

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Роль позитронно-эмиссионной томографии
в прогнозировании результатов
аутологичной трансплантации
гемопозитических стволовых клеток
у пациентов с неходжкинскими лимфомами**

**ABO-несовместимость при аллогенной
трансплантации гемопозитических
стволовых клеток**

**Делеции гена *IKZF1* у детей с острым
лимфобластным лейкозом**

4

ТОМ 11
2016

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

С 2006 года журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

С 2015 года электронная версия журнала представлена в ведущих российских и мировых электронных библиотеках, в том числе EBSCO.

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.oncohematology.abvpress.ru

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Самочатова Елена Владимировна, заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор, заведующая отделом клинических исследований ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Афанасьев Борис Владимирович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, директор Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Пушкин Вадим Вадимович, д.м.н., профессор, заместитель главного врача по гематологии ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий отделом кооперированных исследований в гематологии/онкологии подростков и взрослых ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Румянцев Юлиа Васильевна, д.м.н., заведующая отделом исследования лимфопролиферативных заболеваний ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ПОМОЩНИК ОТВЕТСТВЕННОГО СЕКРЕТАРЯ

Петрова Галина Дмитриевна, к.м.н., научный сотрудник отделения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 0 5 Г .

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор В.Е. Ефремова
Корректор В.А. Наумкина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Руководитель проекта
А.Г. Прилепская, +7 (965) 319-10-53,
alla@abvpress.ru

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

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

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

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

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Онкогематология. 2016. Том 11.
№ 4. 1–86
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 3000 экз.

www.oncohematology.abvpress.ru

4^{ТОМ 11}
'16

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алейникова Ольга Витальевна, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава Республики Беларусь, врач-гематолог высшей квалификационной категории (Минск, Республика Беларусь)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, академик РАЕН, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. Н.Ф. Владимирского», главный гематолог Московской области (Москва, Россия)

Дубровин Михаил Михайлович, д.м.н., профессор, отдел ядерной медицины, Детский исследовательский госпиталь Св. Иуды (Мемфис, США)

Карачунский Александр Исаакович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

Криволапов Юрий Александрович, д.м.н., профессор, член панели патологов Европейской сети исследования лимфом, член Европейской рабочей группы исследования костного мозга, заведующий патологоанатомическим отделением клинической молекулярной морфологии Клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Менделеева Лариса Павловна, д.м.н., заместитель генерального директора по науке и инновациям — директор НИИ гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Минков М.Л., д.м.н., доцент, зав. клиникой педиатрии и подростковой медицины с отделением неонатологии больницы Rudolfstiftung (Вена, Австрия)

Мякова Наталья Валерьевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Никитин Евгений Александрович, д.м.н., руководитель дневного стационара городского гематологического центра ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

Паровичникова Елена Николаевна, д.м.н., руководитель отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Пономарев Владимир Борисович, д.м.н., отдел радиологии Института Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (Нью-Йорк, США)

Рукавицын Олег Анатольевич, д.м.н., профессор, начальник Гематологического центра ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, главный гематолог госпиталя (Москва, Россия)

Усс Анатолий Леонидович, д.м.н., профессор, главный гематолог Минздрава Республики Беларусь, член Комитета по трансплантологии Совета Европы и Европейской группы по трансплантации костного мозга, руководитель Республиканского центра гематологии и трансплантации костного мозга (Минск, Республика Беларусь)

Фечина Лариса Геннадьевна, заслуженный врач РФ, заместитель главного врача по онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1, руководитель Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Крыжановский Олег Игоревич, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний онкологического центра «Alta Bates» (Калифорния, США)

Лукина Елена Алексеевна, д.м.н., профессор, руководитель научно-клинического отделения редких заболеваний, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии лейкозов и патологии эритронов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Поддубная Ирина Владимировна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой онкологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последилового образования» Минздрава России на базе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Россинов Виктор Анатольевич, к.м.н., врач высшей категории, заведующий гематологическим отделением Самарской областной клинической больницы им. М.И. Калинина (Самара, Россия)

Румянцев Александр Григорьевич, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, главный внештатный специалист детский гематолог Минздрава России, член правления Союза педиатров (Москва, Россия)

Румянцев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Минобрнауки России (Москва, Россия)

Талалаев Александр Гаврилович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России на базе ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница», главный детский патологоанатом г. Москвы (Москва, Россия)

The journal "Oncohematology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

In 2006, journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Since 2015, the journal's electronic version has been available in the leading Russian and international electronic libraries, including EBSCO.

