона с последующей ферментативной рестрикцией ферментом EcoRV.

Результаты. Встречаемость ВТД гена *FLT3* в данной группе составила 5,7%, мутации D835Y — 11,5%. В образцах позитивных пациентов обнаружено наличие как дикого, так и мутированного типов генов. Сочетанные повреждения гена *FLT3* (ВТД и D835Y) у больных исследуемой группы нами не выявлены. Оценка прогноза у пациентов проводилась по стандартным клиническим критериям. Наличие повреждений гена *FLT3* коррелировало с плохим прогнозом у пациентов с ОМЛ независимо от типа мутации.

Выводы. Генетические нарушения гена *FLT3* у пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом являются не частой, но диагностически значимой находкой. Наши результаты показывают, что исследования обоих типов мутации гена *FLT3* крайне важны для диагностических

целей. Дальнейшая разработка количественной оценки опухолевого клона, несущего данные мутации, будет необходима для оценки эффективности проводимой специфической терапии.

О ВЛИЯНИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА ЭРИТРОПОЭЗ В КУЛЬТУРЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС С ПОЛИЦИТЕМИЕЙ

Ю.М. Захаров, И.В. Фекличева

Южно-Уральский научный центр РАН, Челябинск

Введение. Лимфоциты, мигрирующие в костный мозг (КМ), при острой кровопотере активно контактируют с эритробластическими островками (ЭО) [Ю.М. Захаров, А.Г. Рассохин, 2002], что позволяет предполагать их участие в активации эритропоэза в ЭО. Нами установлено, что внесение эритропоэтина в культуру ЭО, полученных у крыс на 5-е сутки посттрансфузионной полицитемии, активирует формирование реконструирующихся ЭО, т.е. присоединение колониеобразующей единицы эритроидного ряда (КОЕ-Э) к макрофагу инволюцирующего ЭО, но формирование ЭО-1, т.е. присоединение КОЕ-Э к резидуальному макрофагу, остается подавленным [Ю.М. Захаров, И.В. Фекличева, 2008].

Цель исследования — оценить эритропоэтическое влияние Т-лимфоцитов на разные классы культивируемых ЭО КМ животных с полицитемией, их способность активировать комплементацию КОЕ-Э с макрофагами КМ.

В культуры ЭО КМ полицитемичных крыс, воспроизведенных по методике Y.M. Zakharov, M. Prenant (1982), выделенного на 5-е сутки после воспроизведения посттрансфузионной полицитемии, вносили эритропоэтин в дозах 0,25, 0,5 и 1 МЕ/мл культуральной среды. В культуры добавляли Т-клетки, полученные из тимуса полицитемичных крыс. Контролем являлись культуры ЭО КМ, выделенного на 5-е сутки после воспроизведения посттрансфузионной полицитемии, в которые вносили эритропоэтин в тех же дозах, но без добавления в них Т-клеток. Через 24 ч культивирования в «контроле» и «опыте» сравнивалось абсолютное число ЭО на культуральный сосуд и распределение их по классам зрелости в соответствии с классификацией, предложенной Ю.М. Захаровым и соавт. (1990).

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что Т-лимфоциты, внесенные в культуру ЭО полицитемичных крыс, повышают чувствительность к эритропоэтину макрофагов КМ — как центральных, инволюцирующих ЭО, так и резидуальных макрофагов КМ, что позволяет активно формироваться в культуре и реконструирующимся ЭО, и, что еще более выражено, ЭО-1.

Выводы. Таким образом, Т-лимфоциты, внесенные совместно с эритропоэтином в культуру ЭО, восстанавливают способность резидуальных макрофагов КМ к комплементации с КОЕ-Э, угнетенную в ходе развития посттрансфузионной полицитемии [Ю.М. Захаров, И.В. Фекличева, 2008], а также повышают способность к комплементации с КОЕ-Э центральных макрофагов инволюцирующих ЭО, тогда как внесение одного эритропоэтина в данные культуры активирует эритропоэз только за счет усиления его реконструкции на основе комплементации КОЕ-Э с макрофагами инволюцирующих ЭО.

ЦИТОКИНОТЕРАПИЯ В РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА

С.Л. Златогорская

Городская клиническая больница №2 им. Н.А. Семашко, Самара

По данным многочисленных исследований, выявлено, что иммунотерапия, сопровождающаяся увеличением субпопуляции Т-рег, обладает довольно низкой эффективностью в отношении онкологических заболеваний. С другой стороны, на экспериментальной модели спонтанной опухоли молочных желез мышей линий BLRB/BYRB было показано, что введение в опухоль препарата интерлейкина-2 (ИЛ-2) до мастэктомии приводит к увеличению численности большинства субпопуляций Т-лимфоцитов, в том числе Т-рег, но, несмотря на это, частота развития рецидивов и вторичных опухолей молочных желез у пролеченных ИЛ-2 самок оказалась значительно ниже.

Хронические воспалительные процессы, ишемия и ангиогенез часто взаимосвязаны и развиваются параллельно. Известен успешный опыт местного использования рекомбинантных цитокинов при лечении трофических язв, диабетической стопы в рамках клинических испытаний по применению мази с ИЛ-1b. С другой стороны, применение антител к ИЛ-1b и фактору некроза опухоли-а вызывает выраженное уменьшение продукции эндотелиального сосудистого фактора роста при хронических воспалительных процессах.

В настоящее время признано, что опухоль продуцирует не только активаторы ангиогенеза, но и увеличивает синтез его ингибиторов (ангиостатинов), что в клинической практике наблюдается в виде резкой активации регионарных метастазов при хирургическом удалении первичной опухоли. Поэтому местное использование ИЛ-2, способного вызвать митогенную активацию эндотелия, может вызвать расщепление плазмينا в кровотоке с образованием ангиостатина, в результате чего метастазы будут находиться в «спящем состоянии». Однако стимуляция процессов ангиогенеза может увеличить риск попадания опухолевых клеток в кровотоки и тем самым — численность самих метастазов. В связи с этим необходимо изучить возможность местного использования препаратов, содержащих интерферон-α для снижения риска активации регионарных метастазов.

ГАПЛОИДЕНТИЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК ТЕРАПИЯ СПАСЕНИЯ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГРУППЫ ВЫСОКОГО РИСКА

И.В. Казанцев, О.В. Паина, Н.В. Станчева, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

НИИ детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Введение. При использовании современных схем терапии для некоторых групп пациентов с онкологическими заболеваниями прогноз остается крайне неблагоприятным. В ряде случаев излечение заболевания возможно только при использовании аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

(алло-ТГСК). К сожалению, применение этого метода затрудняется в связи с отсутствием у большинства пациентов совместимых родственных доноров, а также по причине прогрессирования заболевания за время, которое уходит на поиск совместимого неродственного донора. Использование гаплоидентичных доноров позволяет вовремя провести трансплантацию; также при неполной совместимости донор—реципиент выше вероятность возникновения эффекта «трансплантат против опухоли».

Материалы и методы. Группе больных с крайне неблагоприятным прогнозом ($n=24$) была проведена гапло-ТГСК. В 10 (42%) случаях у пациентов диагностирован острый лимфобластный лейкоз: ремиссия II — у 2 пациентов, ремиссия III — у 2, рецидив I — у 2, рецидив II — у 2, рецидив III — у 1, первично-резистентное течение — у 1. У 11 (44%) больных выявлен острый миелобластный лейкоз: ремиссия I — у 1 пациента, ремиссия II — у 5, рецидив I — у 2, первично-резистентное течение — у 3. Также гапло-ТГСК проведена 1 пациенту с хроническим миелоидным лейкозом в фазе акселерации, 1 — с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом на стадии прогрессии и 1 — с первично-резистентной нейробластомой. На момент трансплантации у 15 (63%) больных наблюдались развитие рецидива либо прогрессия заболевания, в ремиссии находились 9 (37%) пациентов.

Во всех случаях использовались немиелоаблативные режимы кондиционирования с применением флюдарабина, антитимоцитарного и алкилирующего агента (бусульфана, мelfалан или тиотепа). Источниками ГСК были стволовые клетки периферической крови (СКПК) и костный мозг (КМ). Проводилась позитивная селекция CD34⁺ СКПК (CliniMACS). Среднее число CD34⁺-клеток составило $12,8 \times 10^6$ ($1,6—30,7 \times 10^6$) на 1 кг массы тела реципиента. Для профилактики РТПХ в большинстве случаев использовались циклоспорин А и мофетила микофенолат (ММФ). В 4 случаях применяли такролимус и ММФ.

Результаты. Встречаемость и степень реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) не превышали наблюдаемые при алло-ТГСК. РТПХ III—IV степени (с поражением кожи и желудочно-кишечного тракта) развилась у 6 (25%) пациентов, в 1 случае став причиной смерти. Отмечалась приемлемая токсичность режимов кондиционирования, у 6 (25%) пациентов наблюдались проявления органной токсичности II—III степени (печеночная токсичность, в 1 случае нейротоксичность). У 5 (21%) больных диагностирован инвазивный аспергиллез, у 8 (33%) — реактивация цитомегаловирусной инфекции.

Однолетняя общая выживаемость составила 62% при среднем сроке наблюдения 4,6 (от 1 до 12) мес. Причинами смерти пациентов были развитие рецидива заболевания ($n=5$), инфекционных осложнений ($n=1$), неприживление трансплантата ($n=1$), РТПХ ($n=1$).

Выводы. Гаплоидентичная ТГСК характеризуется приемлемой токсичностью и тяжестью РТПХ, невысокой частотой отторжения трансплантата. Ее применение позволяет улучшить прогноз в группе пациентов наиболее высокого риска.

МЕДИКО-ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.Ю. Качанов^{1,2}, Н.В. Крючко¹, Р.Т. Абдуллаев^{1,2}, Т.В. Шаманская¹, С.В. Аношина², К.В. Добренков¹, С.Р. Варфоломеева^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Московский областной онкологический диспансер, Балашиха

Введение. Злокачественные новообразования (ЗН), развивающиеся у детей первого года жизни, отличаются по своей структуре и биологическим характеристикам от опухолей у детей старшего возраста. В развитых зарубежных странах уровень заболеваемости ЗН детей на первом году жизни наиболее высокий и составляет 20,1—22,3 на 100 тыс. детского населения. Эпидемиологические характеристики у детей данной возрастной группы в России изучены плохо.

Цель исследования — оценка медико-частотных характеристик ЗН у детей первого года жизни на территории Московской области (МО).

Материалы и методы. Сбор данных о случаях заболевания ЗН детей первого года жизни проводили ретроспективно за период с 01.01.1990 г. по 31.12.1999 г. и проспективно за период с 01.01.2000 г. по 31.12.2006 г. Информация о случаях заболевания была получена из базы данных Детского популяционного канцер-регистра МО, организованного в 2000 г. Стратификация опухолей проводилась согласно Международной классификации злокачественных опухолей у детей (3-е издание).

Результаты. В исследование были включены 100 больных. Соотношение мальчики/девочки 1,17:1. В структуре заболеваемости преобладали солидные экстракраниальные опухоли (69%), на долю гемобластозов приходилось 19%, опухолей центральной нервной системы — 12%. Наиболее часто встречающимися солидными экстракраниальными опухолями являлись опухоли почки (18%) и симпатической нервной системы (12%). В среднем регистрировалось 5,8 случаев заболевания в год. Показатель заболеваемости в период с 1990 по 1999 г. составил 10,1, в период 2000—2006 гг. — 14,8 на 100 тыс. детского населения. Увеличение показателя заболеваемости было обусловлено улучшением качества регистрации пациентов данной возрастной группы.

Выводы. Особенности структуры заболеваемости детей первого года жизни является преобладание солидных ЗН. Показатель заболеваемости ЗН в проспективной части исследования был сопоставим с данными, полученными в популяционных исследованиях в других регионах РФ (Санкт-Петербург) и странах Восточной Европы с хорошо налаженной системой учета онкологических больных.

МЕДИКО-ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.Ю. Качанов^{1,2}, Н.В. Крючко¹, Р.Т. Абдуллаев^{1,2}, Т.В. Шаманская¹, С.В. Аношина², К.В. Добренков¹, С.Р. Варфоломеева^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Московский областной онкологический диспансер, Балашиха

Введение. Дети первого года жизни представляют собой уникальную группу как по показателю заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗН), так и по их структуре. Показано превалирование в структуре заболеваемости солидных опухолей над гемобластомами, что отличает данную когорту больных от детей другого возраста. Характерным для детей данной возрастной группы является развитие эмбриональных солидных ЗН.

Цель исследования — оценка медико-частотных характеристик солидных опухолей у детей первого года жизни на территории Московской области (МО).

Материалы и методы. Сбор данных о случаях заболевания ЗН детей первого года жизни проводили ретроспективно за период с 01.01.1990 г. по 31.12.1999 г. и проспективно за период с 01.01.2000 г. по 31.12.2006 г. Информация о случаях заболевания была получена из базы данных Детского популяционного канцер-регистра Московской области, организованного в 2000 г. Стратификация опухолей проводилась согласно Международной классификации злокачественных опухолей у детей (3-е издание). В исследование включены опухоли III—XI диагностических групп.

Результаты. В исследование был включен 81 больной. Соотношение мальчики/девочки составило 1,13:1. В среднем регистрировалось 4,8 случая заболевания в год. В структуре заболеваемости солидными опухолями преобладали опухоли почки (22,2%), центральной (ЦНС) и симпатической нервной системы (по 14,8%). Получены следующие значения показателя заболеваемости различными диагностическими группами солидных ЗН: опухоли ЦНС — 1,45; опухоли симпатической нервной системы — 1,46; ретинобластома — 1,31; опухоли почек — 2,22; опухоли печени — 1,44; саркомы мягких тканей — 1,16; герминоклеточные опухоли — 0,89 на 100 тыс. детей в возрасте до 1 года.

Выводы. Показатели заболеваемости опухолями почек, печени и саркомами мягких тканей были сопоставимы с зарубежными данными. Отмечен меньший показатель заболеваемости опухолями ЦНС, ретино- и нейробластомой, что, по-видимому, обусловлено недоучетом случаев заболевания. В основе низкого уровня заболеваемости ретинобластомой у детей раннего возраста лежит поздняя диагностика (в возрасте старше 1 года). Возможными причинами низкого уровня заболеваемости нейробластомой могут служить как отсутствие информации о результатах аутопсии новорожденных, спонтанная регрессия опухоли при бессимптомном течении заболевания, так и смерть пациентов под «маской» других заболеваний. Необходим дальнейший мониторинг заболеваемости детей данной возрастной группы, основанный на знании особенностей биологии опухолевого процесса у детей раннего возраста.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫСОКИХ И НИЗКИХ ДОЗ МЕТОТРЕКСАТА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ: ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ALL-MB-2002

О.Б. Козлова, Ю.В. Румянцева, Э.Г. Бойченко, Л.Г. Фечина, О.В. Алейникова, Д.В. Литвинов, К.Л. Кондратчик, С.А. Дудкин, М.Ю. Горюшкова, В.Н. Тимофеева, Н.Б. Юдина, Н.И. Пономарева, Н.В. Мякова, Е.Г. Мансурова, О.Ю. Фукс, С.Р. Варфоломеева, А.И. Карачунский

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

Введение. На сегодняшний день 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) превышает 75%, а метотрексат (МТХ) является неотъемлемым компонентом всех химиотерапевтических режимов. Однако существующая на момент диагностики или появляющаяся в процессе терапии резистентность лейкоэмических клеток к химиотерапии остается препятствием для излечения 20—25% пациентов. Введение высоких доз МТХ (ВД-МТХ) в сочетании с лейковорином — широко используемая стратегия для преодоления резистентности к антифолатной терапии. В настоящее время различные международные кооперативные группы используют МТХ в дозах от 20 до 33 000 мг/м², но оптимальная доза при лечении ОЛЛ у детей остается пока неизвестной.

Цель исследования — оценить предварительные результаты рандомизированного исследования эффективности двух дозовых режимов МТХ в терапии консолидации детей и подростков промежуточной группы риска по протоколу ALL-MB-2002.

Материалы и методы. В данный анализ вошли первичные пациенты с ОЛЛ промежуточной группы риска, зарегистрированные в период с 01.04.2002 г. по 29.06.2007 г. в клиниках России и Белоруссии, участвовавших в исследовании ALL-MB-2002. Из 334 пациентов, вошедших в анализ, 172 получали МТХ в дозе 30 мг/м² (низкая доза — НД-МТХ), а 162 — в дозе 2000 мг/м² (ВД-МТХ).

Результаты. Не обнаружено статистически значимых различий в показателях выживаемости (БСВ, общей и безрецидивной) и возникших рецидивов на двух режимах использования МТХ, в том числе и у пациентов с Т-клеточными вариантами ОЛЛ и инициальным лейкоцитозом >100×10⁹/л. Однако обращает на себя внимание увеличение числа изолированных рецидивов со стороны центральной нервной системы среди пациентов, получавших НД-МТХ (4,65% НД-МТХ и 1,23% ВД-МТХ; *p*=0,06). Число смертей в ремиссии не различалось между сравниваемыми группами (4,7% НД-МТХ и 6,2% ВД-МТХ; *p*=0,72). Не получено достоверных различий в выживаемости среди пациентов различного возраста и пола, а также в зависимости от получаемого индукционного стероида.

Выводы. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий в показателях выживаемости и количестве возникших рецидивов при использовании различных доз МТХ. Однако полученные нами результаты являются пока предварительными и, возможно, изменятся при более длительных сроках наблюдения и увеличении числа пациентов, входящих в исследование. Также необходимо отметить, что при использовании ВД-МТХ пациентам назначали 6-меркаптопурин в дозе 25 мг/м², тогда как пациенты, получавшие НД-МТХ, принимали препарат в дозе 50 мг/м², что затрудняет интерпретацию полученных результатов и может являться причиной отсутствия преимуществ использования ВД-МТХ. Нельзя забывать и о возможном избыточном введении лейковорина в процессе проведения лечения ВД-МТХ, что снижает эффективность МТХ и увеличивает экспансию опухолевых клеток, так как до настоящего мо-

мента пороговые значения кумулятивной дозы лейковорина, после которых его введение становится уже не полезным, а опасным, неизвестны.

РЕАКЦИЯ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» — РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-КЛЕТОК

И.А. Корсунский

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

Введение. Проведенные в последние годы несколькими группами ученых исследования иммунных механизмов развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у взрослых пациентов выявили ключевую роль регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток. Эти клетки выполняют функцию подавления эффекторных механизмов иммунного ответа, в том числе отторжения трансплантата (включая ингибирование цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов, естественных киллеров и других клеток, направленных на повреждение клеток хозяина).

Цель работы — исследование состава периферической крови у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в контексте клинического состояния пациентов и стадии развития РТПХ на момент каждого исследования.

Материалы и методы. В группу наблюдения включены 18 детей в возрасте от 9 мес до 14 лет (15 мальчиков, 3 девочки) с гемобластозами, после алло-ТГСК с разными стадиями РТПХ. В программу обследования каждого ребенка входило проведение клинических и лабораторных исследований, необходимых для оценки стадии РТПХ в соответствии с международной классификацией. Иммунофенотипирование проводилось с помощью метода проточной цитометрии.

Вывод. Полученные результаты 60 комплексных клинико-лабораторных обследований продемонстрировали, при отсутствии возрастных и половых различий, что при более тяжелых степенях развития РТПХ (III—IV степени) у детей отмечается более низкий уровень CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-клеток.

ВЛИЯНИЕ ЧИСЛА РЕГУЛЯТОРНЫХ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-КЛЕТОК В ТРАНСПЛАНТАТЕ НА ТЯЖЕСТЬ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У РЕЦИПИЕНТА

И.А. Корсунский¹, С.Н. Быковская², Е.В. Скоробогатова¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²Лаборатория клеточного мониторинга, Москва

Введение. В ходе изучения иммунных механизмов развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у взрослых пациентов выявлена критическая роль регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток, ответственных за подавление функции эффекторных механизмов отторжения, включая ингибирование цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов, естественных киллеров и других клеток, направленных на повреждение клеток хозяина.

Цель исследования — сопоставление состава трансплантата, полученного от взрослого донора и последующего клинического состояния реципиента—ребенка.

Материалы и методы. Группа наблюдения включала 14 детей в возрасте от 9 мес до 14 лет (12 мальчиков, 2 девочки) с гемобластозами, после аллогенной

трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с разными стадиями РТПХ. Иммунофенотипирование проводилось с помощью метода проточной цитометрии. В программу обследования входили клинические и лабораторные исследования, необходимые для оценки стадии РТПХ в соответствии с международной классификацией.

Результаты. Полученные результаты 46 комплексных клинико-лабораторных обследований, проведенных через 10—100 дней после трансплантации, продемонстрировали отсутствие возрастных и половых различий. При сопоставлении фенотипа трансплантата и последующего клинического состояния пациентов выявлено наличие отрицательной корреляции между числом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток в трансплантате, полученном у взрослого донора, и выраженностью тяжести РТПХ у реципиента — ребенка. При этом результат не зависел от времени, прошедшего после трансплантации, а коррелировал только со степенью выраженности РТПХ у всех детей.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЖИМОВ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ СНИЖЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ И МИЕЛОАБЛАТИВНОГО КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

В.А. Косторов, Н.В. Станчева, С.Н. Ширяев, Ю.Г. Васильева, И.В. Казанцев, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

НИИ детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Материалы и методы. Исходы аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) у детей, больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), были ретроспективно проанализированы у 73 пациентов в возрасте от 1 года до 20 лет (средний возраст составил 8,8 года). Для сравнительного анализа, когорты пациентов была разделена на 2 группы в зависимости от стадии заболевания на момент проведения алло-ТГСК. В 1-ю группу были включены пациенты, находившиеся в 1-й ремиссии с крайне неблагоприятными прогностическими факторами и 2-й ремиссии заболевания ($n=35$). Во 2-ю группу вошли больные, у которых на момент проведения алло-ТГСК были констатированы рецидив, 3-я ремиссия заболевания и первично-резистентная форма ОЛЛ ($n=38$). Мы сравнили общую выживаемость (ОВ) в обеих группах в зависимости от режима кондиционирования, проводимого перед алло-ТГСК. Режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью дозы (РКСИД) получили 22 пациента, миелоаблативное кондиционирование проведено 51 больному.

Результаты. Семилетняя ОВ, независимо от стадии заболевания на момент проведения алло-ТГСК, составила 32% (в этот анализ включены также пациенты с первично-резистентными лейкозами или резистентные рецидивы ОЛЛ). Сравнительный анализ выявил значительное различие в ОВ пациентов в зависимости от стадии заболевания на момент осуществления алло-ТГСК (7-летняя ОВ составила 41% при трансплантации в ремиссии по сравнению с 11% в рецидиве заболевания).

Результаты. Установлено, что использование РКСИД при проведении алло-ТГСК в ремиссии заболевания может улучшать ОВ. Семилетняя ОВ после алло-ТГСК при проведении РКСИД составила 64% ($n=14$), в то время как после миелоаблативного кондиционирования этот показатель был равен 37% ($n=27$). Улучшение ОВ в группе РКСИД, возможно, объясняется снижением смертности, напрямую связанной с токсичностью терапии. В то же время, согласно полученным данным, использование РКСИД при проведении алло-ТГСК в случае развития первично-резистентного ОЛЛ или резистентного рецидива заболевания может ухудшать ОВ. Трехлетняя ОВ после алло-ТГСК с миелоаблативными режимами кондиционирования составила 16% ($n=24$), а с использованием РКСИД — 0% ($n=8$). Все пациенты, находившиеся на момент выполнения РКСИД алло-ТГСК в рецидиве ОЛЛ или при первично-резистентном течении заболевания, умерли в течение 8 мес после осуществления трансплантации.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение РКСИД при проведении алло-ТГСК в ремиссии заболевания может улучшать ОВ у детей с ОЛЛ. Возможность использования РКСИД при проведении алло-ТГСК в рецидиве ОЛЛ или при первично-резистентном течении заболевания требует дальнейшего изучения.

ВНУТРЕННЯЯ ТАНДЕМНАЯ ДУПЛИКАЦИЯ ГЕНА FLT3 ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

М.А. Кривко, Т.В. Савицкая

РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Мутация в гене *FLT3*, при которой происходит удвоение (дупликация) последовательности, кодирующей подмембранный домен *FLT3/ITD* (*FLT3 Internal Tandem Duplication*), является распространенным молекулярно-генетическим нарушением при острых миелоидных лейкозах. Длина дублируемой ДНК варьирует от 4 до 400 нуклеотидов в каждом индивидуальном случае острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В результате мутации происходит нарушение аутоингибиторной функции не связанного с лигандом рецептора, конститутивное фосфорилирование субъединиц рецептора (нормальной и мутантной). Данный тип мутаций встречается у 20—25% взрослых и 5—25% детей с ОМЛ. При остром лимфобластном лейкозе мутация *FLT3/ITD* не выявлена. Мутации в гене *FLT3* определяются преимущественно у пациентов с нормальным кариотипом.

Цель исследования — изучение встречаемости внутренней тандемной дупликации *FLT3* при ОМЛ у детей и ее прогностического значения.

Материалы и методы. Встречаемость внутренней тандемной дупликации гена *FLT3* (*FLT3-ITD*) составила 14,9% (10/67). При первичной диагностике она выявлялась с одинаковой частотой как у пациентов с развитием впоследствии рецидива, так и в случаях с продолжительной ремиссией. В одном случае дупликация исчезла в рецидиве, в другом — появилась.

При оценке прогностической роли *FLT3/ITD* при ОМЛ показано негативное влияние данной мутации на течение и результаты терапии. Наличие *FLT3-ITD* является неблагоприятным прогностическим призна-

ком — бессобытийная выживаемость в группе с *FLT3/ITD* составила всего 20%. Безрецидивная выживаемость у пациентов с мутацией была достоверно ниже, чем у детей с *FLT3* без мутации (22% по сравнению с 53%). Частота ремиссий при современной терапии у больных с *FLT3/ITD* в большинстве исследований достоверно не отличалась от частоты ремиссий у больных без данной мутации, однако безрецидивная выживаемость в большинстве исследований у больных с *FLT3/ITD* оказалась достоверно короче, что ухудшало результаты терапии.

Вывод. Внутренняя тандемная дупликация гена *FLT3* (*FLT3-ITD*) определяется у каждого седьмого ребенка с ОМЛ и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом.

ЭКСПРЕССИЯ НОХ-ГЕНОВ КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Я.С. Кувалкина, И.Ю. Сабурова, М.И. Зарайский

ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Введение. НОХ-гены кодируют широкий спектр белков, содержащих хомеодомены. Они действуют в качестве основных регуляторов как нормального, так и патологического гемопоэза. Таким образом, атипичная экспрессия различных НОХ-генов может определять патогенез гематологических опухолей и, в частности, острого лейкоза.

Цель исследования — оценить экспрессию генов НОХ A5, A9 и A10 у пациентов с различными вариантами острого лейкоза.

Материалы и методы. В исследование были включены 10 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и 13 — с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ). Статус заболевания (ремиссия или рецидив) был определен на основании стандартных клинических критериев. Группу сравнения составили 10 здоровых доноров. Тотальная РНК выделялась стандартным методом. Уровень мРНК НОХ-генов определялся полуколичественно с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. В качестве референс-гена был использован ген β_2 -микроглобулина. Экспрессия генов была оценена с помощью $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода. Нормальная экспрессия гена (у донора) была принята за 1,0. Уровень экспрессии меньше и больше 1,0 соответствовал понижению и повышению экспрессии гена.

Результаты. В группе ОЛЛ 7 пациентов находились в состоянии ремиссии, у 3 зарегистрирован рецидив, в группе ОМЛ — 9 и 4 пациента соответственно. В ремиссии средний коэффициент экспрессии НОХ-генов у больных ОЛЛ составил 0,19/0,05/0,09 для НОХ A5/A9/A10, а у пациентов с ОМЛ был равен 0,27/0,15/0,16 для НОХ A5/A9/A10. В рецидиве средний коэффициент экспрессии НОХ-генов у больных ОЛЛ составил 2,63/2,06/1,76; у пациентов с ОМЛ был равен 1,38/1,13/3,31 для НОХ A5/A9/A10 соответственно. Таким образом, у всех пациентов в ремиссии, независимо от заболевания, отмечалось подавление экспрессии НОХ-генов в различной степени. Напротив, рецидив сопровождался повышением экспрессии соответствующих генов. На основании полученных результатов можно заключить, что различия в экспрессии НОХ A5- и НОХ A9-генов могут быть использованы

в диагностике рецидива ОЛЛ, тогда как различия в экспрессии *NOX A10* могут применяться в диагностике рецидива ОМЛ.

Вывод. Динамический анализ экспрессии *NOX A5*, *A9*- и *A10*-генов играет важную роль в раннем выявлении рецидива у больных с острыми лейкозами.

МУТАЦИИ ГЕНА ОПУХОЛИ ВИЛЬМСА (*WT1*) И НУКЛЕОФOSМИНА (*NPM1*) И ОЦЕНКА ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

А.М. Кустанович

РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Опухолевые клетки ряда пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) содержат мутации генов *WT1* и *NPM1*, которые характерны для злокачественно трансформированных бластных клеток и могут выступать в качестве онкомаркеров. Мутации генов *WT1* и *NPM1* могут быть ассоциированы с молекулярно-цитогенетическими абберациями, выявляемыми в бластных клетках, а также свидетельствовать о степени злокачественности опухолевых клеток, определяемой по клинико-биологическому поведению лейкозного клона. Мутации этих генов нередко влияют на прогноз заболевания у детей с ОМЛ, а также могут использоваться в качестве специфичного для конкретного пациента маркера минимальной остаточной болезни. Генетический анализ мутаций определяет биологические свойства опухолевых клеток.

Цель исследования — изучить встречаемость мутаций генов *WT1* и *NPM1* у детей с ОМЛ.

Одним из наиболее распространенных нарушений при ОМЛ у взрослых (50—60% случаев) является наличие мутаций в гене *NPM1*, кодирующем фосфопротеин, который перемещается из ядра в цитоплазму. Однако мутации приводят к конститутивной цитоплазматической локализации белка. Основной тип мутаций — тетрануклеотидные вставки в 12-м экзоне гена, отмечаются и другие варианты.

Материалы и методы. Нами были проанализированы данные 30 детей с ОМЛ. Мутация гена *NPM1* определена в 6,6% (2/30) наблюдений. В обоих случаях эта была тетрануклеотидная вставка в 12-м экзоне.

Определение мутаций гена *WT1* проводилось в экзонах 7 и 9, характеризующихся более высокой мутабельностью. Эти мутации были обнаружены у 13,4% (3/22) проанализированных пациентов с ОМЛ.

Выводы. Частота мутаций гена *NPM1* у детей с ОМЛ значительно ниже, чем у взрослых, и составляет 6,6%. Мутации гена *WT1* распространены при ОМЛ и встречаются у каждого десятого ребенка с этой патологией.

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

А.М. Кустанович, М.А. Кривко, Н.П. Кирсанова, Ю.Е. Марейко, М.В. Белевцев, Е.В. Волочник, В.П. Савицкий, Т.В. Шман, Т.В. Савицкая, Р.И. Юцкевич, О.В. Алейникова

РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Цель исследования — определение значения морфологических, иммунофенотипических, цитогенетиче-

ских и молекулярно-генетических методов для оценки эффективности терапии (ответа на нее) различных субтипов острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) у детей.

Материалы и методы. Были определены критерии оценки эффективности терапии, такие как выживаемость (безрецидивная — БРВ, бессобытийная — БСВ, общая — ОВ), уровни бластных клеток в костном мозге на этапах лечения, тромбоцитов, минимальной остаточной болезни и определена их ассоциация с инициальными показателями.

Выживаемость пациентов с ОМЛ составила 35%, в 2 раза выше была выживаемость при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ). Прогностически благоприятным оказался более низкий уровень инициального лейкоцитоза ($<90 \times 10^9/\text{л}$ при ОМЛ и $<10 \times 10^9/\text{л}$ при ОПЛ). Значительные различия обнаружены при изучении инициального числа бластных клеток в пуповинной крови, уровне бластных клеток в костном мозге на 14-й день и гемоглобина. Наилучшим прогнозом при ОМЛ характеризовался М2-подтип, наихудшим — М1, выживаемость была выше при М3-варианте. Более благоприятным прогнозом обладали пациенты с экспрессией генов *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*, менее благоприятным — пациенты с перестройкой гена *MLL* в опухолевых клетках. У пациентов с экспрессией *HLA-DR* и *CD117* отмечена более высокая выживаемость. У больных с низким процентом бластных клеток в G₂M-фазе, а также низким уровнем экспрессии *CD95* наблюдался значительно более высокий уровень БРВ/БСВ. Уровень апоптоза, процент бластных клеток в S-фазе, экспрессия *BCL2*, экспрессия и активность Р-гликопротеина не коррелировали с параметрами БРВ и БСВ. Уровень апоптоза, определяемый проточной цитометрией, был достоверно выше у пациентов, ответивших к 14-му дню на проводимую терапию. У этой же группы был более низкий уровень инициального лейкоцитоза. Использовалась оценка минимальной остаточной болезни с применением молекулярно-цитогенетических методов. В частности, определялась экспрессия химерных онкогенов *PML-RAR α* , *AML1-ETO*. Динамика достижения молекулярно-биологической ремиссии оказалась выше у пациентов с экспрессией *PML-RAR α* по сравнению с *AML1-ETO*.

Кроме того, были охарактеризованы рецидивы ОМЛ и характеристики *de novo* ОМЛ, ассоциированные с возникновением рецидивов. Были проанализированы пол, возраст пациентов, морфология бластных клеток, гематологические характеристики, параметры клеточного цикла, апоптоза и лекарственной чувствительности, иммунофенотипические и молекулярно-цитогенетические маркеры.

В проанализированной группе рецидив произошел у трети пациентов. Время его наступления варьировало от 4 до 32 мес с момента постановки диагноза.

Инициальный лейкоцитоз у больных, у которых рецидив развился в сроки до 11 мес, был достоверно выше по сравнению с пациентами, рецидив у которых произошел позже ($p=0,02$). У всех больных с рецидивом повышается уровень гемоглобина и эритроцитов и несколько снижается число лейкоцитов и нейтрофилов.

В 80% случаев развития ранних рецидивов у пациентов отмечался либо нормальный кариотип, либо перестройки с вовлечением 11-й хромосомы. При сопостав-

лении цитогенетической характеристики лейкозного клона пациентов с ОМЛ при постановке диагноза и при рецидиве заболеваний в 55,5% случаев не отмечено изменений цитогенетических характеристик, в 22,2% исчез клон с добавочной хромосомой. В оставшихся 2 случаях произошли изменения генотипа.

Выводы. Экспрессия химерных генов, а соответственно, и перестройки, приводящие к их формированию, стабильны в ходе терапии и отмечаются также при рецидивах. Внутренняя tandemная дупликация гена *FLT3* выявляется с одинаковой частотой (18,5%) как у пациентов с рецидивом, так и в случаях продолжительной ремиссии. Среди проанализированных иммунофенотипических маркеров следует отметить более высокий уровень экспрессии CD7 и низкий — миелопероксидазы у пациентов с ранним рецидивом по сравнению с пациентами с поздними рецидивами и больными, находящимися в состоянии продолжительной ремиссии.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕПОРТЕРНОЙ ПРОБЫ FIAU, МЕЧЕННОЙ ¹²⁴I ИЛИ ¹⁸F, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА HSV1-TK ПРИ ПОЗИТРОННО-ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ

Ю.Н. Ликарь, К.В. Добренков, В.Б. Пономарев
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк,

США

Введение. Для визуализации экспрессии гена тимидин-киназы вируса простого герпеса первого типа (HSV1-tk) с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) применяются различные репортерные пробы производные нуклеозидов, меченные как короткоживущими радиоизотопами (¹⁸F, T_{1/2} = 1,9 ч), так и радиоизотопами с длительным периодом полураспада (¹²⁴I, T_{1/2} = 110,8 ч). Одной из первых репортерных проб для визуализации HSV1-tk является 2'-флюоро-2'-деокси-1β-D-арабинофуранозил-5-йодоурацил (FIAU), меченный ¹²⁴I. Однако длительный период полураспада ¹²⁴I не позволяет выполнять сравнительные (ежедневные) исследования экспрессии гена HSV1-tk с использованием повторной дозы FIAU или другого радиотрейсера.

Цель исследования — оценка эффективности ПЭТ визуализации репортерного гена HSV1-tk с помощью репортерной пробы FIAU, меченной ¹²⁴I и ¹⁸F.

Материалы и методы. Оценка *in vivo* накопления FIAU, меченного радиоизотопами ¹⁸F и ¹²⁴I, проводилась с помощью ПЭТ. Были использованы мышинные модели подкожных опухолей из клеток глиомы человека (U87), постоянно экспрессирующих HSV1-tk. В первый день исследования животным вводили 450 μCi ¹⁸F-FIAU с однократной оценкой накопления через 2 ч после введения. На второй день было введено 150 μCi ¹²⁴I-FIAU с оценкой накопления через 2 и 24 ч после введения. Накопление радиотрейсера в зоне опухоли (специфический сигнал, ROI) и мышцы (фоновый сигнал, BGR) рассчитывалось при помощи программы ASIPro и было выражено в процентах введенной дозы на грамм веса ткани (%ID/г).

Результаты. Накопление ¹⁸F-FIAU и ¹²⁴I-FIAU в опухолях, экспрессирующих HSV1-tk, через 2 ч после введения составило 4,2 и 2,5 %ID/г соответственно. При расчете соотношения сигнала в опухоли к фоновому сигналу (ROI:BGR) были получены следующие значения: для ¹⁸F-FIAU 11,2 через 2 ч и для ¹²⁴I-FIAU 4,9 и 10,5 через 2 и 24 ч соответственно. Наблюдалось сход-

ное неспецифическое накопление радиотрейсера через 2 ч после введения ¹⁸F-FIAU и ¹²⁴I-FIAU в органах естественной экскреции (желудочно-кишечный тракт и мочевого пузыря). Значительное снижение неспецифического накопления отмечено через 24 ч после введения ¹²⁴I-FIAU.

Выводы. Установлено, что накопление и соотношение ROI: BGR для ¹⁸F-FIAU сравнимо с таковыми для ¹²⁴I-FIAU. Использование ¹⁸F-FIAU позволяет проводить повторную сравнительную визуализацию экспрессии HSV1-tk через 24 ч (≥¹⁸F; T_{1/2}×10) после первичного введения с возможностью инъекции повторной дозы ¹⁸F-FIAU или другого радиотрейсера. ¹²⁴I-FIAU позволяет проводить визуализацию экспрессии HSV1-tk в течение длительного промежутка времени после первичного введения, а также в исследованиях, где необходимо минимизировать влияние неспецифического накопления.

СОЗДАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА HSV1-TK, ОБЛАДАЮЩИХ ВЫСОКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К НУКЛЕОЗИДНЫМ РЕПОРТЕРНЫМ ПРОБАМ, ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В ПРЕДЕЛАХ ОДНОГО ОРГАНИЗМА С ПОМОЩЬЮ ПОЗИТРОННО-ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ

Ю.Н. Ликарь, К.В. Добренков, В.Б. Пономарев
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк,

США

Введение. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с применением тимидин-киназы вируса простого герпеса первого типа (HSV1-tk) широко используется в экспериментальных моделях и клинических исследованиях с целью оценки ответа на HSV1-tk-опосредованную суицидальную генную терапию в комбинации с GCV, а также для оценки локализации, жизнеспособности и пролиферации клеточных популяций, экспрессирующих HSV1-tk, с помощью нуклеозидных репортерных проб. Однако оценка экспрессии HSV1-tk с помощью ПЭТ в различных клеточных линиях, локализованных в пределах одного организма, может быть затруднена.

Цель исследования — создание модифицированных вариантов гена HSV1-tk, обладающих специфичностью к радиомеченым пробам—производным пуринов и/или пиримидинов, для ПЭТ-визуализации.

Материалы и методы. Создание мутированных вариантов репортерного гена HSV1-tk проводилось с помощью методики направленного мутагенеза с использованием полимеразной цепной реакции. Сравнение функции HSV1-tk и ее мутированных вариантов HSV1-tk-A167Ysr39 и HSV1-tk-R176Qsr39 было проведено путем 2-часовой инкубации трансдуцированных клеток глиомы человека (U87-клеток) с ³H-пенцикловиrom (3H-PCV) и ³H-2-флюоро-2'-деоксиарабинофуранозил-5-этилурацилом (³H-FEAU) с последующей оценкой их накопления *in vitro*. Оценка *in vivo* накопления меченных ¹⁸F пиримидин- (¹⁸F-FEAU) и пуринов- (¹⁸F-FHBG) производных в подкожных опухолях, экспрессирующих нативный и мутированные варианты HSV1-tk, проводилась с применением ПЭТ.

Результаты. Накопление *in vitro* ³H-PCV получено во всех трансдуцированных клетках, однако значительно в меньшей степени оно наблюдалось в клетках,

трансдуцированных репортерным геном HSV1-tk-R176Qsr39 ($p < 0,05$). Накопление ^3H -FEAU было отмечено только в клетках, трансдуцированных HSV1-tk и HSV1-tk-R176Qsr39. *In vivo* накопление ^{18}F -FHBG имело место во всех опухолях, экспрессирующих HSV1-tk и ее мутированные варианты, однако накопление ^{18}F -FHBG было значительно снижено в опухолях, экспрессирующих HSV1-tk-R176Qsr39 ($p < 0,05$). Накопление ^{18}F -FEAU наблюдалось только в опухолях, трансдуцированных HSV1-tk и HSV1-tk-R176Qsr39 репортерными генами.

Заключение. Созданы и апробированы репортерные гены HSV1-tk-A167Ysr39 и HSV1-tk-R176Qsr39 для ПЭТ-визуализации в сочетании с соответствующей репортерной пробой. HSV1-tk-A167Ysr39 продемонстрировал специфичность и высокую активность при фосфорилировании ациклогуанозинового производного, на примере ^{18}F -FHBG, в то время как HSV1-tk-R176Qsr39 показал активность в отношении пиримидиновых производных (^{18}F -FEAU) при низкой активности с ациклогуанозиновыми производными. Данные репортерные гены могут быть использованы в доклинических и клинических исследованиях для оценки локализации, жизнеспособности и пролиферации различных клеточных популяций в пределах одного организма.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНГИОГЕНЕЗА В ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ ИМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

М.М. Литвинова, А.В. Лавров

ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Введение. В настоящее время интенсивно исследуются мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК), трансфицированные генами ангиогенеза для более успешного лечения ишемических заболеваний.

Цель исследования — изучение экспрессии генов *ANG* и *VEGF-121* в МСК, трансфицированных плазмидой с этими генами.

Материалы и методы. Подбор условий трансфекции МСК проводили в 2 сериях при следующих условиях: 2 мкл UF-56/1 мкг ДНК, 1 мкл UF-56/0,5 мкг ДНК и 0,5 мкл UF-56/0,25 мкг ДНК на 1 лунку 6-луночного планшета, содержащую 1×10^5 клеток. Эффективность трансфекции оценивали методом обратнотранскрипционной — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Несмотря на различие абсолютного количества ДНК в 2 сериях, эффективность трансфекции прямо пропорциональна количеству трансфицированной ДНК (рис. 1).

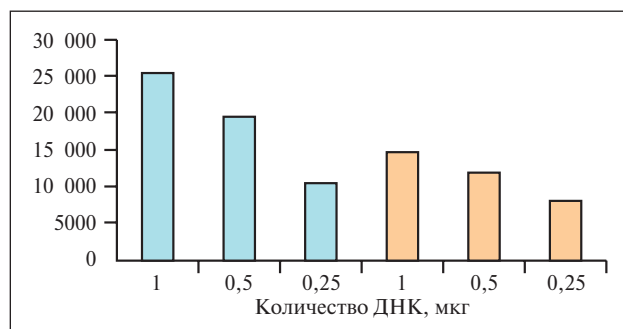


Рис. 1. Эффективность трансфекции МСК разным количеством ДНК (2 серии)

Для оценки динамики экспрессии *ANG* и *VEGF-121* в МСК человека использовали 3 культуры: культуры №1 и №2 трансфицировали на 3-м пассаже, №3 — на 12-м. Аликвоты клеток для последующего анализа забирали на 1, 6, 10 и 37-е сутки после трансфекции. Из отобранных клеток выделяли ДНК и РНК. Экспрессию *ANG* определяли методом ПЦР в режиме реального времени (РВ-ПЦР).

Результаты. Установлено, что экспрессия плазмиды максимальна в первые сутки после трансфекции и значительно снижается, стремясь к нулю, по прошествии нескольких дней (рис. 2). Число плазмид и молекул кДНК *ANG* значительно различаются по культурам на разных сроках. В контрольных культурах *ANG* не экспрессируется. Аналогичные результаты получены по оценке уровня экспрессии *VEGF-121*. На 6-е сутки после трансфекции экспрессия уменьшилась в 10 раз по сравнению со 2-ми сутками.

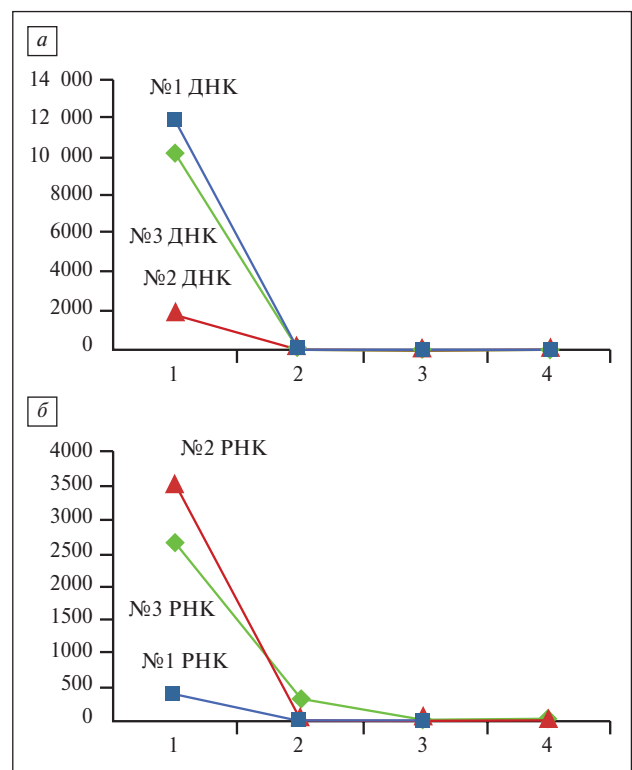


Рис. 2. Количество плазмид (а) и экспрессия *ANG* (б) в МСК человека

Выводы. Нами разработан протокол трансфекции МСК генами ангиогенеза. Полученные данные позволяют предположить, что эта конструкция будет максимально эффективна в первые сутки после трансфекции.

При частичной финансовой поддержке РФФИ 07-04-12157-офи и ГК 02.512.11.0006.

УРОВНИ СЫВОРОТОЧНОГО ЭРИТРОПОСТИНА ПРИ АНЕМИЯХ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ДО НАЧАЛА ХИМИОТЕРАПИИ

М.А. Луныкова¹, А.Г. Безнощенко¹, В.Г. Демихов², Е.Ф. Моршачкова², О.Н. Журина²

¹Рязанская областная детская клиническая больница; ²Рязанский филиал ФГУ Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии

Введение. Одним из факторов патогенеза анемии при злокачественных новообразованиях (АЗН) является неадекватно низкая продукция эритропоэтина (ЭПО). При острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) продукция эндогенного ЭПО изучена недостаточно.

Цель исследования — изучить адекватность продукции сывороточного ЭПО (с-ЭПО) при анемии у детей с ОЛЛ до начала интенсивной химиотерапии.

Материалы и методы. Обследованы 24 пациента с анемией на фоне ОЛЛ до начала химиотерапии и 24 ребенка с железодефицитной анемией (ЖДА) и уровнем гемоглобина (Hb) < 110 г/л. Уровень ЭПО определялся методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем Pro-Con HS (Санкт-Петербург, Россия). Для оценки адекватности продукции с-ЭПО составлялись корреляционные зависимости Hb-ЭПО, определялся коэффициент О/П logЭПО. В качестве модели адекватности рассматривалась продукция ЭПО при ЖДА. Неадекватно низкой степени анемии продукцию ЭПО считали при О/П < 0,8.

Результаты. Средние уровни Hb в исследуемых группах при ОЛЛ (76,0±3,02 г/л) и ЖДА (76,9±3,10 г/л) достоверно не различались, что позволило сравнивать в группах средние значения ЭПО. Уровни с-ЭПО при ОЛЛ (167,0±25,3 мМЕ/мл) достоверно не отличались от с-ЭПО при ЖДА (208,0±23,26 мМЕ/мл). Коэффициенты корреляции Hb-с-ЭПО (r) при ОЛЛ и ЖДА составили соответственно -0,47 и -0,90. Коэффициент О/П logЭПО при ЖДА был равен 1,00, при ОЛЛ — 0,88, что свидетельствует об адекватной степени анемии продукции эритропоэтина.

Выводы. Уровень с-ЭПО у пациентов с анемией из группы ОЛЛ до начала химиотерапии оказался неожиданно высоким и адекватным степени анемии. Аккумуляция эндогенного ЭПО у пациентов с ОЛЛ, вероятно, обусловлена значительным снижением числа клеток-мишеней (эритроидных предшественников) в костном мозге и/или эритропоэтиновых рецепторов на них при сохраненной почечной продукции эндогенного ЭПО в условиях гипоксии.

**УРОВНИ ЭРИТРОПОЭТИНА У ЛЮДЕЙ
В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И У БОЛЬНЫХ
С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

Н.А. Макарова¹, Ю.М. Захаров²

¹Челябинская государственная медицинская академия; ²Южно-Уральский научный центр РАМН, Челябинск

Введение. Доля лиц пожилого и старческого возраста в структуре населения России растет с увеличением средней продолжительности жизни. С возрастом уменьшение физической активности и обмена веществ способствует сокращению физиологических резервов кардиореспираторной системы, воспроизводства эритроцитов костным мозгом пожилых людей, уменьшению кислородной емкости крови, что в конечном счете приводит к снижению приспособления организма к гипоксии разного генеза. В литературе представлены единичные работы, указывающие на сниженное воспроизводство эритропоэтина (ЭПО) у лиц пожилого и старческого возраста. Остается неясным вопрос, насколько способен пожилой организм адекватно реагировать продукцией ЭПО на острую и хроническую гипоксию.

Цель исследования — изучение показателей периферического отдела эритрона и уровня ЭПО у лиц разных возрастных групп, а также адаптационных возможностей пожилого организма в условиях хронической гипоксии.

Материалы и методы. Обследованы 42 человека в возрасте от 20 до 85 лет без заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной и кровяной систем, разделенные на 3 возрастные группы: 1-я — от 20 до 39 лет (n=13); 2-я — от 40 до 59 лет (n=18); 3-я — 60 лет и старше (n=11). Группой сравнения для старшей возрастной группы служили 13 пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ишемического генеза III—IV функционального класса в возрасте от 60 до 85 лет.

Результаты. В 1—3-й возрастной группе уровни эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците и концентрация гемоглобина в эритроцитах находились в пределах нормы. Величины гематокрита, средний уровень гемоглобина в 1 л крови и среднее содержание гемоглобина в одном эритроците в старшей возрастной группе оказались достоверно выше, чем в группе пациентов с ХСН. Доверительный интервал значений ЭПО в плазме крови у обследованных лиц в возрасте от 20 до 39 лет составил 13,51±5,37 мЕ/мл, в возрасте от 40 до 59 лет — 9,42±1,52 мЕ/мл, у лиц 60 лет и старше — 6,38±1,82 мЕ/мл. В группе пациентов с ХСН значения уровня ЭПО находились в доверительном интервале 102,86±29,04 мЕ/мл, что в 16 раз превышает таковые у обследованных старшей возрастной группы (6,38±1,82 мЕ/мл). Следовательно, у пожилых людей организм сохраняет способность реагировать на гипоксию интенсивной продукцией ЭПО. Ввиду отсутствия у пациентов с ХСН ожидаемого ретикулоцитоза можно полагать, что повышенная продукция ЭПО не приводит к выраженной активации эритропоэза вследствие нарушенного метаболизма кровяной ткани.

**ФЛАВОНОИДЫ — ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК
НОВЫХ СЕЛЕКТИВНЫХ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ**

П.Ю. Мальшев¹, С.И. Павлова^{1,2}, Г.О. Дибирова^{1,2},
Н.Б. Дмитриева^{1,2}, С.Е. Милешина^{1,2}, И.Г. Козлов^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток — один из современных методов лечения в онкогематологии. Со времени его первого успешного использования в 1968 г. трансплантация костного мозга (ТКМ) успешно применяется для лечения пациентов, страдающих лимфо- и миелолипролиферативными заболеваниями. Одной из нерешенных проблем терапии с использованием ТКМ является иммунная реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Клинически различают острую и хроническую формы РТПХ. В некоторых случаях исход может быть летальным.

Материалы и методы. Современные методы лечения и профилактики РТПХ основаны на использовании высоких доз иммунодепрессантов (циклоsporина, метотрексата, антилимфоцитарного глобулина и кортикостероидов). Такая агрессивная терапия вызывает ряд побочных эффектов, наиболее серьезным среди которых является неселективная иммуносупрессия с присоединением

вторичной инфекции. Кроме того, при длительном применении кортикостероидов возможно возникновение стероидорезистентности.

Флавоноиды — класс природных соединений растительного происхождения. В настоящее время известно, что некоторые представители этого класса эффективно ингибируют различные киназы сигнальных путей клетки. В настоящее время они исследуются как источник для создания противоопухолевых и иммуномодулирующих лекарственных средств. Существуют единичные экспериментальные данные эффективности флавоноидов (кампферол) в моделях острой РТПХ. В наших исследованиях флавоноиды корня солодки продемонстрировали высокую антипролиферативную активность в отношении активированных Т- и В-лимфоцитов. В отличие от высоких доз иммунодепрессантов, флавоноиды корня солодки значимо не влияют на механизмы врожденного иммунитета: не снижают поглотительную активность фагоцитов и экспрессию Toll-подобных рецепторов.

Вывод. Производные флавоноидной структуры, возможно, могут быть перспективными источниками для создания новых селективных иммунодепрессантов, в том числе и для лечения РТПХ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ B-RAF И K-RAS В ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПЛАЗМЫ И КЛЕТОК КРОВИ, СЛЮНЫ И ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА, У ЛИЦ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.И. Маркова, А.С. Белохвостов, А.Г. Румянцев

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

Цель исследования — изучение возможности использования SSCP-анализа генов *B-raf* и *K-ras* для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний щитовидной железы.

Материалы и методы. Для исследования взяты образцы крови, слюны и опухолевой ткани 11 больных с онкологическими заболеваниями щитовидной железы, 10 образцов плазмы и клеток крови здоровых доноров. Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной депротеинизации-этанольной преципитации. Перед выделением ДНК образцы обрабатывали протеиназой К. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации анализируемой последовательности 15-го экзона гена *B-raf* проводили в аппарате Терцик («ДНК-технология») с использованием праймеров, покрывающих 15-й экзон гена *B-raf* с прилежащими участками интронов (прямой праймер: 5'-TCATAAT-GCTTGCTCTGATAGGA, обратный праймер: 5'-GGC-CAAAAATGTAATCAGTGGGA). В результате получали продукты амплификации, содержащие 221 пару нуклеотидов. SSCP-электрофорез продуктов амплификации осуществляли в 15% полиакриламидном геле в ТБЭ-буфере (рН 8,3) в вертикальном аппарате в течение 10 ч при 230 В при комнатной температуре. Для амплификации гипермутабельного участка гена *K-ras* проводили ПЦР с использованием праймеров: 5'-TTTCTTAAGCGTTCGATGGAGG — прямой праймер и 5'-TCAAAGAATGGTCTGCACCAG — обратный праймер. SSCP-электрофорез продуктов амплификации осуществляли в 12% полиакриламидном геле в ТБЭ-буфере (рН 8,3), в вертикальном аппарате в течение

5 ч при 280 В при комнатной температуре. Специфичность амплификации была подтверждена методом прямого секвенирования. Результат SSCP-электрофореза визуализировали с помощью окрашивания нитратом серебра.

Результаты. Обследованы 11 пациентов с фолликулярным и папиллярным раком щитовидной железы, а также 10 контрольных проб плазмы и клеток крови, полученных от здоровых доноров. В результате исследования обнаружено, что у 5 (45%) из 11 пациентов имели место мутации 15-го экзона гена *B-raf* в ДНК, выделенной из плазмы крови, слюны и опухолевой ткани (подтверждено секвенированием). У 3 (27%) из 11 пациентов были выявлены мутации гипермутабельного участка гена *K-ras* в ДНК, выделенной из плазмы крови, слюны и опухолевой ткани. У 1 больного обнаружены мутации и в гене *B-raf* и в гене *K-ras*. В 10 контрольных пробах, полученных от здоровых доноров, мутаций в 15-м экзоне гена *B-raf* и 1-м экзоне гена *K-ras* в ДНК, выделенной из плазмы и клеток крови, не обнаружено.

Выводы. В нашем исследовании подтверждено появление мутантной формы генов *B-raf* и *K-ras* при раке щитовидной железы. Таким образом, анализ изменений в гене *B-raf* может производиться не только в опухолевой ткани, но и в плазме крови и слюне, что дает основу для оценки изменений генов *K-ras* и *B-raf* как молекулярно-генетического онкомаркера для мониторинга онкологических заболеваний щитовидной железы.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПЦР-АНАЛИЗ РЕАРАНЖИРОВОК ГЕНОВ IG/TCR ДЛЯ МОНИТОРИНГА МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ

А.Н. Мелешко, В.В. Федосенко, Н.В. Мигаль, Н.Н. Савва

РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Доказано, что наиболее достоверным и независимым прогностическим фактором при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), позволяющим оценить эффективность проводимой терапии и предсказать наступление рецидива, является анализ уровня минимальной «резидуальной» болезни (МРБ). Одним из признанных в настоящее время методов оценки МРБ в клинике является анализ с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) клональных реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора (Ig/TCR), который мы использовали в настоящем исследовании.

Материалы и методы. Всего в исследование включено 107 образцов от 34 больных ОЛЛ (31 пациент с В-линейным, 3 с Т-линейным ОЛЛ). Оценка МРБ выполнялась в фиксированных точках на этапах лечения: на этапе индукции — на 15-й день (30 образцов), в конце индукции — на 36-й день (33 образца), перед поддерживающей терапией — ПТ (31 образец) и после ПТ (13 образцов). Из 34 больных на сегодняшний день у 8 развился рецидив. Мишени для анализа МРБ — клональные реаранжировки генов Ig/TCR — выявляли в первичном образце костного мозга (КМ), взятого в день постановки диагноза, содержащего >90% бластных клеток. ПЦР-скрининг, гетеродуплексный анализ в полиакриламидном геле и секвенирование очищенного фрагмента ДНК мишени использовали для идентифи-

кации моноклональной реаранжировки генов IgH, IgK, TCRD и TCRG. Для мишени подбирали аллель-специфический олигонуклеотид (ACO), который использовали для ПЦР «в реальном времени» в паре с консервативным для каждого типа реаранжировки праймером и зондом. Для количественной обработки результатов применяли метод построения стандартной (калибровочной) кривой и определения стандартного количества (SQ) мишени в образце.

На 15-й день терапии все исследованные образцы были МРБ-позитивными; в конце индукционной терапии на 36-й день 14/33 (42%) образцов оставались МРБ-позитивными. Перед ПТ 3/31 (9,7%) образцов оставались МРБ-позитивными, и по завершению терапии только 1 пациент был определен как позитивный, хотя и в сочетании с очень низким уровнем МРБ (0,00112%); впоследствии у него развился рецидив. Более высокий средний уровень МРБ обнаружен у тех больных, у кого впоследствии развился рецидив во всех анализируемых временных точках: на 15-й ($p=0,22$) и 36-й ($p=0,07$) дни, перед ПТ ($p=0,025$) и после ($p=0,049$) ПТ. Нами выполнен сравнительный анализ результатов МРБ, полученных методами ПЦР и проточной цитометрии, проведенный параллельно у тех же пациентов. При сопоставлении совпадения «позитивного» и «негативного» результатов анализа обоими методами получена конкордантность, составляющая 76% случаев при учете образцов на 15, 36-й день и перед ПТ. При сопоставлении с данными литературы эти результаты можно оценить как высокий уровень конкордантности. Наилучшие данные (81,3%) получены при сравнении результатов на 15-й и 36-й дни терапии. Коэффициент корреляции количественных данных уровня МРБ между обоими методами был равен по Пирсону $r=0,87$; $p<0,0001$.

Выводы. Проанализированы причины случаев расхождения результатов. Мы предполагаем, что основные причины различий результатов МРБ между двумя методами связаны с забором и обработкой первичного материала КМ-пункции. Для получения сопоставимых результатов рекомендуется смешивать материал КМ перед проведением исследования МРБ в обеих лабораториях.

**О ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ ЭРИТРОПОЭТИНА
В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОГО
ОБНОВЛЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ЭКЗОЦЕРВИКСА У ЖЕНЩИН**

М.В. Мещерякова, Ю.М. Захаров

Южно-Уральский научный центр РАМН, Челябинск

Материалы и методы. Нами обследованы 52 женщины репродуктивного возраста от 18 до 49 ($30,67\pm 9,4$) лет, с сохраненной менструальной функцией, вне беременности и периода лактации, с нормальными показателями периферической красной крови. В соответствии с характером изменений многослойного плоского эпителия (МПЭ) шейки матки и признаков воспаления в строме все обследованные были разделены на 4 группы: контрольная группа — пациентки с неизменной шейкой матки ($n=11$); 1-я группа — с хроническим цервицитом — ХЦ ($n=14$), 2-я группа — с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (ЦИН)-1 ($n=17$), 3-я группа — с ЦИН-2 ($n=10$). Содержание эритропоэтина (ЭП) в 1 мл плазмы крови обследуемых определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы ЕРО — Erythropoietin («Biomerica Inc.»,

США). У обследованных с ЦИН-1—2 уровень ЭП плазмы крови составил $19,3\pm 2,56$ и $28,49\pm 5,53$ мЕД/мл соответственно, у женщин с неизменной шейкой матки $12,64\pm 0,95$, у пациенток с ХЦ $8,38\pm 1,69$ мЕД/мл. Мы предположили, что увеличенное содержание ЭП в плазме крови обследованных объясняется его повышенной продукцией эпителием слизистой оболочки шейки матки при данных ее морфофункциональных состояниях. Для проверки этого предположения мы сопоставили уровни ЭП в плазме крови и его присутствие в клетках МПЭ шейки матки, а также возможное влияние на регуляцию им процессов апоптоза и пролиферативную активность в клетках МПЭ у вышеуказанных групп обследованных. В биоптатах шейки матки экспрессию ЭП, bcl-2, p53 и ki-67 выявляли с помощью общепринятой иммуногистохимической методики. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к ЭП — Еро (N-19): sc-1310, «Santa Cruz Biotechnology Inc.», Калифорния, США), p53 (RTU-p53-DO7), bcl-2 (RTU-bcl-2), ki-67 («Novocastra», RTU-Ki-67-MM1, Великобритания).

Результаты. Установлено усиление экспрессии ЭП в клетках МПЭ экзоцервикса у лиц с ЦИН-1 и -2, сочетающееся с повышением уровня ЭП плазмы крови, активацией про- и антиапоптозных программ и процессов клеточной пролиферации в цервикальном эпителии, по сравнению с контролем. У здоровых лиц экспрессия ЭП, bcl-2, p53, ki-67 в параллельных срезах биоптатов шейки матки имела одинаковую локализацию в клетках базального слоя МПЭ шейки матки, в эпителии экзоцервикса в группах с ЦИН-1 и -2 — в клетках не только базального, но и промежуточного слоя эпителиального пласта, с формированием при этом очаговых скоплений.

Вывод. Можно полагать, что ЭП и в норме, и при ЦИН-1 и -2 принимает участие в пара- и аутокринной регуляции процессов клеточного обновления в цервикальном МПЭ, усиливая свои регуляторные эффекты при ЦИН.

**МУТАЦИИ В ГЕНЕ RUNX1
ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ**

А.А. Мигас, М.А. Кривко, Н.Н. Савва

РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Соматические точечные мутации в гене *RUNX1* встречаются при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у взрослых примерно в 40% случаев вторичных и 5—7% — первичных лейкозов, у детей данные отсутствуют. Мутации в этом гене относятся ко второму типу лейкомогенных событий, влияющих на процесс дифференцировки клеток крови, тогда как первую группу представляют мутации в генах, продукты экспрессии которых регулируют клеточную пролиферацию.

Цель исследования — анализ встречаемости мутаций в гене *RUNX1* при ОМЛ у детей.

Материалы и методы. В исследование включены 26 пациентов в возрасте от 1 года до 18 лет с первичными ($n=19$) и вторичными ($n=7$) ОМЛ, проходивших лечение в ГУ РНПЦДОГ в период с 1997 по 2008 г. Поиск мутаций осуществлялся с использованием метода однонитового конформационного полиморфизма с последующим секвенированием фрагментов, отличающихся по подвижности в геле от контроля.

Результаты. Мутации в гене *RUNX1* обнаружены у 6 из 26 пациентов, из них 5 больных имели моносомию 7 и 1 нормальный кариотип. У 4 из 6 вышеописанных пациентов с мутациями в гене *RUNX1* были выявлены также мутации в гене *NRAS* и у 1 в *FLT3*.

Вывод. Нами было показано, что соматические точечные мутации в гене *RUNX1* встречаются при детских ОМЛ, а также взаимодействуют в процессе лейкемогенеза с мутациями в гене *NRAS*, что согласуется с данными, полученными для взрослых пациентов.

ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ АКРОЦЕНТРИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМНЫХ ЛИНИЙ — SINM1, SH, SHEP С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU

В.И. Минина

Институт экологии человека СО РАН, Кемерово

Введение. Использование в практике цитологических и цитогенетических исследований метода гибридизации *in situ* с пробамии к различным последовательностям ДНК является на сегодняшний день основным инструментом для изучения пространственной организации хромосом, их специфичных локусов или отдельных генов в ядрах соматических клеток [Parada и соавт., 2003].

Материалы и методы. Было проанализировано пространственное расположение акроцентрических хромосом в структуре интерфазного ядра клеток 3 клеточных линий нейробластом SINM1 (2n), SH (2n), SHEP (4n), предоставленных Л. Trakhtenbrot (Институт гематологии медицинского центра им. Хаима Шеба, Израиль). Клетки фиксировали метанол-уксусным фиксатором (3:1) и раскапывали на охлажденные предметные стекла, высушивали на воздухе. Готовые препараты для визуализации районов ядрышкового организатора (ЯО) окрашивали нитратом серебра по методу W.M. Howell и D.A. Black (1980). Анализ проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss, фотографировали по 100 ядер, на фотографиях измеряли площади ядра и районов аргентофильных ЯО. Затем препараты отмывали насыщенным раствором красной кровяной соли и проводили процедуру гибридизации с ДНК-зондами для α -сателлитной ДНК акроцентриков: 13, 14, 15, 21, 22-й хромосомы в соответствии с рекомендациями производителя («Vysis»).

Результаты. Установлено, что большинство акроцентрических хромосом располагаются на территории ЯО (последние выглядят как светлоокрашенные зоны на темном фоне ядра). В клетках линии SINM1 наблюдалось в среднем 1,5 ЯО на ядро, суммарный размер которых составляет 13% площади ядра. Из 10 акроцентрических хромосом 7 обычно располагались на территории ЯО, а 3 оставались «свободными». В клетках линии SHEP наблюдалось 1,9 ЯО на ядро размером 14,9% площади ядра. На территории ЯО регистрировалось 8 хромосом, «свободно» лежащих — 2. В клетках линии SH наблюдали 5,6 ЯО на ядро с суммарным размером 9% площади ядра. На территории ЯО располагались чаще всего 6 хромосом, 4 хромосомы оставались «свободными».

Вывод. Линии SINM1 (2n) и SHEP (4n) отличаются более высокой активностью ЯО (большая площадь аргентофильных зон) и большей компактностью расположения акроцентриков, 70—80% которых лежат на территории ЯО.

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СПОРАДИЧЕСКОМ РАКЕ ПОЧКИ

Д.С. Михайленко^{1,2}, А.М. Попов³, О.Б. Карякин³, Р.В. Курьинин⁴, Ю.Г. Аляев⁴, Л.Э. Завалишина⁵, Г.А. Франк⁵, Д.В. Залетаев^{1,2}

¹ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва; ²НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова; ³ГУ МРНЦ РАМН, Москва; ⁴Урологическая клиника ММА им. И.М. Сеченова; ⁵МНИОИ им. П.А. Герцена

Введение. Ежегодно в мире регистрируют около 200 тыс. новых случаев рака почки (РП), что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии. В 1—2% случаев РП наблюдаются наследственные формы заболевания, однако подавляющее большинство опухолей почки развиваются спорадически.

Цель исследования — комплексный молекулярно-генетический анализ при РП, направленный на поиск и характеристику потенциальных маркеров заболевания.

Материалы и методы. Исследовали 127 образцов опухолей почки. Мутации в гене *VHL* выявляли с помощью SSCP-анализа и последующего секвенирования. Потерю гетерозиготности в областях локализации генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *TP53* определяли по STR-маркерам (по 2 микросателлитных локуса на каждый ген). Метилирование генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* изучали с помощью метилчувствительной полимеразной цепной реакции.

Результаты и обсуждение. Соматические мутации *VHL* были определены в 32% (39/123) случаев светлоклеточного РП, из них 33 мутации идентифицированы впервые. Хотя бы одно из нарушений *VHL* (мутации, потеря гетерозиготности и/или метилирование) обнаружено у 54% пациентов с I стадией заболевания, что свидетельствует об инактивации *VHL* на ранних стадиях светлоклеточного РП. Показано, что аллельные делеции двух и более генов-супрессоров в области 3p ассоциированы с наличием метастазов на момент постановки диагноза. Метилирование *VHL* определено в 14,2%, *RASSF1* — в 52,8%, *FHIT* — в 54,3%, *SFRP1* — в 33,1% и *CDH1* — в 41,7% случаев первичных опухолей. Метилирование как минимум одного из исследованных генов обнаружено в 85% образцов, что позволяет рассматривать эти гены как компоненты панели наиболее часто метилируемых локусов при РП. Метилирование гена *CDH1* ассоциировано с прорастанием опухоли капсулы почки и наличием метастазов.

Вывод. Полученные результаты указывают на возможность использования комплексного анализа нарушений *VHL*, потери гетерозиготности генов-супрессоров в области 3p, а также метилирования *CDH1* при разработке системы молекулярно-генетических маркеров РП, имеющей диагностическое и прогностическое значение.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЗ-АССОЦИИРОВАННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОТЕРАПИИ

Л.В. Мовчан, М.В. Белевцев, В.П. Савицкий

ГУ РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Определение минимальной резидуальной болезни (МРБ) при острых лейкозах является одним из основных критериев оценки эффективности лечения и прогнозирования рецидивов заболевания. Ведущий

подход в определении МРБ — мониторинг лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток.

Цель исследования — оценить степень изменения экспрессии основных лейкоз-ассоциированных иммунофенотипических маркеров опухолевых клеток на ранних этапах интенсивной химиотерапии.

Материалы и методы. Нами исследованы образцы костного мозга, полученные от 124 пациентов с первичным В-линейным острым лимфобластным лейкозом (Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ) на этапах лечения по протоколу МВ-2002. Исследования проводили на момент постановки диагноза, на 15-й и 33-й (36-й) дни индукции ремиссии, а также до начала и после окончания поддерживающей терапии. Оценку МРБ в образцах цельного костного мозга выполняли с использованием следующих комбинаций моноклональных антител: IgG1/IgG2a/CD19, CD45/CD14/CD19, CD20/CD10/CD19, CD58/CD10/CD19, CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCan в программах CellQuest Pro. Критерием МРБ у больных считалось [M.N. Dworzak и соавт.] выявление в костном мозге 0,01% лейкоэмических клеток и более.

Результаты. На 15-й день индукции ремиссии более чем у 90% пациентов обнаруживалось >0,01% лейкоэмических клеток в костном мозге. При исследовании на 36-й день процент лейкоэмических клеток, соответствующий наличию МРБ, зафиксирован у 40% больных. Анализ безрецидивной выживаемости показал, что пациенты, позитивные по МРБ на 36-й день, имели достоверно худший прогноз, чем пациенты с уровнем МРБ <0,01%. В данном исследовании мы сфокусировали внимание на методологических аспектах выявления остаточных опухолевых клеток и их иммунофенотипических особенностях. На 15-й день интенсивной химиотерапии, и далее на 36-й день, нами выявлены следующие закономерности: 1) на опухолевых клетках снижается уровень экспрессии CD10 и CD34 (причем и в случае его гетерогенной экспрессии); 2) степень экспрессии CD19, CD20, CD45RA и CD11a имела тенденцию к увеличению; 3) практически не изменялась экспрессия CD58 на опухолевых клетках. Примерно в 7% случаев не удалось объективно оценить уровень остаточных опухолевых клеток из-за потери (или значительного снижения) ими экспрессии CD10, причем в инициальном фенотипе опухолевые клетки были CD10-позитивны.

Вывод. Химиотерапевтические препараты, используемые на начальных этапах терапии, обладают значительными модулирующими свойствами по отношению к иммунофенотипу опухолевых клеток, что методологически затрудняет их определение.

**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА—ТРАНСПОРТЕРА
НОРАДРЕНАЛИНА КАК РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА С ПОМОЩЬЮ
¹²⁴I МЕЧЕННОГО МЕТА-ЙОДОБЕНЗИЛГУАНИДИНА**

М.А. Мороз^{1,2}, И.С. Серганова², Е.С. Мороз^{1,2}, Л.А. Агеева², Т.Н. Берестень², Е.А. Демина², П.Е. Занзони-ко², Е.Д. Бурнази², М.М. Дубровин^{1,2}, Р.Г. Бласберг², А.Г. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк, США

Введение. На основании исследований последних нескольких лет, в которых была рассмотрена возможность использования норадреналинового транспортера (НАТ) в качестве репортерного гена, нам удалось создать репортерную систему на основе НАТ и зеленого флюоресцирующего белка (ЗФБ) для использования как оптических, так и ядерных систем визуализации.

Материалы и методы. На основе промоторной последовательности цитомегаловируса был создан ретровирусный вектор, несущий НАТ и ЗФБ, разделенные внутренним участком присоединения к рибосоме. Этот вектор был использован для разработки клеточных линий и экспериментальных животных моделей. Клеточные линии, созданные путем трансдукции ретровирусным носителем, первоначально были сортированы методом проточной цитофлуориметрии по уровню экспрессии ЗФБ для достижения 100% положительной популяции, экспрессирующей исследуемый вектор. Функции НАТ у экспериментальных клеточных линий анализировали путем исследования транспорта радиомеченного йодом мета-йодобензилгуанидина (МИБГ — синтетического аналога норадреналина) *in vitro*. Экспериментальные животные модели создавали посредством введения трансдуцированных клеток подкожно иммунокомпрометированным мышам. Для оценки экспрессии и функции репортерных генов были проведены: позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная томография (ОФТ) и спектральный анализ флюоресценции.

Результаты. Трансдуцированные линии накапливали ¹²³I- и ¹²⁴I-меченный МИБГ в значительно более высоких количествах (200 раз и более), чем аналогичные клетки дикого типа. Используемые в работе клетки крысиной глиомы, человеческие предшественники Т-лимфоцитов, клетки карциномы молочной железы человека, нейробластомы человека и нормальные клетки почечной ткани обезьян после трансдукции показали резкое увеличение транспорта МИБГ. Разница в накоплении была, по всей видимости, обусловлена различными уровнями экспрессии репортерных белков и уровнем пассивного транспорта радиомеченной пробы из клеток в межклеточное пространство. Используемые методы оценки экспрессии и функции репортерных белков у животных продемонстрировали накопление пробы и наличие высокого флюоресцентного сигнала в опухолях. В серии визуализаций функции НАТ посредством ПЭТ и ОФТ выявлено значительное преимущество ¹²⁴I-меченной пробы над ¹²³I-меченной. В силу различных уровней энергии изотопов только ¹²⁴I-меченная проба, как более высокоэнергетическая, может быть использована для ПЭТ-исследований, которые отличаются более высокой разрешающей способностью. Более того, более длительный (101 ч для ¹²⁴I против 13 ч у ¹²³I) период полураспада позволял проводить анализ при помощи ¹²⁴I-меченной пробы через 48—72 ч после введения, что обуславливало высокое соотношение специфического сигнала над неспецифическим вследствие вымывания фоновой активности. Так, наибольшее соотношение для ¹²⁴I-меченной пробы было зафиксировано через 72 ч после инъекции и составило 300:1, тогда как лучшее соотношение для ¹²³I МИБГ было достигнуто через 16 ч после инъекции и было существенно ниже.

Вывод. В результате проведенного исследования продемонстрирован высокий потенциал НАТ как репортерного гена для лабораторного и клинического использования.

НЕИНВАЗИВНАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТАБИЛИЗАЦИИ HIF-1 α В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ *IN VIVO*

Е.С. Мороз^{1,2}, И.С. Серганова², М.А. Мороз^{1,2}, Р.Г. Бласберг², А.Г. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк, США

Введение. Транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) играет ключевую роль в ответе клетки на гипоксию, которая является характерной особенностью многих солидных опухолей. Он стабилизируется и накапливается при гипоксии, но при нормоксии быстро деградирует через убиквитин-протеасомную систему. Этот процесс регулируется гидроксилированием пролина. Для убиквитинизации требуется присутствие функционального белка von Hippel-Lindau (VHL), известного как белок—супрессор опухолевого роста. Путем молекулярного клонирования нами созданы репортерные генетические конструкции, несущие ДНК HIF-1 α , соединенную с ДНК репортерного гена Люциферазы (системы HIF-1 α /Люцифераза и HIF-1 α (ODD-)/Люцифераза с удаленным доменом кислородозависимой деградации) для визуализации и изучения механизмов стабилизации белка HIF-1 α в опухолевых клетках *in vivo*.

Материалы и методы. Разработаны животные мышинные модели путем подкожного введения nude мышам опухолевых клеток U87 (крысиной глиомы), экспрессирующих HIF-1 α /Люцифераза и HIF-1 α (ODD-)/Люцифераза репортерные системы. Через неделю после инъекции клеток, когда опухоли достигли размера около 5 мм, было проведено исследование на детекторе биоллюминесценции IVIS (Xenogen). Животных подвергали биоллюминесцентной визуализации до и после инъекции препарата, имитирующего гипоксию CoCl₂ (60 мг/кг) или CoCl₂ в сочетании с препаратом рапамицин (ингибитор молекулы—мишени рапамицина у млекопитающих — mTOR, 1 мг/кг).

Результаты. В опухолях, экспрессирующих HIF-1 α /Люцифераза после инъекции CoCl₂ наблюдалось усиление биоллюминесцентного сигнала в 3—4 раза по сравнению с первоначальным уровнем с достижением пика через 1,5 ч после инъекции. Лечение опухолей рапамицином приводило к снижению биоллюминесценции HIF-1 α /Люцифераза на 50%. Опухоли, экспрессирующие мутированный белок HIF-1 α (ODD-)/Люцифераза, практически не показали изменения в биоллюминесценции после инъекции CoCl₂.

Заключение. Повышение уровня экспрессии химерного белка HIF-1 α /Люцифераза как маркера стабилизации HIF-1 α может быть визуализировано в реальном времени при помощи биоллюминесценции. Возможность ингибирования HIF-1 α рапамицином свидетельствует о том, что стабилизация этого белка отчасти регулируется через mTOR-сигнальный путь. Неинвазивная визуализация разработанных репортерных систем может быть использована для скрининга ингибиторов HIF-1 α *in vitro* и *in vivo*.

НЕИНВАЗИВНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

ЭКСПРЕССИИ HIF-1 α В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ *IN VITRO*

Е.С. Мороз^{1,2}, И.С. Серганова², М.А. Мороз^{1,2}, Р.Г. Бласберг², А.Г. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк, США

Введение. Одной из наиболее характерных особенностей злокачественной опухоли, которая отличает ее от нормальных тканей и доброкачественных новообразований, является высокий уровень внутриопухолевой гипоксии. Ключевую роль в ответе клетки на гипоксию играет транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). Этот белок вовлечен в ангиогенез опухоли, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию и метастазирование, а также определяет резистентность опухоли к терапии. Белок HIF-1 α содержит домен кислородозависимой деградации (oxygen-dependent degradation domain ODD), который служит медиатором кислородорегулируемой стабильности белка. В условиях нормоксии HIF-1 не активен и характеризуется исключительно коротким периодом полураспада, т.к. его субъединица α подвергается деградации в протеасомах. Ключевой компонент этой нейтрализующей системы — белок VHL (von Hippel-Lindau), известный как белок-супрессор опухолевого роста. При этом необходимым условием для деградации является присоединение белка VHL к HIF-1 α . Пусковым механизмом для узнавания α -субъединицы белком VHL служит реакция гидроксирования пролинового остатка домена кислородозависимой деградации HIF-1 α . В нашей работе мы изучали влияние гипоксии и различных фармакологических препаратов на стабильность, деградацию и активность белка HIF-1 α с помощью биоллюминесцентной визуализации *in vitro* в различных клеточных линиях.

Материалы и методы. Путем молекулярного клонирования нами созданы репортерные генетические конструкции, несущие ДНК HIF-1 α , соединенную с ДНК репортерного гена Люциферазы (системы HIF-1 α /Люцифераза и HIF-1 α (ODD-)/Люцифераза с удаленным доменом кислородозависимой деградации). Для *in vitro* исследований были разработаны клеточные линии U87 (крысиная глиома), NIH3T3 (нормальные мышинные фибробласты), которые были трансдуцированы ретровирусным вектором, несущим одну из разработанных систем.

Результаты. При нормоксии уровень экспрессии HIF-1 α /Люцифераза в U87 и NIH3T3 клетках низкий, вследствие деградации системы. Инкубация тех же клеток в условиях гипоксии или в присутствии CoCl₂, имитирующего гипоксию, привела к усилению биоллюминесценции в 4 и 11 раз соответственно, что отражает стабилизацию и накопление белка HIF-1 α /Люцифераза. Данные биоллюминесцентной визуализации были подтверждены Вестерн блоттингом со специфическими антителами к HIF-1 α .

Также было показано, что активность белка HIF-1 α /Люцифераза может регулироваться различными препаратами, в частности ингибитором mTOR (mammalian target of rapamycin) рапамицином и ингибитором P13K LY294002. В клетках, экспрессирующих мутированный белок HIF-1 α (ODD-)/Люцифераза, при биоллюми-

несцентной визуализации не отмечалось протеосомной деградации при нормоксии. Эту систему применяли для изучения кислороднезависимой регуляции HIF-1 α . Неинвазивная визуализация созданных генетических репортерных конструкций может быть использована для скрининга ингибиторов протеосомной деградации и других препаратов, влияющих на стабилизацию, деградацию и активность HIF-1 α .

НОВЫЙ ГЕН ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПАТОФИЗИОЛОГИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

М.А. Мороз^{1,2}, И.С. Серганова², Е.С. Мороз^{1,2}, М.М. Дубровин^{1,2}, Р.Г. Бласберг², А.Г. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Нью-Йорк, США

Введение. Отдельным направлением в неинвазивном исследовании путей регуляции передачи сигналов *in vivo* является создание постоянно экспрессирующихся и индуцируемых репортерных систем. Одним из новых репортерных белков для оптической визуализации является люцифераза, выделенная из морского микроорганизма *Gaussia princeps*. Гауссия люцифераза имеет ряд преимуществ перед прочими люциферазами. Являясь небольшим мономерным протеином, она катализирует высокий уровень биолюминесценции ($1,24 \times 10^6$ Квс/мг). Субстратом для реакции служит колентеразин. Этот репортерный белок не токсичен и естественно секретируется из клеток млекопитающих, вероятно, за счет наличия 12 цистеинов в кодирующей последовательности, что позволяет осуществлять чрезмембранный транспорт за счет образования сульфидных связей с гликопротеинами клеточной мембраны.

Цель работы — создание системы для использования Гауссии люциферазы в анализе опухолей *in situ* и индуцируемых гипоксией систем на базе этого белка с оценкой эффекта по определению секретирующей фракции люциферазы в крови и моче.

Материалы и методы. Нами разработан ретровирусный вектор, содержащий Гауссию люциферазу и зеленый флюоресцирующий белок (ЗФБ). Данная система была использована для создания стабильно трансдуцированной клеточной линии крысиной глиомы с целью формирования мышинной модели. Для анализа и сортировки данной системы применен метод проточной цитофлюориметрии. Для преодоления секреции разработаны и созданы мутированные варианты Гауссии люциферазы с транскрипированной Н-концевой последовательностью, а также варианты комплексного протеина из Гауссии люциферазы с ЗФБ, ЗФБ + тимидин-киназа и кодирующей последовательностью сайта митохондриальной локализации. Конечным этапом стало создание индуцируемой гипоксией системы на основе вектора с Гауссией люциферазой и элементом реакции на гипоксию (hypoxia response element—HRE).

Результаты. Были созданы системы с диким типом и мутированными вариантами Гауссии люциферазы. Все системы показали высокий уровень биолюминесцентного сигнала по сравнению с нетрансдуцированными клетками. При сравнительном анализе исследований нативной Гауссии люциферазы *in vitro* and *in vivo* выявлена высокая активность в 2 раза выше, чем у ФайрФлай люци-

феразы и на порядок выше, чем у Рениллы люциферазы. В то же время мутированные варианты Гауссии люциферазы продемонстрировали резкое снижение секреции, сопровождаемое также ослаблением сигнала. Биолюминесцентный сигнал Гауссии люциферазы с транскрипированной Н-концевой последовательностью уступал нативной форме в 10 раз. Включение последовательности сайта митохондриальной локализации привело к 10% снижению сигнала ($6,5 \times 10^7$ до $7,1 \times 10^7$ фс/см²). В такой системе подкожные опухоли, созданные из трансдуцированных клеток, хорошо визуализировались, а секретирующая часть белка была обнаружена в моче и крови животных.

Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность определения активной формы репортерного протеина *ex vivo*.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ БИОЧИПЫ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ: ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Т.В. Наседкина, О.А. Каленник, О.Н. Митяева, В.Е. Барский, А.С. Заседателев

ГУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Трехмерные биочипы, изготовленные на основе акриламидного гидрогеля, являются удобной платформой для разработки диагностических тест-систем. Биочипы позволяют проводить одновременный параллельный анализ множества локусов генома. Преимуществами анализа на биочипах являются простота использования, наглядность результата и значительное сокращение времени проведения анализа по сравнению с другими методами. Это делает биочипы удобным инструментом при проведении скрининговых обследований.

ЛК-биочип, разработанный для диагностики лейкозов, способен анализировать до 13 типов транслокаций, включая >50 вариантов слияния последовательностей ДНК. Метод анализа клинического образца представляет собой комбинированное использование метода мультиплексной обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции и гибридизации на микрочипе. Чувствительность метода позволяет выявлять одну клетку с хромосомной перестройкой среди 10^3 нормальных клеток. За период 2006—2008 гг. с помощью этого подхода протестированы около 1400 пациентов. Метод сертифицирован Федеральной службой Росздравнадзора.

Аналогичный подход разработан для определения Т-клеточной клональности при диагностике Т-клеточных лимфом. В основе метода лежит анализ перестроенных локусов Т-клеточных рецепторов в популяции Т-лимфоцитов. Разработанный биочип содержит олигонуклеотидные зонды на γ - и δ -генах, которые участвуют в перестройках γ -цепи Т-клеточного рецептора и позволяет выявлять наличие моноклональных клеток в клиническом образце.

ПФ-биочип позволяет определять полиморфизм в 10 генах системы биотрансформации. Биочип был использован при анализе генетических факторов, ассоциированных с риском развития Т-лимфом и хронического лимфолейкоза у взрослых и острых лейкозов у детей. ПФ-биочип сертифицирован и применяется в Институте акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН.

Анализ экспрессии генов представляет большой интерес для классификации опухоли и прогноза при различных видах злокачественных новообразований. На примере биочипа для анализа экспрессии ряда генов при раке шейки матки рассматривается возможность создания диагностических экспрессионных биочипов.

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФЛАВОНОИДОВ

Р.С. Насибов¹, С.И. Павлова^{1,2}, Н.Б. Дмитриева^{1,2}, И.Г. Козлов^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГОУ ВПО РГМУ, Москва

В последние годы липосомы нашли широкое применение в качестве носителей лекарственных средств. Липосомальные формы доставки лекарственных препаратов имеют целый ряд преимуществ. Фосфолипидная структура липосомальной оболочки и маленький размер позволяют липосомам легче преодолевать гистогематические барьеры, улучшая фармакокинетику включенных в них лекарственных препаратов. Модифицируя мембрану липосом молекулами, тропными к определенным типам клеток, можно осуществлять направленную транспортировку лекарств. Липосомы и продукты их деградации не только не оказывают токсического действия, но и снижают токсичность заключенных в них веществ. Однако использование липосом имеет ограничения после попадания в организм большая часть липосом быстро поглощается клетками ретикулоэндотелиальной системы. Эту проблему пытаются решить созданием полимерных липосом и, в частности, включением в их состав пегелированных фосфолипидов.

Как носители лекарств, липосомы получают все более широкое применение в онкологии. В настоящее время в клинических испытаниях находятся липосомальные формы цитостатиков (доксорубин, топотекан, мелфалан и метотрексат). Эффективными в клинических исследованиях оказались иммунные липосомы, направленность действия которых достигается конъюгированием липосом, нагруженных цитостатиком, с моноклональными антителами (например, к рецептору эпидермального фактора роста Нег-2).

Флавоноиды — класс природных соединений, отдельные представители которого являются эффективными ингибиторами тирозинкиназ и других факторов сигнальных путей клетки. Экспериментально подтверждается их высокая противопухольная активность *in vitro*. Тем не менее эта потенциальная группа противоопухольных веществ имеет «слабую» фармакокинетику. Так, по данным некоторых авторов, биодоступность большинства флавоноидов при пероральном приеме составляет порядка 10% (в среднем 2—20%). По-видимому, это связано с выраженным их пресистемным метаболизмом (конъюгация с глюкуроновой кислотой и сульфатом). В связи с физико-химическими свойствами флавоноиды растворимы в неполярных растворителях, что является основой для создания липосомальных форм флавоноидов. Это может быть перспективным направлением в повышении их фармакологической эффективности.

ДИНАМИКА СКОРОСТИ РОСТА И ИММУНОФЕНОТИПА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА РАННИХ И ПОЗДНИХ ПАССАЖАХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ EX VIVO

Е.Ю. Осипова^{1,2}, Т.А. Астрелина^{1,2}, А.Ю. Устюгов², Б.Б. Пурбуева^{1,2}, Е.В. Скоробогатова¹, Т.В. Шаманская^{1,2}, З.М. Дышлевая¹, М.В. Яковлева², О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва; ²ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы

Введение. В последние годы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все шире применяются в клинике для клеточной терапии. Однако отсутствие стандартизованных методов выделения, культивирования и определения поверхностного фенотипа МСК требует выработки определенных критериев оценки клеток, выращенных *in vitro* для клинических целей. Необходимо быть уверенными в безопасности применения МСК у человека и прежде всего — в онкогенной безопасности.

Цель исследования — изучение динамики роста, изменения иммунофенотипических характеристик МСК человека на ранних (3—4-й) и поздних (10—12-й) пассажах при культивировании *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служил костный мозг здоровых доноров ($n=25$), забраный в целях аллогенной трансплантации пациентам с гематологическими заболеваниями.

Культивирование стромальных фибробластов костного мозга проводили по методу, предложенному А.Я. Фриденштейном и соавт. в 1973 г. Динамику роста клеточной популяции определяли по кратности прироста клеток: отношение числа клеток, полученное с данного пассажа к числу клеток, посаженному на предыдущем пассаже. Определение поверхностных маркеров клеток проводили с использованием следующей панели антител: CD3, CD13, CD14, CD19, CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 и HLA-DR. Определяли как относительное число клеток в культуре МСК (в %), экспрессирующих тот или иной антиген, так и относительную интенсивность флуоресценции изучаемых антигенов (в гMFI).

Результаты. Проведенные исследования показали, что МСК костного мозга 3—4-го пассажа при экспансии *ex vivo* с целью дальнейшего клинического применения обладают значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с культурами 10—12-го пассажа. Кратность прироста клеток составила 5,88 и 2,03 раза соответственно ($p=0,012$).

После культивирования в течение 3—4-го пассажа на МСК костного мозга наблюдалась высокая экспрессия (>60%) следующих маркеров: CD90, CD105, CD166, CD44, CD73, промежуточная (30—60%): CD13 и CD29. Стромальные клетки костного мозга не несли маркеры CD45, CD34, CD133, CD3, CD19, CD25, CD38, CD45, CD106, CD31 (доля положительных клеток <5%). При увеличении срока культивирования МСК до 10—12-го пассажа достоверно снижается лишь число клеток, экспрессирующих CD90 и CD166. С увеличением количества пассажей мезенхимальных клеток из культур исчезают примеси гемопоэтических (CD45⁺) и эндотелиальных клеток (CD31⁺), отмечается тенденция

к снижению числа моноцитов (CD14⁺). При увеличении срока культивирования МСК до 10—12-го пассажа, несмотря на снижение количества CD90⁺- и CD 31⁺-клеток, интенсивность экспрессии этих антигенов повышается. В наших экспериментах не выявлено достоверных изменений интенсивности экспрессии других исследованных антигенов на поверхности МСК при экспансии *in vitro*.

Выводы. Для применения МСК в клеточной терапии важно трансплантировать хорошо охарактеризованную, гомогенную популяцию клеток. На основании полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что в популяции культивируемых *in vitro* МСК линейная гомогенность клеток, наблюдаемая на 3—4-м пассаже, сохраняется и при увеличении срока культивирования до 10—12-го пассажа. Используемый в нашей работе протокол культивирования МСК позволяет получить достаточное для клинического применения число хорошо охарактеризованных клеток уже на 3—4-м пассаже. При необходимости использования в терапевтических целях МСК более поздних сроков экспансии следует осуществлять строгий контроль поверхностного фенотипа и генетической стабильности клеточных трансплантатов, что позволит в будущем избежать появления нежелательных отдаленных последствий клинического использования культур МСК.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА РАННИХ И ПОЗДНИХ ПАССАЖАХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *EX VIVO*

Е.Ю. Осипова^{1,3}, В.А. Никитина², Т.А. Астрелина^{1,3}, А.Ю. Устюгов³, Е.В. Дмитриева¹, Б.Б. Пурбуева^{1,3}, Е.В. Скоробогатова¹, Т.В. Шаманская^{1,3}, З.М. Дышлева¹, М.В. Яковлева³, О.А. Майорова^{1,3}, Л.Д. Катосова², С.А. Румянцев^{1,3}, Н.П. Бочков²

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва; ³ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы

Введение. Причины генетической нестабильности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) до конца не ясны. Условия и длительность культивирования — факторы, влияющие на высокую генетическую изменчивость клеток в культуре. К высокой генетической изменчивости могут привести различные повреждения ДНК, вызывающие мутации в протоонкогенах, генах — супрессорах опухоли, генах, ответственных за протекание ключевых событий клеточного цикла. Возникновение геномных мутаций и стабильных хромосомных aberrаций может приводить к дисбалансу работы тысяч генов. И то и другое может быть причиной высокого уровня хромосомных повреждений и образования клонов аномальных клеток в процессе культивирования. Необходимо быть уверенными в безопасности применения МСК у человека и прежде всего — в онкогенной безопасности.

Цель исследования — изучение генетической стабильности МСК человека на ранних (3—4-й) и поздних (10—12-й) пассажах при культивировании *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служил костный мозг здоровых доноров ($n=25$), забранный в целях аллогенной трансплантации пациентам с гематологическими заболеваниями.

Культивирование стромальных фибробластов костного мозга проводили по методу, предложенному А.Я. Фриденштейном и соавт. в 1973 г. Проводили кариотипирование (методом G-окраски, для каждой культуры МСК анализировали не менее 15 метафаз), анализ частоты анеуплоидии (методом анализа флюоресцентной гибридизации *in situ* в каждой культуре анализировали не менее 1000 интерфазных ядер).

Результаты. По светооптическим характеристикам МСК как на ранних, так и на поздних пассажах представляют собой гомогенную популяцию крупных по размеру клеток, отличающуюся от гемопоэтических. Кариотипирование МСК проведено в 9 культурах. Во всех случаях хромосомный набор культур МСК соответствовал нормальному — 46,XY или 46,XX — и не менялся в процессе культивирования. При оценке частоты анеуплоидии в культурах МСК было проанализировано около 25 000 ядер. В среднем число нормальных клеток с одной хромосомой X составило $99,40 \pm 0,12\%$ на ранних и $99,54 \pm 0,14\%$ на поздних пассажах. Частота ядер с двумя хромосомами X варьировала от 0,1 до 1,07% в разных культурах, а в среднем составила $0,52 \pm 0,10\%$ (ранние) и $0,46 \pm 0,14\%$ (поздние) пассажи. Нулисомия по хромосоме X зафиксирована как крайне редкое явление ($0,08 \pm 0,04\%$), что может быть связано с обнаружением разовых событий потери единственной X-хромосомы вследствие нерасхождения или отставания в процессе клеточного деления или может рассматриваться как гибридизационный артефакт. На ранних и поздних пассажах были зафиксированы ядра, нулисомные по хромосоме Y. Спонтанная частота потери хромосомы Y в культурах МСК варьировала от 0 до 0,87% на разных пассажах. Частота гиперплоидии (дисомия) составила $0,19 \pm 0,10\%$ как на ранних, так и на поздних пассажах. Не выявлено статистически достоверных различий в частотах разных типов анеуплоидий по хромосоме Y. Частота анеуплоидии по половым хромосомам не менялась в процессе культивирования и соответствует данным, полученным на культурах лимфоцитов человека. Исследование анеуплоидии по аутосомам (6, 8, 11-я хромосомы) выявило, что частота моносомии при длительном культивировании МСК костного мозга превышает частоту трисомии. В одной культуре МСК (№2) обнаружен клеточный клон с трисомией по хромосоме 8. Частота анеуплоидии по этой хромосоме была оценена на 4, 6 и 12-м пассажах. Появление клона наблюдается уже на 4-м пассаже и составляет примерно 24% от общего числа проанализированных клеток, на 6-м пассаже отмечено уже 34% ядер с трисомией по хромосоме 8. Однако к 12-му пассажи выявлено только 16% трисомных клеток в этой культуре.

Выводы. Результаты анализа анеуплоидии культивируемых клеток свидетельствуют о клональной гетерогенности популяции МСК и селективном преимуществе определенных клонов в процессе культивирования. При использовании в терапевтических целях МСК более поздних сроков экспансии следует осуществлять строгий контроль генетической стабильности клеточных трансплантатов, что позволит в будущем избежать возникновения нежелательных отдаленных последствий клинического использования культур МСК.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ И ПРОАПОПТОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.И. Павлова^{1,2}, Р.И. Насибов¹, И.Г. Козлов^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГОУ ВПО РГМУ, Москва

Введение. В настоящее время активно развиваются биотерапевтические подходы к лечению злокачественных новообразований, позволяющих максимально селективно воздействовать на опухоль. В частности, в основе этих подходов лежит использование индукторов апоптоза, ингибиторов ангиогенеза и препаратов, блокирующих передачу сигнала с рецепторов факторов роста в опухолевых клетках. С точки зрения агентов, способных эффективно регулировать данные процессы, в литературе обсуждаются противоопухолевые эффекты как комплексных растительных препаратов, так и отдельных их компонентов (флавоноидов, тритерпеноидов, каротиноидов и др.).

Материалы и методы. Нами изучены антипролиферативные и проапоптогенные эффекты экстракта корня солодки и его отдельных биологически активных веществ. Обнаружено, что экстракт корня солодки содержит соединения, эффективно подавляющие пролиферацию как лимфоцитов опухолевой линии P388, так и нормальных мышинных и человеческих митогенактивированных Т- и В-лимфоцитов. В то же время показано, что основной тритерпеноид корня солодки (глицирризиновая кислота) не обладает антипролиферативной активностью.

Исследование механизмов, лежащих в основе ингибирования пролиферации, показало, что они различны в опухолевых и нормальных клетках. Снижение скорости роста клеток опухолевой линии было связано с индукцией апоптоза, тогда как по отношению к нормальным лимфоцитам проапоптогенного эффекта выявлено не было. Параллельное сравнение антипролиферативных и проапоптогенных эффектов экстракта и эквивалентных доз глицирризиновой кислоты позволило предположить, что в качестве активного компонента, ответственного за обнаруженные эффекты, может выступать флавоноидная фракция экстракта корня солодки.

Выводы. Выявленные результаты позволяют надеяться, что компоненты экстракта корня солодки могут являться потенциальным источником для создания новых противоопухолевых препаратов. Наиболее перспективным, на наш взгляд, является изучение противоопухолевой эффективности веществ флавоноидной структуры.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСТРЕСС ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ИНФЕКЦИЯХ У ДЕТЕЙ

М.В. Пешикова, Е.В. Жуковская, И.И. Долгушин

Челябинская государственная медицинская академия

Цель исследования. Учитывая данные ранее выявленного иммунологического дистресса у детей на фоне инфекционных осложнений химиотерапии (Патент на изобретение № 2294540, Москва, 2007), нами поставлена цель изучить особенности варьирования уровня циркулирующих CD34⁺-клеток у детей с тяжелыми инфекциями в зависимости от нозологии, тяжести процесса, возраста и пола пациента.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование вошли 580 детей (соотношение мальчиков и девочек 1:1, средний возраст 5,75±0,24 года) с различными инфекционными заболеваниями (критерием тяжести служили общепринятые классификационные симптомы): острыми вирусными гепатитами В, С, В+С ($n=144$), острой кишечной инфекцией ($n=222$), тяжелой локальной инфекцией (фурункулез, пневмония и др.; $n=67$), генерализованной инфекцией (энцефалиты, менингиты, сепсис и др.; $n=147$). В качестве контроля использованы ранее полученные величины референтного интервала. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом люминесцентной микроскопии с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции в модификации С.В. Сибиряка и соавт. (1997) с использованием моноклональных антител анти-CD34 («МедБиоСпектр», Россия; «Caltag», США). Данные, обработанные методами вариационной статистики, выражали в виде среднего арифметического значения и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Использовали критерий Манна—Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты. Установлено, что в периферической крови детей с инфекциями, а именно — с острыми вирусными гепатитами ($10,14 \pm 0,45$, $p=0,000001$), острой кишечной ($11,7 \pm 0,44$, $p=0,000001$), тяжелой локальной ($10,19 \pm 0,72$, $p=0,0005$) и генерализованной ($10,59 \pm 0,82$, $p=0,00005$) инфекциями происходит достоверное повышение процентного содержания CD34-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами ($6,16 \pm 0,6$). Отмечена прямая связь с тяжестью процесса: у детей на фоне инфекционных заболеваний тяжелой и средней степени ($11,39 \pm 0,39$) уровень изучаемой популяции лимфоцитов достоверно выше, чем у пациентов с инфекционными процессами легкой степени ($10,16 \pm 0,38$, $p=0,02$). При этом уровень циркулирующих CD34⁺-клеток не имеет существенных различий в зависимости от нозологии заболевания и пола пациентов.

Выводы. Феномен повышенной мобилизации CD34⁺-клеток характерен, в первую очередь, для острых инфекционных заболеваний и рассматривается нами как универсальная неспецифическая стрессовая реакция организма в ответ на инфекцию.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРАНСЛОКАЦИИ (6;11)(q27;q23): ОПИСАНИЕ 3 СЛУЧАЕВ

О.М. Плеханова¹, Г.А. Цаур^{1,2}, А.С. Иванова^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница №1; ²ГУЗ СО Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; ³Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Введение. Транслокация t(6;11)(q27;q23) обнаруживается при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ), преимущественно при М4- и М5-вариантах согласно FAB-классификации. В результате транслокации t(6;11)(q27;q23) образуется химерный ген *MLL-MLLT4*. В 67% случаев t(6;11) является единственной цитогенетически выявляемой клоновой аномалией [Martineau и соавт., 1998]. Дополнительные аномалии могут быть как числовыми (дополнительные копии хромосом 8, 19, 21 и др.), так

и структурными. Описаны варианты транслокации, а также инверсии, инсерции и делеции. Транслокация часто выглядит как $del(11)(q23)$, что затрудняет ее идентификацию.

Материалы и методы. В период с декабря 2007 г. по ноябрь 2008 г. нами были выявлены 3 пациента с транслокацией $t(6;11)$. Комплекс обследований включал в себя, наряду с цитологическим анализом костного мозга, стандартным цитогенетическим исследованием (СЦИ) нестимулированных суточных культур костного мозга, методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием локус-специфичного зонда (ЛС3) LSI MLL Dual Color Rearrangement Probe 11q23 («Vysis», США), а также FISH с цельнохромосомными зондами 6-й и 11-й хромосом ХСР-6 и ХСР-11 («Methasystems», Германия).

Результаты. Пациент 1 — мальчик, 13 лет, ОМЛ М1-вариант по FAB, инициальный лейкоцитоз $94,9 \times 10^9/\text{л}$. Стандартный вариант транслокации $t(6;11)(q27;q23)$ выявлен в ходе цитогенетического исследования костного мозга как единственная аномалия кариотипа. При помощи FISH, проведенной на метафазных пластинках, с использованием ЛС3 обнаружено расщепление сигнала гена *MLL* с локализацией химерного гена на 11-й хромосоме. Применение цельнохромосомных зондов для 6-й и 11-й хромосом также подтвердило наличие транслокации. Методом обратнотранскриптазной (ОТ) ПЦР с последующим секвенированием обнаружен химерный ген *MLL-MLLT4* с точками слияния в 9-м и 2-м экзонах соответственно.

Пациент 2 — мужчина, 58 лет, ОМЛ М4-вариант по FAB-классификации, инициальный лейкоцитоз $5,5 \times 10^9/\text{л}$. Цитогенетически обнаружены множественные нарушения кариотипа: $46,XY,del(5)(q?),add(5)(q?),del(6)(q23),del(11)(q23)$. При исследовании методом FISH с использованием ЛС3 обнаружена делеция 3'-конца гена *MLL*. При применении цельнохромосомных зондов для 6-й и 11-й хромосом выявлена комплексная транслокация с участием 5-й хромосомы: $46,XY,del(5)(q?),der(5)t(5;6;11)(q22;q15q27;q23),der(6)t(5;6)(q22;q15),der(11)$. Методом ОТ-ПЦР обнаружен химерный ген *MLLex9-MLLT4ex2*.

Пациентка 3 — женщина, 48 лет, ОМЛ М5а, инициальный лейкоцитоз $17,9 \times 10^9/\text{л}$. В ходе ОТ-ПЦР выявлен химерный ген *MLL-MLLT4*, тогда как при цитогенетическом исследовании обнаружен нормальный кариотип. При проведении FISH с ЛС3 отмечено распределение флюоресцентных сигналов 1G2F, в то время как при использовании цельнохромосомных зондов для 6-й и 11-й хромосом перестройки не обнаружено. Учитывая наличие химерного гена *MLL-MLLT4*, а также нестандартное распределение флюоресцентных сигналов, в данном случае может иметь место микроинсерция части 5'-конца гена *MLL* в регион $6q27$. Кроме того, для образования химерного гена на хромосоме-партнере эта транслоцированная часть гена *MLL* также должна была претерпеть инверсию.

Выводы. При кариотипировании генетические перестройки, результатом которых является формирование химерного гена, зачастую могут выглядеть необычно и/или неоднозначно. В части случаев $t(6;11)(q27;q23)$ не выявляется с помощью СЦИ. Данные нашей работы де-

монстрируют различные механизмы образования химерного гена *MLL-MLLT4* в случае транслокации $t(6;11)(q27;q23)$. Комплекс диагностических мероприятий необходимо дополнять молекулярно-генетическими методами, такими как FISH и ОТ-ПЦР.

ЗАВИСИМОСТЬ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ОТ ПОЛА И МАССЫ ТЕЛА НОВОРОЖДЕННЫХ

С.А. Плясунова¹, Е.В. Боякова^{1,2}, А.Б. Пашенко^{1,2}, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Изучение особенностей пуповинной крови позволяет определить факторы прогноза эффективности и оптимизации процедуры выделения лейкоцитов пуповинной крови, что является актуальной задачей для совершенствования технологий выделения и хранения лейкоцитарной фракции пуповинной крови.

Цель исследования — изучение зависимости клеточного состава пуповинной крови от пола и веса новорожденного.

Материалы и методы. Материалом служила пуповинная кровь 1004 доношенных новорожденных, родившихся на 37—41-й неделе гестации. Пуповинную кровь забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5—15 мин после родов до отделения плаценты. Клеточный состав определяли при помощи автоматического анализатора ABX Pentra 60 C+ и у части образцов ($n=341$) — с использованием светооптической микроскопии в окраске по Романовскому — Гимзе. Из 1004 образцов мальчиков и девочек было 524 (52,2%) и 480 (47,8%) соответственно.

При сравнении полученных данных отмечено, что у девочек количество лейкоцитов ($17,74 \pm 0,24 \times 10^9/\text{л}$) выше, чем у мальчиков ($16,8 \pm 0,23 \times 10^9/\text{л}$), $p=0,005$. При этом у девочек наблюдается большее число нейтрофилов по сравнению с лимфоцитами, моноцитами и эозинофилами. Уровень эритроцитов ($4,33 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$) и гемоглобина ($15,51 \pm 0,07$ г/л) у девочек ниже, чем у мальчиков ($4,46 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$; $15,95 \pm 0,06$ г/л; $p<0,0001$), то же самое и с уровнем гематокрита: $31,79 \pm 0,2$ и $32,76 \pm 0,19\%$ соответственно ($p<0,0001$). Различий в эритроцитарных индексах (MCV, MCH, MCHC, RDW) в зависимости от пола не обнаружено. Количество тромбоцитов у девочек ($314,87 \pm 2,98 \times 10^9/\text{л}$) больше, чем у мальчиков ($300,72 \pm 2,62 \times 10^9/\text{л}$; $p<0,0001$). При разделении на группы по массе тела при рождении мальчиков было больше в группе с массой >4000 г ($p=0,001$), а девочек — в группе 2500—3000 г ($p=0,008$). Однако при исследовании групп, сходных по массе тела при рождении, различия в параметрах крови между мальчиками и девочками сохранялись. Показано, что с увеличением массы тела ребенка при рождении возрастает и уровень лейкоцитов: от $15,52 \pm 0,59 \times 10^9/\text{л}$ в группе с массой 2500—3000 г до $17,51 \pm 0,44 \times 10^9/\text{л}$ в группе с массой >4000 г ($p=0,01$). Также увеличивается абсолютное количество нейтрофилов и эозинофилов ($p<0,0001$ и $p=0,004$ соответственно), а число моноцитов уменьшается ($p<0,0001$).

Выводы. Показано достоверно большее количество нейтрофилов и меньшее — лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов у девочек, не зависящее от массы тела ребенка при рождении. При увеличении массы тела новорожденного при рождении увеличивается абсолютное количество лейкоцитов (за счет нейтрофилов) и повышается уровень гематокрита.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОСКОПИИ И АВТОМАТИЧЕСКОГО СЧЕТЧИКА

С.А. Плясунова^{1,2}, О.А. Майорова^{1,2}, М.В. Яковлева¹, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Совершенствование технологий выделения и хранения лейкоцитарной фракции пуповинной крови привело к возможности создания банков пуповинной крови. Необходимость скринингового обследования большого количества поступающего из родильных домов материала, а также некоторые физиологические особенности пуповинной крови продиктовали целесообразность сравнения эффективности различных методов подсчета клеток пуповинной крови.

Цель исследования — сравнение результатов определения количества клеток пуповинной крови при помощи микроскопии и при использовании автоматического счетчика клеток крови.

Материалы и методы. Материалом служила пуповинная кровь 340 доношенных новорожденных, родившихся на 37—41-й неделе гестации. Пуповинную кровь забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5—15 мин после родов до отделения плаценты. Клеточный состав в каждом случае определяли двумя методами: при помощи автоматического анализатора ABX Pentra 60 C+ и с использованием светооптической микроскопии в окраске по Романовскому — Гимзе. Число лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и концентрация гемоглобина были скорректированы для исключения влияния различий в доле антикоагулянта в исследуемых образцах.

Результаты. При определении с помощью микроскопии получено достоверно большее количество нейтрофилов ($57,48 \pm 0,47\%$), чем при использовании автоматического счетчика ($47,48 \pm 0,44\%$; $p < 0,0001$). Число лимфоцитов ($32,76 \pm 0,36$; $28,66 \pm 0,43\%$; $p < 0,0001$), моноцитов ($14,64 \pm 0,24$; $9,95 \pm 0,19\%$; $p < 0,0001$), эозинофилов ($3,86 \pm 0,1$; $3,28 \pm 0,13\%$; $p < 0,0001$) и базофилов ($1,25 \pm 0,04$; $0,61 \pm 0,03\%$; $p < 0,0001$), наоборот, оказалось больше при определении с помощью автоматического счетчика. Полученные закономерности не зависели от сроков гестации, количества лейкоцитов, степени разведения образца пуповинной крови антикоагулянтом, времени, прошедшего после родов до начала забора и обработки пуповинной крови. Средний уровень нормобластов, которые могут быть посчитаны автоматическим счетчиком, как лимфоциты, составил $5,62 \pm 0,33$: 100 лейкоцитов ($n = 339$), разброс 0—38.

Вывод. Установлено достоверное различие в подсчете лейкоцитарной формулы автоматическим счетчиком и при светооптической микроскопии, которое может быть связано с наличием физиологических особенностей клеток пуповинной крови и физическими характеристиками автоматического анализатора.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Э.А. Подколзина¹, Е.Э. Карпова¹, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Определение факторов, влияющих на эффективность процедуры выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови, является актуальной задачей для эффективной работы банков пуповинной крови.

Цель исследования — поиск факторов, оказывающих влияние на эффективность процедуры выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови.

Материалы и методы. Материалом служила пуповинная кровь 1095 доношенных новорожденных, родившихся на 37—42-й неделе гестации. Пуповинную кровь забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5—15 мин после родов. Клеточный состав определяли при помощи автоматического анализатора ABX Pentra 60 C+ и у части образцов ($n=341$) — с использованием светооптической микроскопии в окраске по Романовскому — Гимзе.

Результаты. Показано, что абсолютное количество лейкоцитов после проведения процедуры выделения уменьшается и составляет $71,45 \pm 0,35\%$, общее число мононуклеарных клеток — $74,05 \pm 0,4\%$, лимфоцитов — $76,48 \pm 0,45\%$ от исходного количества. Остаточное количество эритроцитов в образце составляет в среднем $28,56 \pm 0,43\%$. Отмечается снижение эффективности выделения лейкоцитарной фракции с увеличением срока гестации с $75,85 \pm 3,53\%$ на 37-й неделе до $67,8 \pm 2,46\%$ — на 41-й ($p=0,043$). Эффективность выделения максимальна на 39-й неделе гестации: $80,11 \pm 0,95\%$ (лейкоциты) и $82,46 \pm 1,01\%$ (лимфоциты). На эффективность выделения оказывает влияние число лейкоцитов (WBC) перед началом обработки: при $WBC < 10 \times 10^9/\text{л}$ ($n=354$) эффективность выделения лейкоцитов составляет $73,19 \pm 0,52\%$, лимфоцитов $76,55 \pm 0,71\%$; при $WBC 10—20 \times 10^9/\text{л}$ ($n=694$) $70,81 \pm 0,44$ и $76,57 \pm 0,5\%$; при $WBC > 20 \times 10^9/\text{л}$ ($n=44$) $63,61 \pm 1,86$ и $68,15 \pm 2,39\%$ соответственно ($p < 0,0001$). На эффективность выделения оказывает влияние степень разведения пуповинной крови антикоагулянтом: эффективность выделения лейкоцитов повышается с $67,67 \pm 1,2\%$ при степени разведения $< 20\%$ до $74,99 \pm 1,18\%$ при степени разведения $> 40\%$ ($p < 0,0001$) и максимальна при средней доле антикоагулянта в образце пуповинной крови (20—40%).

Вывод. Показана зависимость эффективности процедуры выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови от срока гестации, количества лейкоцитов перед началом обработки и степени разведения пуповинной крови антикоагулянтом.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ДВОЙНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ И АППАРАТНОГО МЕТОДА ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Э.А. Подколзина¹, Е.Э. Карпова¹, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Совершенствование технологий выделения и хранения лейкоцитарной фракции пуповинной крови привело к возможности создания банков пуповинной крови. Оптимизация процедуры выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови является актуальной задачей для эффективной работы банков пуповинной крови.

Цель исследования — анализ эффективности выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови методом двойного центрифугирования и аппаратным методом.

Материалы и методы. Материалом служила пуповинная кровь 1095 доношенных новорожденных, родившихся на 37—42-й неделе гестации. Пуповинную кровь забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5—15 мин после родов. Клеточный состав определяли при помощи автоматического анализатора ABX Pentra 60 C+. Процедуру выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови проводили при помощи метода двойного центрифугирования с использованием ручного плазмоекстрактора ($n=539$) и аппарата для выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови Sерах («Biosafe», Швейцария), $n=554$.

Результаты. Отмечено, что при использовании метода двойного центрифугирования эффективнее происходило выделение общего количества лейкоцитов — $72,4 \pm 0,45\%$ против $70,28 \pm 0,51\%$ ($p=0,002$), однако при этом потери мононуклеарной фракции и лимфоцитов были значительно выше: мононуклеарная фракция $70,11 \pm 0,49\%$ против $77,94 \pm 0,53\%$ ($p<0,0001$); лимфоциты $71,7 \pm 0,54\%$ против $80,73 \pm 0,58\%$ ($p<0,0001$). Это, по-видимому, происходило за счет более эффективной редукции остаточного количества эритроцитов при аппаратном методе — остаточное число эритроцитов составило $36,45 \pm 0,51\%$ при методе двойного центрифугирования против $20,85 \pm 0,5\%$ — при аппаратном методе ($p<0,0001$).

Вывод. Установлена большая эффективность использования аппаратного метода выделения лейкоцитарной фракции пуповинной крови с применением сепаратора Sерах.

ПРОФИЛАКТИКА НЕЙРОЛЕЙКЕМИИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПОВЫШЕННОГО РИСКА

Н.И. Пономарева, Ю.В. Румянцева, Л.Г. Фечина, О.В. Алейникова, А.В. Шамардина, М.Ю. Горошкова, К.Л. Кондратчик, Н.В. Мякова, Д.В. Литвинов, Е.Г. Мансурова, С.Р. Варфоломеева, О.Б. Козлова, О.И. Плаксина, В.Н. Тимофеева, Ю.Г. Абугова, О.Ю. Фукс, А.И. Карачунский

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

Введение. Залог успешного лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей — достаточный объем терапии, направленной на центральную нервную систему (ЦНС), без которой вероятность развития нейрорецидивов составляет около 75% [А.Е. Evans, 1970]. Базовыми элементами ее являются краниальное облучение и интратекальная химиотерапия. Краниальное облучение имеет высокий риск осложнений в виде задержки роста, нарушений интеллекта и развития вторичных опухолей ЦНС. В настоящее время многие кооперативные группы пытаются отказаться от краниального облучения и заменить его другими терапевтическими элементами, эффективными в профилактике нейрорлейкемии.

Цель исследования. Сравнить результаты профилактики нейрорлейкемии в зависимости от различных вариантов системной и локальной химиотерапии у пациентов, получавших терапию в различных клиниках России и Белоруссии по протоколам серии «Москва—Берлин».

Материалы и методы. В данный анализ включены 486 первичных пациентов с ОЛЛ, относящихся к промежуточной группе риска (ImRG), зарегистрированных в период с июля 1991 г. до июля 2007 г. Из них 133 ребенка получали терапию по протоколу ALL-MB-91 и 353 — по протоколу ALL-MB-2002.

Результаты. Показано, что эффективность профилактики нейрорлейкемии в целом и у отдельных подгрупп больных ImRG на протоколе ALL-MB-2002 достоверно лучше, чем на протоколе ALL-MB-91. 5-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) пациентов промежуточной группы риска, получавших терапию по протоколу ALL-MB-2002, достоверно выше, чем таковая на протоколе ALL-MB-91 (84 и 74% соответственно; $p=0,017$). 5-летний кумулятивный риск развития изолированных нейрорецидивов на протоколе ALL-MB-2002 ($2,83 \pm 0,01\%$) статистически значимо ниже, чем на протоколе ALL-MB-91 ($8,27 \pm 0,06\%$; $p=0,0086$). У больных, получавших терапию по протоколу ALL-MB-2002, кумулятивный риск развития изолированных нейрорецидивов оказался достоверно выше при использовании метилпреднизолона, чем таковой при применении дексаметазона ($4,38 \pm 0,03$ и $0,57 \pm 0,01\%$ соответственно; $p=0,024$). Не получено достоверных различий в БРВ в зависимости от дозы метотрексата (MTX), но отмечается тенденция к увеличению числа изолированных нейрорецидивов при использовании MTX в дозе 30 мг/м² (кумулятивный риск развития изолированных нейрорецидивов при использовании низких доз MTX $4,67 \pm 0,03\%$, высоких доз MTX $1,22 \pm 0,01\%$; $p=0,064$).

Выводы. Профилактика нейрорлейкемии у пациентов промежуточной группы риска на протоколе ALL-MB-2002 достоверно лучше, чем на протоколе ALL-MB-91. Это, возможно, связано с введением 3 дополнительных люмбальных пункций во время терапии консолидации. Принципиальным является определение вклада высоких доз MTX в профилактику нейрорлейкемии у таких больных, однако для этого необходимо большое количество пациентов и более длительные сроки наблюдения. Дексаметазон, несмотря на то, что его доза по фармакологическим свойствам была ниже, показал преимущество по сравнению с метилпреднизоло-

ном в контексте профилактики нейрорлейкемии в данной группе больных. Это еще раз свидетельствует о важности профилактики нейрорлейкемии на ранних этапах терапии ОЛЛ.

МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ДЕТЕЙ С В-ЛИНЕЙНЫМИ ОСТРЫМИ ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ ВО ВРЕМЯ ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ ПО ПРОТОКОЛАМ ALL-MB-2002 И MLL-BABY

А.М. Попов^{1,2,3}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, А.С. Иванова^{1,2}, О.В. Стренева¹, О.П. Хлебникова¹, Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Центр детской онкологии и гематологии областной детской клинической больницы № 1; ²ГУЗ Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; ³Уральская Государственная медицинская академия, Екатеринбург

Цель исследования — методом многоцветной проточной цитометрии определить наличие и уровень минимальной остаточной болезни (МОБ) в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами (ALL) во время индукционной терапии по российским протоколам лечения ALL-MB-2002 и MLL-Baby (интенсивность индукционной терапии в данных протоколах одинакова).

Материалы и методы. Определение содержания МОБ в костном мозге 63 детей (в том числе 13 — раннего возраста) с В1-ALL ($n=12$) и ВП1-ALL ($n=51$) в возрасте от 2 мес до 9 лет, получавших лечение по протоколам ALL-MB-2002 и MLL-Baby, производилось методом 4—6-цветной проточной цитометрии на 15-й ($n=31$) и 36-й ($n=58$) дни терапии.

Результаты. 11 (35,48%) из 31 и 37 (65,52%) из 58 пациентов оказались МОБ-негативными на 15-й и 36-й дни соответственно. Содержание остаточных опухолевых клеток в МОБ-позитивных случаях варьировало от 0,07 до 78,28% на 15-й день и от 0,013 до 5,570% — на 36-й. На 15-й день у 9,68% больных уровень МОБ варьировал от 0,01 до 0,1%, у 9,68% — от 0,1 до 1%, у 19,35% — от 1 до 10% и у 25,81% был >10%. На 36-й день у 10,34% пациентов уровень МОБ варьировал от 0,01 до 0,1%, у 12,07% от 0,1 до 1% и у 12,07% был >1%. Число МОБ-позитивных пациентов на 15-й день оказалось достоверно выше среди детей 1-го года жизни по сравнению с более старшими ($p=0,015$), среди пациентов с перестройками гена MLL по сравнению с остальными ($p=0,012$), а также среди больных, стратифицированных в группы промежуточного и высокого риска, по сравнению с группой стандартного риска ($p=0,02$ и 0,03 соответственно). Не обнаружено достоверных корреляций МОБ-статуса на 36-й день, а также уровня МОБ с возрастом, ветвью терапии, наличием перестроек MLL. Динамика элиминации опухолевых клеток во всех случаях была различна.

Выводы. У значительной части больных во время и по окончании индукционной терапии по протоколам ALL-MB 2002 и MLL-Baby в костном мозге остаются опухолевые клетки. Прогностическая значимость мониторинга МОБ методом проточной цитометрии во время индукционной терапии в рамках данных протоколов нуждается в дальнейшем исследовании.

АБЕРРАНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

BAALC И WT1 ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

А.С. Романцова¹, А.М. Кустанович²

¹Белорусский государственный университет; ²РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Клональные цитогенетические аберрации — один из наиболее существенных факторов, позволяющих прогнозировать исход заболевания. Группа с нормальной цитогенетикой традиционно лечится как имеющая промежуточный риск, но на самом деле является гетерогенной группой, в которую входят пациенты, по-разному отвечающие на терапию, а исход может быть предсказан на основании наличия/отсутствия мутаций или изменения экспрессии генов, таких как *WT1*, *CEBPA*, *VAX*, *BAALC*, *EVII*, *KIT* и *FLT3*.

Материалы и методы. Экспрессия генов *BAALC* и *WT1* была исследована в клетках здоровых доноров ($n=4$), клеточных линиях ($n=4$) и 41 образце костного мозга (КМ), полученных у пациентов с острым миелоидным (ОМЛ) или острым лимфобластным (ОЛЛ) лейкозом.

Результаты. В клетках крови здоровых людей экспрессия изучаемых генов отсутствует, тогда как в клетках детей с острыми лейкозами она варьирует в широких пределах. В клеточных линиях экспрессия *BAALC* практически не определялась, а экспрессия *WT1* выявлялась в клеточных линиях гемопозитического происхождения (Jurkat, NB4), но не в клеточных линиях HeLa или RD.

Уровень экспрессии обоих генов был значительно выше в бластных клетках миелоидного ряда (при ОМЛ по сравнению с ОЛЛ). При этом пациенты с М4-морфологией бластных клеток характеризовались наиболее низкими значениями экспрессии *WT1* и высокими — *BAALC*.

При ОЛЛ опухолевые клетки Т-линейного происхождения имели более выраженную экспрессию *WT1* и более низкую — *BAALC*, хотя это различие было недостоверно.

Общая выживаемость у пациентов с низкой и высокой экспрессией *BAALC* не различалась, тогда как пациенты с высокой экспрессией характеризовались несколько лучшим прогнозом в отношении безрецидивной выживаемости.

Более благоприятные показатели выживаемости отмечены у пациентов с низкой экспрессией *WT1*. Исследование прогностической значимости совместной экспрессии обоих маркеров показало, что наихудшим прогнозом обладают пациенты с высокой экспрессией (более медианы) как *WT1*, так и *BAALC*, в то время как у детей без экспрессии *WT1* выживаемость была лучше, особенно в случае коэкспрессии гена *BAALC*. Следует отметить, что вследствие небольшого размера проанализированной выборки выявленные различия статистически недостоверны.

Выводы. Показано, что экспрессия генов *WT1* и *BAALC* определяется в образцах пациентов с острым лейкозом и не определяется в клетках крови здоровых людей. Экспрессия генов *WT1* и *BAALC* варьирует в зависимости от линейной принадлежности и стадии дифференцировки бластных клеток. Отсутствие или низкая экспрессия гена *WT1*, особенно при наличии экспрессии гена *BAALC*, является прогностически благоприятным

признаком, определяющим более высокую выживаемость у детей с острым лейкозом.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ СТАНДАРТНОЙ ГРУППЫ РИСКА ПО ПРОТОКОЛУ ALL-MB-2002

Ю.В. Румянцева, М.Ю. Горошкова, Н.И. Пономарева, Л.Г. Фечина, О.В. Алейникова, А.В. Шамардина, О.Б. Козлова, С.А. Дудкин, К.Л. Кондратчик, Э.Г. Бойченко, Н.В. Мякова, Л.М. Минкина, Д.В. Литвинов, К.С. Асланян, Е.С. Банщикова, Е.В. Башарова, Т.П. Загоскина, Е.Г. Мансурова, Г.П. Павлова, С.Р. Варфоломеева, О.И. Плаксина, В.Н. Тимофеева, Ю.Г. Абугова, О.Ю. Фукс, А.И. Карачунский, А.Г. Румянцев

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

Цель исследования — провести анализ предварительных результатов терапии у пациентов стандартной группы риска (SRG), получивших терапию по программе ALL-MB-2002.

Материалы и методы. В анализ включены 1050 первичных пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) SRG, в возрасте от 1 года до 18 лет, зарегистрированных в период с 01.05.2002 г. до 01.07.2007 г. в клиниках России и Беларуси, вошедших в исследование ALL-MB-2002. Из них 389 пациентов получали терапию дексаметазоном (DEXA) в дозе 6 мг/м² в индукции и 380 — метилпреднизолоном (MEDROL) в дозе 60 мг/м². Терапия MEDROL в дозе 120 мг/м²/сут оказалась высокотоксичной, в связи с чем эта ветвь рандомизации была рано остановлена, поэтому подгруппа больных, получавших MEDROL в дозе 120 мг/м², не включена в сравнительный анализ эффективности режимов стероидной терапии из-за своей малочисленности. 425 пациентов в терапии консолидации получали L-аспарагиназу MEDAC в дозе 5000 ЕД/м² и 436 в дозе 10 000 ЕД/м².

Результаты. 6-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) для пациентов SRG составила 76±2%. Смерть в индукции зарегистрирована у 3,7% больных, в ремиссии — у 4,9%. Частота рецидивов составила 9,7%.

При сравнении 2 режимов стероидной терапии в индукции не было найдено различий в 6-летней БСВ и общей выживаемости (ОВ) 2 групп пациентов (БСВ: DEXA 77±4%; MEDROL 71±8%; $p=0,49$; ОВ: DEXA 84±3%; MEDROL 83±3%; $p=0,46$). Отсутствовали различия в частоте ранних смертей между пациентами, получавшими DEXA в дозе 6 мг/м² и MEDROL — 60 мг/м² (2,8 и 3,5% соответственно; $p=0,82$), а все другие события эквивалентно распределились между обеими ветвями протокола. Однако частота развития изолированных рецидивов со стороны центральной нервной системы (ЦНС) была слегка выше у больных, получающих MEDROL в дозе 60 мг/м², по сравнению с пациентами, получавшими DEXA (2,1 и 1% соответственно; $p=0,23$).

При сравнении 2 режимов применения L-аспарагиназы 6-летняя БСВ и ОВ в обеих группах пациентов не различались (БСВ: 10 000 ЕД/м² 78±2%; 5000 ЕД/м² 78±3%; $p=0,53$). Тем не менее значительно больше смертей в ремиссии отмечено в группе, получавшей 10 000 ЕД/м² (6,7 и 3,3% соответственно; $p=0,03$), тогда как частота последующих рецидивов после 5000 ЕД/м² была слегка, но не значительно выше (кумулятивный риск развития рецидива: 10 000 ЕД/м² 10,3±0,2%; 5000 ЕД/м² 12,2±0,3%; $p=0,39$).

При анализе полученных данных также обнаружено, что среди пациентов SRG есть подгруппы пациентов, имеющих статистически значимо худшие результаты терапии. Это больные с инициальным лейкоцитозом >30×10⁹/л (БСВ: <30 000/мкл 77±2%; >30 000/мкл 60±6%; $p<0,001$; безрецидивная выживаемость — БРВ: <30 000/мкл — 82±2%; >30 000/мкл — 68±7%; $p<0,001$) и размерами селезенки >4 см (БСВ: <4 см 79±2%; >4 см 64±4%; $p<0,001$; БРВ: <4 см 84±2%; >4 см 73±4%; $p<0,001$). При проведении мультифакторного анализа (регрессия по Коксу) также 2 этих фактора показали значимость в определении эффективности терапии.

Выводы. Продемонстрировано отсутствие различий в БСВ, ОВ, риске развития рецидивов и частоте индукционных смертей между пациентами, получавшими DEXA и MEDROL в индукции. Также выявлено отсутствие различий в БСВ, ОВ между 2 режимами применения *E. coli* L-аспарагиназы. Поскольку эти результаты являются пока предварительными и, возможно, изменятся при более длительных сроках наблюдения и регистрации поздних рецидивов, мы не можем сделать окончательное заключение, что 5000 ЕД/м² аспарагиназы эквивалентны по эффективности 10 000 ЕД/м² в контексте протокола ALL-MB-2002. Также полученные данные привели к необходимости изменения стратификации на группы риска — пациенты с инициальными размерами селезенки >4 см и инициальным лейкоцитозом >30×10⁹/л в новом исследовании ALL-MB-2008 относятся к промежуточной группе риска.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ГРУППЫ РИСКА ПО ПРОТОКОЛУ ALL-MB-2002

Ю.В. Румянцева, О.Б. Козлова, Н.И. Пономарева, Л.Г. Фечина, О.В. Алейникова, А.В. Шамардина, М.Ю. Горошкова, С.А. Дудкин, К.Л. Кондратчик, Э.Г. Бойченко, Н.В. Мякова, Л.М. Минкина, Д.В. Литвинов, К.С. Асланян, Е.С. Банщикова, Е.В. Башарова, Т.П. Загоскина, Е.Г. Мансурова, Г.П. Павлова, С.Р. Варфоломеева, О.И. Плаксина, В.Н. Тимофеева, Ю.Г. Абугова, О.Ю. Фукс, А.И. Карачунский, А.Г. Румянцев

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

Цель исследования — провести предварительный анализ результатов терапии у пациентов промежуточной группы риска (ImRG), получивших терапию по программе ALL-MB-2002.

Материалы и методы. В анализ включены 376 первичных пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) промежуточной группы риска в возрасте от 1 года до 18 лет, зарегистрированных в период с 01.05.2002 г. до 01.07.2007 г. в клиниках России и Беларуси, входящих в исследование ALL-MB-2002. Из них 140 пациентов получали терапию дексаметазоном (DEXA) в дозе 6 мг/м² в индукции и 131 — метилпреднизолоном (MEDROL) в дозе 60 мг/м². Терапия MEDROL в дозе 120 мг/м²/сут оказалась высокотоксичной, в связи с чем эта ветвь рандомизации была рано остановлена, поэтому подгруппа пациентов, получавших препарат в дозе 120 мг/м², не включена в сравнительный анализ эффективности режимов стероидной терапии из-за малого числа больных. В терапии консолидации 185 пациентов получали терапию низкими дозами метотрексата (НД-МТХ) в до-

зе 30 мг/м² и 168 высокими его дозами (ВД-МТХ) в дозе 2000 мг/м².

Результаты. 6-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) для пациентов ImRG составила 76±2%. Смерть в индукции зарегистрирована у 4% больных, в ремиссии — у 5,3%. Частота рецидивов составила 12,5%.

При сравнении 2 режимов стероидной терапии в индукции не было найдено различий в БСВ и общей выживаемости (ОВ) 2 групп пациентов (БСВ: DEXA 71±6%; MEDROL 70±6%; $p=0,72$; ОВ: DEXA 76±5%; MEDROL 76±6%; $p=0,94$). Однако частота изолированных рецидивов со стороны центральной нервной системы (ЦНС) была существенно выше у пациентов, получающих MEDROL, — 60 мг/м² по сравнению с пациентами, получающими DEXA (6,2 и 1% соответственно; $p=0,046$).

При сравнении 2 режимов применения МТХ не обнаружено статистически значимых различий в показателях выживаемости (БСВ и безрецидивной — БРВ) и частоте развития рецидивов, в том числе и у пациентов с Т-клеточными вариантами ОЛЛ и инициальным лейкоцитозом >100×10⁹/л. Однако показатели ОВ были статистически значимо ниже у пациентов, получавших ВД-МТХ (78±4% по сравнению с 89±3%; $p=0,048$). Частота смертей в ремиссии была выше, но статистически незначимо у пациентов, получавших ВД-МТХ (6,5% против 3,8%; $p=0,33$). Также обращает на себя внимание увеличение числа изолированных ЦНС-рецидивов среди пациентов, получавших НД-МТХ (4,65% НД-МТХ и 1,23% ВД-МТХ; $p=0,06$).

Выводы. Исследование показало отсутствие различий в БСВ, ОВ, риске развития рецидивов и частоте индукционных смертей между пациентами, получавшими DEXA и MEDROL в индукции. Также выявлено отсутствие различий в БСВ и БРВ между 2 режимами применения МТХ. Однако полученные нами результаты являются пока предварительными и, возможно, изменятся при более длительных сроках наблюдения и увеличении числа пациентов, входящих в исследование. К тому же ряд имеющихся проблем организации данного исследования (несоответствие дозы 6-меркаптопурина; возможное избыточное введение лейковорина у пациентов, получающих ВД-МТХ) не позволяет сделать окончательный вывод о том, насколько эффективно и необходимо использование ВД-МТХ в лечении пациентов с ОЛЛ ImRG у различных подгрупп больных.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ПАЦИЕНТОВ СТАНДАРТНОЙ ГРУППЫ РИСКА

Ю.В. Румянцева, О.Б. Козлова, Н.И. Пономарева, Л.Г. Фечина, О.В. Алейникова, А.В. Шамардина, М.Ю. Горошкова, С.А. Дудкин, К.Л. Кондратчик, Э.Г. Бойченко, Н.В. Мякова, Л.М. Минкина, Д.В. Литвинов, К.С. Асланян, Е.С. Банщикова, Е.В. Башарова, Т.П. Загоскина, Е.Г. Мансурова, Г.П. Павлова, С.Р. Варфоломеева, О.И. Плаксина, В.Н. Тимофеева, Ю.Г. Абугова, О.Ю. Фукс, А.И. Карачунский, А.Г. Румянцев

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

Введение. Критериями того, что пациент относится к группе стандартного риска (SRG) на протоколах МВ

(Москва—Берлин) являлись наличие инициального лейкоцитоза <50×10⁹/л, не-Т-клеточные варианты лейкемии, отсутствие поражения центральной нервной системы, возраст более 1 года и достижение ремиссии к 36-му дню терапии. По результатам исследования ALL-MB-2002 критерии SRG были пересмотрены — порог инициального числа лейкоцитов снижен до 30×10⁹/л и введен дополнительный критерий — инициальный размер селезенки <4 см. Влияние на эффективность терапии и прогностическое значение пересмотренных критериев было проанализировано ретроспективно.

Материалы и методы. В анализ включены первичные пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) SRG в возрасте от 1 года до 18 лет, зарегистрированные в период с 01.05.2002 г. до 01.07.2007 г. в клиниках России и Беларуси, вошедших в исследование ALL-MB-2002. Из этих пациентов у 973 человек имеются данные о числе бластных клеток в периферической крови (ПК) на 8-й день терапии, у 29 из которых отмечено >1000 бластных клеток в ПК («плохой» ответ). У 976 пациентов имеются сведения о числе бластных клеток в костном мозге (КМ) на 15-й день терапии, у 179 из них отмечено >10% бластных клеток в КМ («плохой» ответ).

Результаты. Результаты терапии были значительно хуже у пациентов с «плохим» ответом на 8-й день (бессобытийная выживаемость — БСВ: 66±10% против 76±2%, $p=0,03$; безрецидивная выживаемость — БРВ: 68±10% против 83±2%, $p=0,0001$) и на 15-й день (БСВ: 67±5% против 78±3%, $p=0,0006$ и БРВ: 73±5% против 85±3%, $p<0,001$) при сравнении с пациентами SRG, имеющими «хороший» ответ.

После рестратификации с использованием новых критериев для SRG 10 из 565 пациентов SRG имели «плохой» ответ на 8-й день и 89 из 569 — на 15-й день. Не было рецидивов и смертей в ремиссии у пациентов с плохим ответом на 8-й день. Результаты терапии у пациентов с плохим ответом на 15-й день не отличались от таковых у пациентов с хорошим ответом (БСВ 84±5%, ОВ 94±2%, БРВ 88±5%).

Вывод. Критерии для SRG, пересмотренные с учетом массы опухоли, могут стать более важным прогностическим фактором эффективности терапии, чем ранний ответ на терапию у пациентов SRG, получающих лечение по протоколам серии ALL-MB.

КЛЕТочный состав пуповинной крови при наличии ГИПОКСИИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ

С.А. Румянцев^{1,2}, С.А. Плясунова¹, Е.В. Боякова^{1,2}, А.Б. Пашенко^{1,2}, Е.И. Спиридонова¹, М.В. Яковлева¹, О.А. Майорова^{1,2}

¹ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Введение. Оптимизация состава противопоказаний для сбора пуповинной крови в качестве потенциального материала для трансплантации, а также поиск факторов, влияющих на эффективность процедуры концентрации клеток пуповинной крови, продиктовали необходимость анализа клеточного состава пуповинной крови в зависимости от различных состояний при беременности и родах.

Цель исследования — анализ клеточного состава пуповинной крови в зависимости от развития гипоксии при беременности и родах.

Материалы и методы. Материалом служила пуповинная кровь 1013 доношенных новорожденных, родившихся на 37—42-й неделе гестации. Пуповинную кровь забирали путем пункции сосудов пуповины специальной системой, содержащей 35 мл антикоагулянта CPDA, в течение 5—15 мин после родов до отделения плаценты.

Результаты. Показано, что при внутриутробной гипоксии плода повышается абсолютное количество лейкоцитов — $18,84 \pm 0,92 \times 10^9/\text{л}$ против $16,72 \pm 0,26 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,008$) за счет увеличения числа нейтрофилов — $9,4 \pm 0,44 \times 10^9/\text{л}$ против $8,19 \pm 0,16 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,01$), лимфоцитов — $6,05 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$ против $5,35 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,026$) и базофилов — $0,3 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ против $0,19 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$ ($p<0,0001$). Обвитие пуповины приводит к повышению абсолютного числа лейкоцитов — $18,69 \pm 0,61 \times 10^9/\text{л}$ против $16,45 \pm 0,27 \times 10^9/\text{л}$ ($p<0,0001$) за счет увеличения количества нейтрофилов — $9,12 \pm 0,38 \times 10^9/\text{л}$ против $8,09 \pm 0,16 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,004$), лимфоцитов — $6,02 \pm 0,24 \times 10^9/\text{л}$ против $5,26 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ ($p<0,0001$) и моноцитов — $2,61 \pm 0,12 \times 10^9/\text{л}$ против $2,27 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,003$). При этом увеличивается число эритроцитов — $4,55 \pm 0,05 \times 10^{12}/\text{л}$ против $4,35 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$ ($p<0,0001$), повышаются уровни гемоглобина — $162,2 \pm 1,7$ г/л против $156,1 \pm 0,9$ г/л ($p=0,001$) и гематокрита — $32,98 \pm 0,46\%$ против $31,86 \pm 0,24\%$ ($p=0,027$). Количество нормобластов увеличивается при внутриутробной гипоксии — $11,94 \pm 3,11$ на 100 лейкоцитов против $5,42 \pm 0,53$ на 100 лейкоцитов ($p<0,0001$), но не изменяется при острой гипоксии в родах — $6,21 \pm 0,66$ на 100 лейкоцитов против $5,32 \pm 1,25$ на 100 лейкоцитов ($p=0,55$).

Вывод. Установлена зависимость числа и субпопуляций лейкоцитов пуповинной крови от развития гипоксических состояний при беременности и родах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ V617F В ГЕНЕ JAK2 У ПАЦИЕНТОВ С НЕВЕРИФИЦИРОВАННЫМИ ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

И.Ю. Сабурова, Я.С. Оникичук, И.И. Зотова, Г.Н. Сологуб, М.И. Зарайский

ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Введение. Миелопролиферативные заболевания (МПЗ) представляют собой гетерогенную группу нарушений гемопоэза, сопровождающихся множественной гиперплазией клеток костного мозга. Их диагностика сложна и часто основывается на критериях исключения. Одним из наиболее диагностически значимых критериев для МПЗ является наличие мутации V617F в гене JAK2.

Цель исследования — разработка скринингового метода определения мутации V617F гена JAK2, пригодного для первичной диагностики.

Материалы и методы. Геномная ДНК от 58 пациентов с неверифицированным диагнозом «миелопролиферативное заболевание» выделялась по стандартной технологии. Определение наличия мутации V617F в гене JAK2 проводилось с использованием 2 пар праймеров, специфичных для мутантного и дикого типов генов JAK2. В качестве положительного контроля наличия мутации использовалась клеточная линия UKE1 (Б. Фезе, Германия).

Результаты. Установлено, что с помощью представленной методики можно выявить наличие мутации V617F в гене JAK2 с диагностически значимой чувствительностью и специфичностью. Частота мутации в общей группе составила 29,3%. Доля встречаемости мутации V617F в гене JAK2 в группе первичных пациентов с неверифицированным диагнозом МПЗ составила 25,7%.

Выводы. Разработанный нами метод определения мутации V617F в гене JAK2 может применяться для первичной скрининговой диагностики у пациентов с неверифицированными хроническими МПЗ. Модификация данного метода для полуколичественной и количественной оценки может быть использована для диагностики наличия минимального опухолевого клона после проведения терапии.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МРБ НА ПРОТОКОЛЕ ОЛЛ-МБ-2002

Н.Н. Савва, О.В. Красько, Н.В. Мигаль, М.В. Белевцев, В.П. Савицкий, О.В. Алейникова

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

Цель исследования — определить роль минимальной резидуальной болезни (МРБ) в комплексном взаимодействии с другими факторами прогноза в отношении безрецидивной выживаемости (БРВ) у детей с острым лимфобластным лейкозом ОЛЛ, получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МБ-2002.

Материалы и методы: больные ОЛЛ ($n=168$), метод 3-цветной проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) для определения МРБ, однофакторный и многофакторный (Кокс-регрессия) анализ.

Результаты. Выявлено, что индивидуальный ответ на терапию — более мощный прогностический фактор, чем «морфологический» ответ; установлены пациенты с крайне низкой вероятностью развития рецидива (МРБ-негативные на 36-й день); выделена группа больных с высокой вероятностью рецидива (МРБ-позитивные на 36-й день). При проведении однофакторного анализа установлено, что неблагоприятными факторами, достоверно влияющими на ухудшение БРВ при лечении детей на протоколе ОЛЛ-МБ-2002, являются: возраст ≥ 10 лет, лейкоцитоз $\geq 30\ 000/\text{мкл}$ на момент постановки диагноза, плохой ответ на 8-й день после проведения преднизолоновой профазы (>1000 бластов/мкл в периферической крови), М2-и М3-статус по бластным клеткам в костном мозге на 36-й день при оценке ремиссии после окончания индукционного лечения, спленомегалия ≥ 4 см на момент диагностики, положительный уровень МРБ на 36-й день ($\geq 10^{-4}$). В многофакторный анализ (Кокс-регрессия) влияния различных неблагоприятных факторов на вероятность развития рецидива, наряду с МРБ, включены все факторы, достоверно ухудшающие БРВ.

Результаты. Показано, что наличие МРБ на 36-й день является самым сильным независимым прогностическим фактором развития рецидива при ОЛЛ. Метод 3-цветной ПЦФ не является оптимальным для отслеживания МРБ у всех пациентов с ОЛЛ, что диктует необходимость внедрения 4—5-цветной ПЦФ.

Выводы. Несмотря на наличие статистически достоверных благоприятных критериев прогноза, внутри

этих критериев наблюдается неоднородность по МРБ, что означает недостаточный ответ на терапию и влечет за собой риск развития рецидива. Стратификация на терапевтические группы на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 должна проводиться в 2 этапа: на момент диагностики (по принятым критериям разделения на группы риска) и после проведения индукционной терапии в день оценки ремиссии на 36-й день (оценка МРБ). Это позволит снизить число рецидивов заболевания.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Ю.А. Станкевич¹, А.А. Головачева¹, Е.В. Бабенко¹, А.Л. Алянский¹, О.В. Паина¹, Л.С. Зубаровская¹, Е.В. Семенова¹, Д.Г. Полинцев², П.В. Кругляков², Б.В. Афанасьев¹

¹ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова; ²ООО «Транс Технологии», Санкт-Петербург

Введение. Костный мозг человека содержит гемопоэтические (ГСК) и негемопоэтические стволовые клетки, называемые мезенхимальными (МСК). Эти клетки улучшают приживление ГСК после их аллогенной трансплантации (алло-ТГСК) и способствуют репарации тканей мезенхимального происхождения, а также могут модулировать иммунный ответ *in vitro* и *in vivo*. В результате ко-трансплантация аллогенных МСК с аллогенными ГСК гипотетически обладает такими положительными эффектами, как улучшение приживления трансплантата и восстановление баланса внутри иммунной системы. Это обстоятельство может быть использовано как для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), так и для лечения острой стероид-резистентной или хронической РТПХ. В данном исследовании показано, что на терапию МСК отвечают более половины пациентов со стероидрезистентной острой РТПХ.

Материалы и методы. В исследование включены пациенты от 6 до 53 лет с острым лимфобластным ($n=9$) и острым миелобластным ($n=7$) лейкозом, неходжкинскими лимфомами ($n=3$), миелодиспластическим синдромом ($n=2$) и хроническим миелоидным лейкозом ($n=3$), которым в период с октября 2005 г. по май 2008 г. была выполнена алло-ТГСК от родственного ($n=5$) или неродственного ($n=19$) доноров. Для приживления ГСК и профилактики острой РТПХ 8 пациентам проведена ко-трансплантация МСК и ГСК. 16 больных получили изолированное введение МСК для лечения стероидрезистентной РТПХ.

10 пациентам осуществлено 1 введение МСК, 5 — 2 введения и 1 — 3 введения МСК. Процесс выделения и культивирования МСК происходил в компании «Транс Технологии» (лицензия № 99-01-002224 от 14.07.2005).

Результаты. В случае выполнения ко-трансплантации приживление лейкоцитов зарегистрировано на 21-й (от 16 до 38) день, тромбоцитов — на 24-й (от 14 до 45). Острую РТПХ 0—I степени наблюдали в 85,8% ко-трансплантаций, что не требовало дополнительной терапии, острая РТПХ II—IV степени развилась у 14,2% пациентов. Хронической РТПХ не отмечено ни у одного больного. Инфекционные осложнения зарегистрированы у 2 (25%) пациентов. 2,5-летняя безрецидивная выживаемость составила 71%. Результаты применения МСК для терапии РТПХ представлены в таблице.

Выводы

1. Инфузии МСК были безопасны, не сопровождались немедленными реакциями во время введения или отсроченной МСК-ассоциированной токсичностью.
2. Инфузия МСК перед алло-ТГСК не влияла на приживление трансплантата ГСК.
3. Инфузия МСК при ко-трансплантации в режиме кондиционирования может предотвратить развитие тяжелых форм острой или хронической РТПХ.
4. Инфузия МСК для лечения резистентной острой РТПХ может быть эффективной у ряда пациентов.
5. Применение МСК перед алло-ТГСК не увеличивало частоту рецидивов основного заболевания.
6. Использование МСК более эффективно у пациентов, получивших миелоаблативный режим кондиционирования и профилактику острой РТПХ с применением антилимфоцитарного глобулина.

Необходимо проведение дальнейших рандомизированных клинических исследований для оценки терапевтического эффекта МСК у пациентов после алло-ТГСК и определения факторов, оказывающих влияние на эффективность МСК терапии.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ БИОТЕРАПИИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Е.А. Стрельцова, И.В. Решетов, Н.А. Дайхес, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов
ГУ МНИОИ им. П.А. Герцена

Введение. Для разработок новых методов терапии злокачественных опухолей требуются модели, отвечающие следующим характеристикам: 1) моделирование эксперимента, применимого у человека; 2) использование человеческих образцов опухолей; 3) отсутствие у лабораторных животных реакций отторжения чужеродной ткани.

Материалы и методы. Для создания экспериментальной модели требуется животное, позволяющее по своим иммунологическим свойствам выполнить подсадку чужеродной ткани. Бестимусным мышам в искусственно созданный дефект костей черепа имплантируется образец опухоли человека с экспрессией рецепторов эпидермального фактора роста. При отсутствии реакции отторжения исследователь получает

Вовлеченные органы	Число пациентов	Эффект МСК	Общий ответ, %
Острая РТПХ			
Кожа	4	PR, CR, CR, нет эффекта	70
Кожа+ЖКТ*	2	PR, PR	
Кожа+ЖКТ+печень	4	PR, PR, нет эффекта	
Хроническая РТПХ			
Кожа	2	CR, нет эффекта	67
Кожа + ЖКТ	2	PR, нет эффекта	
Кожа + ЖКТ + печень	2	CR, PR	

*ЖКТ — желудочно-кишечный тракт.

наглядный образец интересующего его гистологического типа опухоли.

Методика эксперимента заключается в следующем: под оптическим увеличением через срединный продольный разрез кожи в лобно-теменной области формируется надкостничный лоскут методом гидропрепаровки, после чего создается дефект в теменной кости диаметром около 0,3—0,5 мм². Имплантированная на дефект культура опухоли укрывается заранее сформированным надкостничным лоскутом; далее производится послойное ушивание раны. Животные подлежат ежедневному послеоперационному мониторингу.

Результаты. В МНИОИ им. П.А. Герцена совместно с ГУ НЦ БМТ РАМН по разработанной нами методике были прооперированы 40 животных. Из них 5 погибли на этапе вводного наркоза и в раннем послеоперационном периоде. У остальных животных в послеоперационном периоде осложнений не выявлено. Имплантируемая опухолевая ткань прижилась. На 7—21-е сутки животные выводились из эксперимента, морфологический (иммуногистохимия, иммуноцитохимия) анализ имплантируемой опухоли продемонстрировал сохранение ее биологических свойств.

Выводы. Созданная экспериментальная модель опухоли головы и шеи полностью отвечает требованиям для проведения опытов, посвященных проблемам биологии злокачественных опухолей. Сохранение биологических свойств опухоли является основным критерием, определяющим дальнейшую возможность работы исследователя.

ОБНАРУЖЕНИЕ МУТАЦИЙ В 5—8-м ЭКЗОНЕ ГЕНА p53 ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ

Е.Г. Суворова, В.М. Фениксов

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

Цель исследования — оценка мутаций в 5—8-м экзонах гена p53 в комплексной диагностике глиом для дифференцированного подбора средств химиотерапии.

Материалы и методы. Обследована группа пациентов (n=8) на наличие мутаций в 5—8-м экзоне гена p53. Биологические образцы (клетки крови, слюна и опухолевый материал) обрабатывали протеиназой К. Далее проводили выделение ДНК методами фенол-хлороформной депротеинизации и этанольной преципитации. Присутствие мутаций в 5—8-м экзоне выявляли посредством SSCP-анализа продуктов амплификации соответствующих экзонов, с последующим секвенированием. В качестве положительного контроля с охарактеризованными мутациями в гене p53 использовали ДНК-культуры злокачественных клеток человека СЕМ, KG-1, Namalva, A-431, а в качестве отрицательного — ДНК группы доноров.

Результаты. У 1 из 8 пациентов в 7-м экзоне гена p53 в 244-м кодоне обнаружена замена гуанина на аденин. Эта замена в данной позиции является значащей, т.е. в отсутствие сдвига рамки считывания она приводит к аминокислотной замене (нормальный вариант 244-го кодона — GGC кодирует аминокислоту глицин, тогда как вариант с заменой — AGC кодирует аминокислоту серин). У другого больного в 5-м экзоне гена p53 в 175-м кодоне обнаружена значащая замена — в белковом продукте гена p53 вместо аргинина оказы-

вается гистидин. Еще одна замена, обнаруженная у 3-го ребенка в 6-м экзоне исследуемого гена в третьей позиции 213-го кодона, не меняет аминокислотную последовательность.

Вывод. Показана высокая вероятность повреждения гена p53 при злокачественных глиомах головного мозга, что должно учитываться при терапии.

ХАРАКТЕРИСТИКА И ДОЛГОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КУР

Н.М. Сураева¹, Е.А. Воротеяк², А.В. Самойлов³, А.В. Васильев², А.Ю. Барышников¹

¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; ²Институт биологии развития РАН, Москва; ³НИИ кролиководства и пушного звероводства, Московская область

Введение. Онкология остро нуждается в гемопоэтических факторах роста, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), эритропоэтин и тому подобные, так как доказана эффективность использования человеческого Г-КСФ против различных форм цитопении, вызванной химио- и радиотерапией, при лечении онкологических заболеваний. Разработка технологии культивирования и трансплантации генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) может открыть широкие возможности по использованию куриных эмбрионов для продукции таких белков.

Результаты. С этой целью была отработана методика получения и культивирования ЭСК из бластодисков индивидуальных эмбрионов птицы. Обнаружены значительные индивидуальные различия в ростовых характеристиках бластодермальных клеток разных бластодисков. ЭСК представляли собой маленькие клетки с большим ядром и хорошо различимыми ядрышками, росли колониями в виде монослоя с четко различимыми границами между клетками. ЭСК экспрессировали маркеры плюрипотентности — положительная окраска на щелочную фосфатазу и SSEA-1. После 2 пассажей клетки начинали дифференцироваться и приобретать вид фибробластов с очень активным ростом или погибали. Было показано, что покрытие дна лунок желатином, наличие STO фидера и добавление или продуцирование самими стволовыми клетками определенных факторов роста являлись необходимыми компонентами культивирования ЭСК.

Выводы. Были получены культуры ЭСК, охарактеризованы некоторые морфологические и гистохимические особенности этих клеток и выявлены лимитирующие факторы, влияющие на процесс пролиферации.

СОВРЕМЕННЫЙ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ОНКОЛОГИИ

А.С. Танас¹, В.В. Стрельников^{1,2}, В.В. Шкарупо^{1,2}, Е.Б. Кузнецова^{1,2}, Д.В. Залетаев^{1,2}

¹Медико-генетический научный центр РАМН, Москва; ²НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова

Введение. Ни один из известных методов скрининга дифференциального метилирования геномов при всем их разнообразии не удовлетворяет минимальным необходимым требованиям, предъявляемым к универсальному методу: непредвзятая природа скрининга, высокая воспроизводимость и возможность стандартизации, простота выполнения и высокая скорость получе-

ния результатов экспериментов, экономическая эффективность, возможность быстрой и технически несложной идентификации геномной принадлежности дифференциально метилированных участков ДНК и тестирования большого числа (десятков) образцов в одном эксперименте.

Цель исследования — разработка синтетического непредвзятого метода скрининга дифференциального метилирования геномов опухолевых клеток.

Материалы и методы. За основу принят метод, в наибольшей степени удовлетворяющий перечисленным во введении требованиям — метод амплификации интерметилированных сайтов (АИМС). Прецизионное разделение продуктов АИМС проведено капиллярным электрофорезом, обеспечивающим разрешение длин фрагментов ДНК по длине с точностью до 1 нуклеотида.

Результаты. Разработаны протоколы проведения АИМС с флуоресцентно мечеными праймерами и анализа продуктов с помощью капиллярного электрофореза. Подготовлен пакет программного обеспечения, включающий в себя программы дизайна экспериментов, анализа хроматограмм и определения геномной принадлежности анализируемых фрагментов ДНК *in silico*. Дана подробная характеристика качественного и количественного состава репрезентаций сравнения при использовании различных вариантов метода АИМС. Методом анализа *in silico* охарактеризована иерархия репрезентаций генома человека, что позволило точно определять информативность любого варианта эксперимента и впервые унифицировать расчет индексов метилирования/деметилирования геномов опухолей. Разработанный метод может применяться для скрининга дифференциального метилирования при любой форме генетической патологии с эпигенетическим компонентом.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 08-04-01685-а) и Фондом поддержки отечественной медицины.

ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В БИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

М.А. Тимаков¹, И.Г. Козлов^{1,2}, А.С. Белохвостов¹, А.М. Тимаков^{1,2}, А.Г. Румянцев^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии; ²ГОУ ВПО РГМУ, Москва

Введение. Современная терапия экспрессирующих рецептор-эпидермального фактора роста (EGFR) опухолей различной локализации и тканевой принадлежности подразумевает использование 2 классов препаратов — моноклональных антител (МАТ) и низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), направленных соответственно на блокаду рецепторов или на ингибирование сигналов, поступающих с них внутрь клетки. Однако оба типа препаратов имеют ограничения по эффективности. Как и любая белковая структура, EGFR может изменять свое строение по причине мутаций, возникающих наиболее часто при различных опухолевых заболеваниях. Очевидно, что нарушения структурной организации рецептора способны оказывать влияние на его взаимодействие с анти-EGFR

МАТ, что приводит к неэффективности терапии и ухудшению прогноза лечения. В литературе описаны мутации EGFR, характерные для глиом, колоректального рака, рака головы и шеи, легкого, молочной железы и яичников. При немелкоклеточном раке легкого найдена соматическая точечная мутация в тирозинкиназном участке рецептора, вызывающая клинически доказанную резистентность опухоли к терапии ИТК (гефитиниб и эрлотиниб). Кроме того, выявлен ряд мутаций отдельных компонентов EGFR-связанных внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к неэффективности терапии анти-EGFR МАТ (мутация гена *k-ras* при раке толстой кишки). Таким образом, в клинической практике становится актуальной проблема повышения эффективности анти-EGFR терапии путем выявления предиктивных факторов с последующим отбором пациентов на их основе.

Материалы и методы. В нашей лаборатории проводится исследование фармакодинамического поведения нового химерного анти-EGFR МАТ (нимотузумаб) при различных мутациях данного рецептора, найденных в образцах глиом головного мозга. Мутация EGFRvIII во внеклеточной части рецептора встречается при глиобластомах в 27—43% случаев. Данная мутация характеризуется потерей лиганд-связывающего участка и постоянной активацией тирозинкиназного домена.

Вывод. Положительные результаты исследования могут послужить основой для дальнейшего создания тест-систем, предназначенных для предварительного скрининга мутаций EGFR, что приведет к повышению эффективности соответствующей биотерапии и улучшению прогноза лечения заболевания.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

В.Н. Тимофеева, Ю.В. Румянцева, Е.Г. Мансурова, К.Л. Кондратчик, Л.Г. Фечина, Н.Б. Юдина, Г.М. Сычева, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова, Е.В. Инюшкина, В.А. Ясковец, С.А. Дудкин, М.Ю. Горошкова, Г.В. Быкова, С.Р. Варфоломеева, А.И. Карачунский

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

Цель исследования — оценить использование и эффективность микробиологического мониторинга в терапии инфекций у пациентов с онкогематологическими заболеваниями в настоящее время в клиниках России.

Материалы и методы. Проспективная регистрация лечащим врачом инфекционных эпизодов (ИЭ) с помощью специально разработанной анкеты проводилась в 10 клиниках России в период с ноября 2003 г. по август 2004 г. Проанализированы данные о 426 инфекционных эпизодах у 226 пациентов (121 мальчик и 105 девочек) в возрасте от 3 мес до 19 лет, медиана возраста — 7 лет.

Результаты. Из 426 эпизодов микробиологические исследования проводились в 260 (61%), из них положительные результаты посевов зарегистрированы в 171 (65,8%) эпизоде: 1 микроорганизм (м/о) идентифицирован в 75%, 2—3 м/о в 25% случаев. Таким образом, м/о был идентифицирован только в 40% случаев. В среднем

произведено $2,41 \pm 0,12$ посева в течение 1-го ИЭ. Почти в половине (47%) случаев осуществлялся только 1 посев за эпизод, хотя при увеличении числа посевов в одном ИЭ частота идентификации м/о закономерно увеличивалась (1 исследование — 51,6% ИЭ с положительным высевом; 2—3 исследования — 72,9%; 4 исследования и более — 86,8%, $p < 0,001$). Число произведенных посевов (61,2 и 60% ИЭ) и частота идентификации возбудителя (66,7 и 65,6% ИЭ соответственно) не зависели от наличия или отсутствия лихорадки. При длительном сохранении лихорадки частота проведения посевов практически не увеличивалась, хотя частота идентификации м/о в таком случае была выше (при длительности лихорадки <5 дней — 60% ИЭ с проведением посевов; 5—10 дней — 64,4% ИЭ; >10 дней — 69% ИЭ; $p = 0,39$; при длительности лихорадки <5 дней — 61,1% ИЭ с положительным высевом; 5—10 дней — 77,6% ИЭ; >10 дней — 85% ИЭ; $p = 0,05$). При наличии очага инфекции частота проведения посевов (66 и 38,1% ИЭ; $p < 0,001$) и частота идентификации возбудителя (69,3 и 37,9% ИЭ, $p = 0,002$) резко возрастают. Длительность сохранения очага не влияет на частоту идентификации возбудителя, однако число посевов существенно больше при инфекциях длительностью более 10 дней (65,7 и 85,9% ИЭ соответственно; $p = 0,006$). При наличии у пациента агранулоцитоза посевы также проводились чаще (лейкоциты <500/мкл — 66% ИЭ; <500/мкл — 54%; $p = 0,05$), на идентификацию возбудителя наличие или отсутствие нейтропении не влияло (66,2 и 65,2% ИЭ соответственно). При амбулаторной терапии основного заболевания непосредственно перед развитием ИЭ посевы использовались реже (53,6% по сравнению с 68,1% при нахождении пациента в стационаре; $p = 0,14$), хотя возможность идентификации возбудителя возросла (78,1 и 55% соответственно; $p < 0,05$). Обращает на себя внимание то, что даже при неэффективности антибактериальной терапии частота производимых посевов практически не увеличивается (число ИЭ с проведением посевов повышается с 58% в группе пациентов, у которых была эффективна 1-я комбинация антибиотиков, до 65% в группе, потребовавшей модификации антибактериальной терапии; $p = 0,25$).

Выводы. Микробиологическая идентификация возбудителя при ИЭ в настоящее время в России используется редко. При отсутствии видимого очага инфекции и получении терапии основного заболевания амбулаторно частота проведения микробиологических исследований еще меньше. Не увеличивается она даже при неэффективности антибактериальной терапии и длительном сохранении очага инфекции. Показано, что отсутствие стандартных сроков и кратности проведения микробиологической диагностики негативно влияет на объем и качество проведения противомикробной терапии.

СПЕКТР ИСПОЛЪЗУЕМОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ И ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ ХИМИОТЕРАПИЮ

В.Н. Тимофеева, Ю.В. Румянцева, Е.Г. Мансурова, К.Л. Кондратчик, Л.Г. Фечина, Н.Б. Юдина, Г.М. Сычева, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова, Е.В. Инюшкина, В.А. Ясковец, С.А. Дудкин, М.Ю. Горошкова, Г.В. Быкова, С.Р. Варфоломеева, А.И. Карачунский

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

Цель исследования — оценить эффективность применения антибактериальной терапии у пациентов с инфекционными осложнениями на фоне проводимой химиотерапии в настоящее время в клиниках России.

Материалы и методы. Проспективная регистрация лечащим врачом инфекционных эпизодов (ИЭ) с помощью специально разработанной анкеты проводилась в 10 клиниках России в период с ноября 2003 г. по август 2004 г. Проанализированы данные о 426 инфекционных эпизодах у 226 пациентов (121 мальчик и 105 девочек) в возрасте от 3 мес до 19 лет, медиана возраста — 7 лет.

Результаты. Наиболее часто в стартовой комбинации использовались цефалоспорины III—IV поколения (51,4% ИЭ). Цефалоспорины I—II поколения применялись в 5,6% ИЭ, пиперациллин — в 14,6%. Частота использования противогрибковых препаратов уже в стартовой комбинации составила 14,6%. Обращает на себя внимание то, что в 40% ИЭ первая комбинация состояла только из одного антибиотика; в 11% случаев антибиотика применяли только перорально. Стартовая комбинация была эффективна в 41% случаев, в 59% потребовалась модификация терапии. Наиболее низкая эффективность стартовой комбинации отмечалась у пациентов с лимфомами (26,5%) и у больных, получающих индукционную терапию (29,8%), при этом достаточно часто она состояла только из одного препарата (40%). У пациентов, получающих стероидную терапию и терапию, сопровождающуюся III—IV степенью гематологической токсичности, эффективность стартовой комбинации была невысокой (33,6 и 28,8% соответственно). Частота использования монотерапии в стартовой комбинации антибиотиков у таких больных — около 40%. Наиболее часто первоначальная комбинация была эффективна у пациентов, находящихся на амбулаторном лечении (57,9%), при этом эффективность антибиотикотерапии в режиме монотерапии выше — 58%, тогда как у пациентов, находящихся в стационаре, она составила всего 32%. Отмечено, что при длительном инфекционном анамнезе (>3 мес) эффективность стартовой комбинации антибиотиков также значительно ниже (22,6%), так же как и у пациентов с нейтропенией (лейкоциты <500/мкл — 28,5%; >500/мкл — 56,1%; $p < 0,001$). В 35% ИЭ даже при наличии агранулоцитоза первая комбинация состояла из одного препарата, и ее эффективность была равна 12%. Частота использования монотерапии в первой комбинации не зависела от наличия или отсутствия лихорадки и очага инфекции, однако эффективность ее существенно уменьшалась в случае очага (63,9% без видимого очага инфекции; 35% при наличии очага; $p < 0,05$), особенно при наличии энтероколита (3%).

Выводы. В России при ведении инфекций у онкологических больных пока не существует общепринятых стандартов выбора антибактериальных препаратов и длительности их применения. Даже при наличии определенных факторов риска (нейтропения, интенсивная химиотерапия, использование стероидных препаратов, длительный инфекционный анамнез, энтероколит) в стартовой комбинации часто используется антибактериальная терапия в режиме монотерапии (иногда перорально), эффективность которой очень низкая.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ТЯЖЕЛЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

В.Н. Тимофеева, Ю.В. Румянцева, Е.Г. Мансурова, К.Л. Кондратчик, Л.Г. Фечина, Н.Б. Юдина, Г.М. Сычева, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова, Т.В. Шаманская, В.А. Ясковец, С.А. Дудкин, М.Ю. Горошкова, Г.В. Быкова, С.Р. Варфоломеева, А.И. Карачунский

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

Введение. Известно, что быстрое развитие инфекции обусловлено нарушениями, вызванными как самим заболеванием, так и иммуносупрессивным действием противоопухолевой терапии. Инфекции, возникающие при применении миелотоксической химиотерапии, носят более тяжелый характер, так как при этом, кроме количественного снижения уровня нейтрофилов, у больных имеются нарушения естественных барьеров неспецифической резистентности, прежде всего слизистых оболочек.

Цель исследования — выявить факторы риска тяжести инфекционных осложнений у пациентов, получающих химиотерапию, при отсутствии нейтропении.

Материалы и методы. Проспективная регистрация лечащим врачом инфекционных эпизодов (ИЭ) с помощью специально разработанной анкеты проводилась в 10 клиниках России в период с ноября 2003 г. по август 2004 г. Проанализированы данные о 426 инфекционных эпизодах у 226 пациентов (121 мальчик и 105 девочек) в возрасте от 3 мес до 19 лет, медиана возраста — 7 лет.

Результаты. У больных с нейтропенией отмечалось длительное течение ИЭ. Эпизоды длительностью >10 дней — 50%, >20 дней — 16%. ИЭ с наличием или отсутствием лихорадки и видимого очага инфекции одинаково часто регистрировались у пациентов с нейтропенией или без нее (лейкоциты >500/мкл — 82,7% ИЭ с наличием лихорадки и 83,7% с наличием видимого очага инфекции; <500/мкл — 87,1 и 82,3% соответственно). Длительность лихорадки также не различалась в этих группах (лейкоциты <500/мкл 4,46±0,36 дня; >500/мкл 4,03±1,07 дня; $p=0,69$). Тем не менее число выявляемых очагов и длительность их сохранения выше у больных с нейтропенией (лейкоциты <500/мкл 1,14±0,05 очага на ИЭ; >500/мкл 0,96±0,04; $p=0,006$; лейкоциты <500/мкл 7,96±0,63 дня; >500/мкл 5,76±0,28; $p=0,006$). У пациентов с агранулоцитозом чаще регистрировалось поражение кишечника. Частота (24,6 и 20,8% ИЭ) и длительность применения (7,29±0,61 и 6,33±0,49 дня соответственно) противовирусных препаратов не различалась у пациентов с нейтропенией и без нее. Частота (65,8 и 45,5%; $p<0,001$) и длительность (9,64±0,57 и 7,6±0,53 дня соответственно; $p=0,016$) применения противогрибковых препаратов были выше у пациентов с нейтропенией.

Однако при наличии определенных факторов длительность и тяжесть ИЭ у пациентов в отсутствие нейтропении увеличиваются. Так, при более продолжительном стационарном ведении больного увеличивается длительность инфекций и при отсутствии нейтропении, которая не отличается от таковой у пациентов в состоянии агранулоцитоза (лейкоциты <500/мкл 12,33±1,38 дня; >500/мкл 7,66±0,49 дня; $p=0,05$ — при

амбулаторной терапии; <500/мкл 12,55±1,01 дня; >500/мкл 11,22±0,94; $p=0,31$ — при нахождении в стационаре более 1 мес). У больных с высокой степенью миелотоксичности химиотерапии и у пациентов с лимфомами наблюдается увеличение длительности ИЭ при отсутствии различий между больными в зависимости от наличия нейтропении (лейкоциты <500/мкл 12,03±0,87 дня; >500/мкл — 11,12±2,02 дня; $p=0,63$ — у пациентов с лимфомами; <500/мкл — 13,62±1,11 дня; >500/мкл — 12,3±0,94; $p=0,28$ — при высокой миелотоксичности). У пациентов, получавших в анамнезе терапию стероидами, также отмечено увеличение длительности ИЭ при отсутствии нейтропении (лейкоциты <500/мкл — 10,86±0,74 дня; >500/мкл 9,77±0,5 дня; $p=0,45$), а наличие и длительность предшествующего инфекционного анамнеза не влияют на увеличение тяжести ИЭ у пациентов с отсутствием агранулоцитоза.

Выводы. Нейтропения не влияет на длительность лихорадки, но у пациентов с агранулоцитозом выявляемых очагов инфекции больше и они требуют более длительной терапии. Длительность нахождения больного в стационаре, увеличение миелотоксичности предшествующей химиотерапии и использование стероидных препаратов значительно увеличивают риск развития тяжелых инфекций у пациентов без нейтропении.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В РОССИИ

В.Н. Тимофеева, Ю.В. Румянцева, Е.Г. Мансурова, К.Л. Кондратчик, Л.Г. Фечина, Н.Б. Юдина, Г.М. Сычева, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова, Т.В. Шаманская, В.А. Ясковец, С.А. Дудкин, М.Ю. Горошкова, Г.В. Быкова, С.Р. Варфоломеева, А.И. Карачунский

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

Цель исследования — охарактеризовать инфекционные осложнения у пациентов с онкогематологическими заболеваниями при современной терапии в условиях России.

Материалы и методы. Проспективная регистрация лечащим врачом инфекционных эпизодов (ИЭ) с помощью специально разработанной анкеты проводилась в 10 клиниках России в период с ноября 2003 г. по август 2004 г. Проанализированы данные о 426 инфекционных эпизодах у 226 пациентов (121 мальчик и 105 девочек) в возрасте от 3 мес до 19 лет, медиана возраста — 7 лет.

Результаты. Основную массу всех ИЭ составили эпизоды лихорадки с наличием видимого очага инфекции. В 15% случаев эпизоды наблюдались с выявлением очага инфекции без лихорадки и в 18% лихорадка без видимого очага инфекции. Средняя длительность ИЭ составила 10,8±0,42 (медиана — 8,5; 1—72) дня. Более половины всех ИЭ — это эпизоды длительностью менее 10 дней, 30% от 10 до 20 дней. При более высокой токсичности терапии отмечалось увеличение длительности ИЭ (12,7±0,85 дня). В этой группе пациентов более половины эпизодов (52%) — это эпизоды длительностью более 10 дней.

У больных с нейтропенией также зарегистрировало увеличение длительности ИЭ (12,59±0,68 дня). Эпизоды

длительностью более 10 дней составили в этой группе 50%, более 20 дней — 16%. У пациентов с солидными опухолями длительность ИЭ была меньше по сравнению с большими лейкоземи (8,38±0,57 и 11,39±0,56 дня соответственно; $p=0,015$). Более 70% ИЭ в этой группе составили эпизоды длительностью менее 10 дней. У пациентов, получающих стероидную терапию на момент развития ИЭ, отмечалось увеличение его длительности (12,7±0,96 дня).

Из всех ИЭ эпизоды без лихорадки составили 15,3%. Еще 13,2% эпизодов — ИЭ с субфебрильной лихорадкой. Таким образом, доля эпизодов инфекций без существенного повышения температуры может достигать 30%. Чаще эпизоды без лихорадки встречались у пациентов, получающих терапию стероидами (16,2 и 10% ИЭ соответственно; $p=0,09$). При этом доля инфекций, протекающих с субфебрилитетом, у них также была выше (19 и 12% ИЭ соответственно). При увеличении длительности нахождения пациента в стационаре число эпизодов без лихорадки также возрастало (12,1% ИЭ — при амбулаторном лечении; 17,8% — при нахождении в стационаре более 1 мес; $p<0,05$).

В 82% ИЭ имело место наличие видимого очага инфекции. Обращает на себя внимание то, что у пациентов с солидными опухолями очаги инфекции диагностировались реже (76,5% ИЭ по сравнению с 86,3% ИЭ у пациентов с лейкозией/лимфомой; $p=0,017$), чаще встречались эпизоды лихорадки без видимого очага. Использование терапии стероидами не влияет на частоту выявления очагов инфекции, однако у пациентов, получающих стероиды, очаги в носоглотке регистрируются чаще (61,7 и 42,7% соответственно; $p=0,018$). При высокой токсичности химиотерапии обычно возникают энтероколиты и эзофагиты, а поражение дыхательных путей отмечается преимущественно в группе умеренной миелотоксичности проводимой химиотерапии. У пациентов с агранулоцитозом также значительно чаще регистрируется поражение кишечника (28,9 и 6,6% ИЭ соответственно; $p<0,001$). При нахождении пациента в стационаре частота развития очагов инфекции возрастают, среди них преобладают также поражение кишечника и носоглотки.

Выводы. Длительность ИЭ достоверно больше у больных лейкоземи, лимфомами, получающих стероиды, а также в случаях большей миелотоксичности химиотерапии и развития агранулоцитоза. До 30% больных могут переносить инфекцию без лихорадки. При этом частота инфекций без лихорадки увеличена у больных с лейкозией и лимфомой, длительно находящихся в стационаре, а также получавших терапию стероидами. У детей, больных лейкозией или лимфомой, чаще наблюдаются мукозит и пневмония по сравнению с пациентами, страдающими от солидных опухолей. В то же время на фоне миелотоксичной терапии и агранулоцитоза резко возрастает частота развития энтероколитов и эзофагитов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ HLA-СИСТЕМЫ ЖИТЕЛЕЙ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

А.Н. Тороповский, О.В. Тюмина, Л.М. Трусова, С.Е. Волчков

ГУЗ СО Клинический центр клеточных технологий, Самара

Введение. В Самаре с 2003 г. работает государственный банк пуповинной крови. В настоящее время обработано и заложено на криохранилище более 3000 образцов. Количество образцов, типированных по 3 локусам системы гистосовместимости — HLA (A, B, DRB1), составляет более 2500. Результаты по генотипированию пуповинной крови представляют уникальную базу данных для изучения генотипа популяции Самарской области.

Материалы и методы. Генотипирование по системе HLA проводилось на среднем уровне разрешения методом SSO (sequence specific primers) с использованием системы Luminex (США) и реагентов фирмы «One Lambda» (США), идеально подходящих для одновременного типирования большого числа образцов.

Мы провели генотипирование 2614 образцов пуповинной крови по А-локусу, 2494 — по В-локусу и 2664 — по DRB1-локусу.

Результаты. Число аллельных вариантов А-локуса составило 17. Наиболее часто встречающиеся гены А-локуса: А*02 (28,17%), А*03 (15,43%) и А*01 (10,88%). Самыми редкими оказались гены А*34 (0,02%), А*69 (0,13%) и А*66 (0,55%). У жителей Самарской области найдено 29 аллельных вариантов В-локуса. Выявлены наиболее часто встречающиеся гены этого локуса: В*35 11,90%, В*07 — 11,87% и В*44 — 9,66%. Реже всего наблюдались следующие гены: В*54 — 0,08%, В*53 и В*73 — каждый по 0,12%. В отличие от локуса А число аллелей, частота которых превышает 10%, составило всего 2 (В*07 и В*35). Сумма частот их встречаемости равна 23,77%. Локус DRB1 демонстрирует наименьшую полиморфность. Количество аллельных вариантов составило 13. При типировании по DRB1-локусу ни разу не встретилось ни одного неоднозначного результата. В данном локусе самыми распространенными оказались гены DRB1*07 (13,89%), DRB1*01 (13,81%) и DRB1*13 (13,38%). Меньше всего были представлены следующие гены: DRB1*61 (1,14%), DRB1*83 (1,55%) и DRB1*12 — 24 (2,25%).

Выводы. Впервые полученная популяционная характеристика HLA-генотипа жителей Самарской области свидетельствует о распространенности генетических маркеров предрасположенности к различным заболеваниям. Вычисление типичных и редких HLA-аллелей имеет большое значение для планирования и развития регистра доноров стволовых клеток.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК ОБРАБОТКИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

О.В. Тюмина, П.В. Борискин, С.Е. Волчков, А.Н. Тороповский, Л.М. Трусова

ГУЗ СО Клинический центр клеточных технологий, Самара

Введение. Для развития принципиально нового направления клинической онкологии — использования трансплантаций плацентарной/пуповинной крови (ПК) при лечении онкологических больных в 2003 г. образовано ГУЗ Самарской области Клинический центр клеточных технологий.

В работе учреждения используются общепринятые методики обработки ПК: двойное центрифугирование с гидроксизилкрахмалом и автоматизированный метод с применением клеточного сепаратора Sepax («Biosafe», Швейцария).

Материалы и методы. За последние 2 года работы было собрано 3192 образца ПК. Из них 476 утилизировано на первичных этапах скрининга до обработки, 1577 обработано методом двойного центрифугирования, и 877 — на клеточном сепараторе. Эффективность оценена по результатам обработки 2454 образцов по следующим параметрам: процент выхода лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов, гематокрит и жизнеспособность лейкоцитов после обработки.

Результаты. При использовании метода двойного центрифугирования медиана выхода лейкоцитов составила 87,9%, лимфоцитов — 84,4% и моноцитов — 99,9%. Использование автоматизированной методики позволило повысить эффективность обработки. Доля выхода лейкоцитов составила 94,6%, лимфоцитов — 96,3% и моноцитов — 99,9%. При применении метода двойного центрифугирования медиана гематокрита равна 21,5%, при автоматической методике — 34,8%. Жизнеспособность клеток — 96,4 и 96,6% соответственно.

Вывод. Применение современных ручных и автоматизированных методик гарантирует низкие потери клеток, хорошую деплецию эритроцитов и высокую жизнеспособность лейкоцитов.

ВНЕДРЕНИЕ СИСТЕМЫ КАЧЕСТВА В РАБОТУ ПУБЛИЧНОГО БАНКА ПУПОВИННОЙ КРОВИ

О.В. Тюмина, С.Е. Волчков, Л.М. Трусова, А.Н. Тороповский, П.В. Борискин

ГУЗ СО Клинический центр клеточных технологий, Самара

Введение. В Самаре с 2003 г. начал свою работу по заготовке и криохранению образцов пуповинной крови (ПК) государственный банк ПК. В настоящее время в РФ работает 2 крупных государственных публичных банка ПК (в Москве и Самаре). Задача публичных банков — организовать работу по заготовке, обработке и криохранению гемопоэтических клеток ПК в соответствии с международными стандартами для интеграции в международную сеть банков. Для реализации данной цели актуальным является внедрение системы качества в работу банка ПК.

Цель исследования — оценить эффективность внедрения системы качества в работу банка ПК.

Материалы и методы. 4000 образцов ПК были подвергнуты обработке и заложены на долгосрочное криохранение. Обработка проводилась 2 методами: двойного центрифугирования с HES и автоматическим методом на клеточном сепараторе Sерах. Проведено исследование эффективности внедрения системы качества в работу банка ПК.

Результаты. Ежегодно 18,5% образцов ПК утилизируются из-за инфекционной опасности, из них по причине обнаружения: HBsAg 0,5% образцов; Anti-HCV 0,9%; RW — 1%; Anti-HBcog — 10%, ВИЧ 0,2%, IgM к вирусу простого герпеса — 0,6%, IgM CMV — 0,2%, вируса Т-клеточного лейкоза 0,13%, микробной контаминации — 5%. Наличие антител класса IgG к CMV выявлено в 90% образцов ПК, к *Toxoplasma gondii* в 48%, к вирусу герпеса — в 94%, что свидетельствует о высокой распространенности данных инфекций в популяции и не является показанием к утилизации образцов ПК.

Вывод. Внедрение системы качества в работу банка ПК необходимо для обеспечения безопасности клеточного материала для трансплантации.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИЖИВЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

А.Ю. Устюгов, Л.В. Гук, З.М. Дышлева, Е.Ю. Осипова, Е.В. Скоробогатова, С.А. Румянцев

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

Введение. Возрастающий интерес к изучению общих свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их терапевтических возможностей, приводит к появлению все большего числа вопросов. Одним из них является вопрос о возможности приживления МСК. В нашем исследовании была сделана попытка проанализировать возможность приживления МСК у пациентов с различными гематологическими заболеваниями, подвергшихся аллогенной трансплантации гемопоэтических предшественников.

Цель исследования — изучение химеризма МСК у пациентов с острым лимфобластным (ОЛЛ) и острым миелобластным (ОМЛ) лейкозом, подвергшихся аллогенной трансплантации клеток костного мозга или периферических стволовых клеток, отдельно либо с ко-трансплантацией донорских МСК.

Материалы и методы. Исследованы образцы костного мозга пациентов с установленными диагнозами ОЛЛ и ОМЛ ($n=13$ и 5 соответственно), подвергшихся аллогенной трансплантации клеток костного мозга ($n=9$) и периферических стволовых клеток крови ($n=9$). Часть пациентов совместно с аллогенной трансплантацией костного мозга получала ко-трансплантацию донорских МСК. Для анализа химеризма МСК в различные временные точки после проведения аллогенной трансплантации (сроки наблюдения от +26-го до +302-го дня) культивировали МСК костного мозга пациентов, используя стандартную методику клоногенного культивирования стромальных фибробластов костного мозга. Культуры культивировались до 2—3-го пассажа для исключения контаминации гемопоэтическими клетками. Всего было проанализировано более 50 образцов. Определение химеризма выделенных МСК проводилось методом типирования STR-локусов.

Результаты. В нашем исследовании в 89% ($n=16$) случаев трансплантации гемопоэтических предшественников без ко-трансплантации МСК отмечался 98% реципиентский химеризм независимо от основного диагноза, режима кондиционирования, источника используемого трансплантата, его объема и качественного состава (содержание нуклеарных и CD34+-клеток). Также была проанализирована возможность выявления химеризма МСК в зависимости от времени, прошедшего после проведения трансплантации, и тяжести клинического состояния. Независимо от выше указанных условий сохранялся 98% реципиентский химеризм.

Несмотря на это, в 11% случаев (2 детей с диагнозом ОМЛ) наблюдался временный донорский химеризм МСК. Так, у первого ребенка донорский химе-

ризм на +52-й день составлял 27% и резко снижался к +58-му дню до 6%. У второго ребенка на 33-й день химеризм по МСК составлял 24% и более плавно снижался, в отличие от первого случая, к +81-му дню до 17%. В дальнейших образцах костного мозга у данных детей наблюдался 98% реципиентский химеризм по МСК. Делать какие-либо выводы о возможных дополнительных факторах или особенностях клинического состояния сложно в связи с малым числом наблюдений ($n=2$).

Параллельно с исследованием химеризма МСК проведены исследования линейного химеризма всех детей, вошедших в исследование. Взятие образцов на химеризм МСК и линейный химеризм осуществлялось одновременно. В 96% случаев у всех детей наблюдались аллели донора по информативным маркерам не менее 98%. Тем самым мы попытались косвенным путем подтвердить достоверность наших исследований и снизить вероятность ошибок их проведения.

Выводы. Продемонстрирована принципиальная возможность приживания МСК у пациентов, подвергшихся аллогенной трансплантации гемопоэтических предшественников. Показаны возможные варианты химеризма МСК у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических предшественников. С учетом того, что ряд исследователей (Е.М. Villagon и соавт.; J. Garcia-Castro и соавт. и др.) также получили неоднозначные результаты о возможности приживания МСК, необходимо продолжить исследования в этом направлении.

МОНИТОРИНГ ХИМЕРНОГО ТРАНСКРИПТА MLL-EP15 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Г.А. Цаур^{1,2}, А.С. Иванова^{1,2}, А.М. Кустанович³, С.Ю. Ковалев⁴, А.М. Мисюрин⁵, М.В. Сучкова⁵, О.М. Плеханова¹, Ю.А. Яковлева¹, А.М. Попов^{1,2,6}, Л.И. Савельев^{1,2,6}, О.В. Алейникова³, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница № 1; ²ГУЗ СО Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург; ³РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь; ⁴Уральский государственный университет, Екатеринбург; ⁵Гематологический научный центр РАМН, Москва; ⁶Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Введение. На сегодняшний день описано >50 различных перестроек гена *MLL*, которые ассоциированы с острыми лейкозами у детей первого года жизни, детей старшего возраста и взрослых [С. Meuer и соавт., 2006], и их число постоянно увеличивается. Транслокация $t(1;11)(p32;q23)$, приводящая к образованию химерного транскрипта *MLL-EP15*, составляет 1–1,5% всех перестроек гена *MLL* [С. Harrison, 1998; С. Meuer и соавт., 2006]. Наиболее часто химерный ген *MLL-EP15* выявляется при помощи стандартной цитогенетики и/или флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Более половины всех описанных случаев обнаружения *MLL-EP15* приходится на возрастную группу младше 1 года. В доступной нам литературе не встретилось описания мониторинга кинетики элиминации химерного транскрипта *MLL-EP15*.

Цель исследования — создание методики количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для выявления и мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с наличием *MLL-EP15*.

Материалы и методы. С ноября 2003 г. по май 2008 г. транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ была выявлена у 2 пациентов, включенных в Российско-Белорусское мультицентровое исследование острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей первого года жизни *MLL-VABU*. Письменное информированное согласие родителей на диагностические процедуры и лечение получено. В качестве исходного материала использованы лейкоциты из костного мозга и периферической крови. Цитогенетические анализы костного мозга выполняли после краткосрочного культивирования (24–48 ч) с последующей дифференциальной окраской. Карiotипирование проводили в соответствии с номенклатурой ISCN [F. Mitelman и соавт., 1991]. FISH выполняли с использованием зонда *LSI MLL Break Apart rearrangement probe* («Abbott», США). Диагностика иммунологических вариантов ОЛЛ осуществлялась согласно общепринятым критериям [С. Jennings и соавт., 1997]. Определение экспрессии дифференцировочных антигенов опухолевыми бластами проводилось при помощи многоцветной проточной цитометрии. Для выделения РНК лейкоциты и бластные клетки выделяли из костного мозга путем лизиса в 0,84% растворе хлорида аммония, после чего проводили подсчет ядросодержащих клеток на гематологическом счетчике KX-21 («Sysmex», Япония). В работу брали 5×10^6 ядерных клеток. Для выделения РНК использовали TRIreagent WB («Sigma-Aldrich», Германия). Полученную РНК обрабатывали ДНК-азой I («Fermentas», Латвия) согласно инструкции производителя. Качество и количество РНК оценивались при помощи капиллярного электрофореза на биоанализаторе Agilent 2100 и наборов RNA 6000 Nano Labchip («Caliper Technologies», США). 1 мкг РНК переводили в кДНК в ходе реакции обратной транскрипции с использованием *MML-V* обратной транскриптазы («Promega», Германия) и случайных нумеров («Синтол», Россия). Обнаружение *MLL-EP15* было проведено мультиплексной ПЦР с применением набора HemaVision («DNA Technology A-S», Дания). Полученные ПЦР-фрагменты клонировали с помощью вектора pGEM-T Easy Vector («Promega», Германия), после чего осуществляли 10-кратные разведения полученной плазмиды (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6). Нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта была определена на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130. Для мониторинга химерного транскрипта *MLL-EP15* были синтезированы праймеры, расположенные в экзонах 10 гена *MLL* и 2 гена *EP15*. Нумерация экзонов гена *MLL* дана по I. Nilson и соавт. (1996). ПЦР-РВ проведена согласно рекомендациям Europe against cancer [J. Gabert и соавт., 2003]. В качестве контрольного гена использован *ABL*. Для оценки чувствительности применяли стандартные разведения плазмид, а также исходной РНК пациентов, выделенной из клеточной линии IMR-32. Для исключения ложноположительных результатов было проведено тестирование комбинации праймеров и зондов для *MLL-EP15* на 30

образцах пациентов с другими перестройками *MLL*, а также не имеющих транслокаций с вовлечением гена *MLL*.

Результаты. Транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ была выявлена методом стандартной цитогенетики с дифференциальным окрашиванием и подтверждена при помощи FISH с использованием зонда на точку разрыва в регионе 11q23. В обоих случаях химерный транскрипт представлял собой слияние экзонов 10 гена *MLL* и 2 гена *EP315*. ПЦР-РВ для *MLL-EP315* позволила получать воспроизводимые результаты при внесении в реакционную смесь 10 копий плазмиды, несущей *MLL-EP315*, а также при разведении исходной РНК пациента вплоть до 10^{-5} . Коэффициент вариации не превышал 20%. Неспецифической амплификации в *MLL-EP315*-негативных образцах не выявлено.

Выводы. Созданная нами система может быть использована для мониторинга МОБ у пациентов с наличием химерного транскрипта *MLL-EP315*. Она является специфичной, высокочувствительной и воспроизводимой.

ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ ФРАКЦИИ CD34⁺-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА И ИХ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ДЕТАМ С НЕЙРОБЛАСТОМой

Ю.А. Яковлева¹, Г.А. Цаур^{1,2}, Е.В. Шориков^{1,2}, А.А. Игуменьшев^{1,2}, Л.В. Вахонина^{1,2}, Н.Г. Майшева^{1,2}, А.Ю. Задоя^{1,2}, И.Н. Вяткин^{1,2}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, А.М. Попов^{1,2,3}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница №1; ²ГУЗ СО Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; ³Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Введение. Дети с нейробластомой IV стадии нуждаются в интенсивной химиотерапии в сочетании с аутотрансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Однако собранный в ходе цитафереза или миелоэкспузии материал может быть контаминирован опухолевыми клетками, что сопряжено с риском развития рецидива после аутотрансплантации. Ранее показано, что аутотрансплантация высокоочищенной фракции CD34⁺-клеток, полученной с использованием метода позитивной иммуномагнитной селекции (ИМС), дает хороший результат у пациентов с нейробластомой [R. Handgretinger, 2002].

Материалы и методы. С июня 2007 г. по апрель 2008 г. 7 пациентам с нейробластомой IV стадии проведено 8 процедур ИМС CD34⁺-клеток на аппарате CliniMACS plus («Mytlenyi Biotec», GmbH, Германия).

У 4 больных после стимуляции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора выделены CD34⁺-клетки из обогащенной мононуклеарными фракциями клеток периферической крови, полученной путем лейкофереза на клеточном сепараторе Cobe Spectra («Gambro»). У 2 пациентов CD34⁺-клетки выделяли из клеток костного мозга, в 1 наблюдении были заготовлены селективированные CD34⁺-клетки, как из периферической крови, так и из костного мозга. Во всех случаях использовали наборы CliniMACS, рассчитанные на выделение до $0,6 \times 10^9$ CD34⁺-клеток из общего числа мононуклеаров до 60×10^9 клеток. До и после проведения ИМС измеряли общее количество ядродержащих клеток на гематологическом анализаторе Sysmex KX 21 («Roche»), число и жизнеспособность клеток (последнее с использованием 7-AAD) — на проточном цитометре FacsCanto II («BD», США). По окончании ИМС материал подвергался криоконсервированию с последующим замораживанием в программируемом замораживателе IceCube 15M («Sy-Lab»).

Результаты. В первичном клеточном материале, полученном путем лейкофереза или миелоэкспузии, медиана относительного содержания CD34⁺-клеток составила 1,64% (от 0,23 до 5,5%), число CD34⁺-клеток в расчете на кг массы пациента (CD34⁺/кг) — $10,64 \times 10^6$ (от 1,61 до $42,37 \times 10^6$). После ИМС медиана собранных CD34⁺/кг составила $4,93 \times 10^6$ (от 1,42 до $14,5 \times 10^6$), медиана чистоты фракции CD34⁺-клеток — 95,92% (от 69,2 до 97,7%), медиана жизнеспособных CD34⁺-клеток — 91,8% (от 71,6 до 99,6%). После курса высокодозной химиотерапии 2 пациентам была проведена ретрансфузия размороженных аутологичных селективированных CD34⁺-клеток. Пациенту Н., 2 лет, введены CD34⁺-клетки периферической крови в дозе $16,16 \times 10^6$ на кг массы тела. Восстановление гранулоцитов до уровня >500 /мкл произошло на 28-й день. Во втором случае у пациента М., 4 лет, число перелитых высокоочищенных CD34⁺-клеток костного мозга составило $3,9 \times 10^6$ на кг массы тела, к 28-му дню — количество нейтрофилов <500 /мкл. На 35-й день проведено дополнительное введение заготовленных аутологичных селективированных CD34⁺-клеток периферической крови в дозе $1,2 \times 10^6$ на кг массы тела. На 40-й день констатировано приживание.

Выводы. ИМС-селекция CD34⁺-клеток на аппарате CliniMACS plus позволяет получать аутотрансплантат ГСК с высокой чистотой и жизнеспособностью CD34⁺-клеток. Тем не менее приживание селективированных CD34⁺-клеток происходит медленнее, чем приживание костного мозга и ГСК периферической крови, не подвергавшихся манипуляциям.

ВНИМАНИЕ: ПОДПИСКА!

Журнал «Онкогематология» рассылается читателям бесплатно.

Анкета для бесплатной подписки представлена на сайте: www.netoncology.ru

Чтобы получать журнал, нужно либо заполнить анкету на сайте, либо передать ее в издательство по факсу: 8 (495) 252 96 19, e-mail: abv@abvpress.ru или по почте: 109443, Москва, а/я 35.

Можно также оформить платную подписку через каталоги:

«Почта России», подписной индекс — 12313, «Пресса России», подписной индекс — 42167.