ONCO HEMATOLOGY

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

www.oncohematology.abvpress.ru

EDITOR-IN-CHIEF

Samochatova Elena V., Honored Doctor of the Russian Federation, MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES OF EDITOR-IN-CHIEF

Afanasiev Boris V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Director of Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head of the Department of Haematology, Transfusion and Transplantation at Acad. I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Ptushkin Vadim V., MD, PhD, Professor, Deputy Chief Physician for hematology of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Care Department; Head of Department of Cooperated Research in Adolescents/Adults Hematology/Oncology in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE SECRETARY

Rumyantseva Yulia V., MD, PhD, Head of Department of Lymphoproliferative Diseases Studies in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ASSISTANT TO EXECUTIVE SECRETARY

Petrova Galina D., MD, PhD, Research Fellow in Department of Intensive Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2005

4^{Vol. 11}
'16

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor V.E. Efremova
Proofreader V.A. Naumkina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

Subscription & Distribution Service

I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Project Manager
A.G. Prilepskaya, 8-965-319-10-53,
alla@abvpress.ru

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (PII No. ФЦ77-36928 dated 21 July 2009).

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Onkogematologiya".

The editorial board is not responsible for advertising content.

The authors' point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Onkogematologiya. 2016.
Volume 11. No 4. 1–86
© PH "ABV-Press", 2016
Pressa Rossii catalogue index: 42167
Printed at the Mediacolor LLC

3,000 copies

www.oncohematology.abvpress.ru

EDITORIAL BOARD

Aleynikova Olga V., Associate Member of the National Academy of Science of the Republic of Belarus, Professor, Director of Republican Research and Medical Center for Oncology, Hematology and Immunology, Physician of the Highest Qualification Grade (Minsk, Republic of Belarus)

Golenkov Anatoly K., MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Natural Sciences, Head of Department of Clinical Hematology and Immune Therapy in N.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute, Chief Hematologist of Moscow Region (Moscow, Russia)

Doubrovina Mikhail, MD, PhD, Nuclear Medicine Division, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA)

Karachunsky Alexander I., MD, PhD, professor, Deputy General Director — Director of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Krivolapov Yuri A., MD, PhD, Professor, Member of Pathologists Panel of European Lymphomas Research Group, Member of European Bone Marrow Research Group, Head of Anatomic-Pathological Department of Clinical Molecular Morphology of E.E. Eichwald Clinics, I.I. Mechnikov North-West State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Mendeleeva Larisa P., MD, PhD, Deputy General Director for Science and Innovation — Director of the Research Institute of Hematology and Transplantation of Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Minkov M.L., MD, PhD, Vienna Hospital Association Rudolfstiftung Hospital, Clinic of Pediatrics and Adolescent Medicine with Department for Neonatology (Vienna, Austria)

Myakova Natalya V., MD, PhD, Professor, Head of Oncohematology Department of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Nikitin Evgeny A., MD, PhD, Head of the Day Hospital in Hematology Center of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Care Department (Moscow, Russia)

Parovichnikova Elena N., MD, PhD, Head of Department of Chemotherapy of Hematological Malignancy, Hematopoiesis Depression and Bone Marrow Transplantation in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ponomarev Vladimir B., MD, PhD, Department of Radiology of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, USA)

Rukavitsyn Oleg A., MD, PhD, Professor, Head of Hematology Center of N.N. Burdenko General Military Clinical Hospital of Ministry of Defense of Russia, Chief Hematologist of the Hospital (Moscow, Russia)

Uss Anatoly L., MD, PhD, Professor, Chief Hematologist of Ministry of Health of the Republic of Belarus, Member of Transplantology Committee of the Council of Europe and European Bone Marrow Transplantation Group, Head of Republican Center for Hematology and Bone Marrow Transplantation (Minsk, Republic of Belarus)

Fechina Larisa G., Honored Doctor of the Russian Federation, Deputy Chief Physician for Oncology and Hematology of Regional Children's Clinical Hospital № 1, Head of Center of Children's Oncology and Hematology (Yekaterinburg, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Kryzhanovsky Oleg I., MD, PhD, Director of Malignant Hematology Program Comprehensive Cancer Center "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, CA, USA)

Lukina Elena A., MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department of Rare Diseases, Leading Researcher of the Department of Leukemia Chemotherapy and Erythron Pathology in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Poddubnaya Irina V., MD, PhD, Corresponding Member of Russian Academy of Science, Professor, Head of Oncology Department of Russian Medical Postgraduate Academy of Ministry of Health of Russia on the basis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Rossiev Viktor A., MD, PhD, Highest Grade Doctor, Head of Hematology Department in M.I. Kalinin Samara Regional Clinical Hospital (Samara, Russia)

Rumyantsev Alexander G., MD, PhD, professor, Academician of Russian Academy of Sciences, General Director of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia; Chief Pediatric Hematologist of Ministry of Health of Russia; Board Member of the Union of Pediatricians of Russia (Moscow, Russia)

Roumiantsev Sergey A., MD, PhD, professor, Deputy General Director — Director of School of Molecular and Experimental Medicine of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Head of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University; Head of Translational and Regenerative Medicine Department of Moscow Institute of Physics and Technology (State University) of Ministry of Education and Science of Russia (Moscow, Russia)

Talalaev Alexander G., MD, PhD, Professor, Head of Pathology Department in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia based in Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Chief Children's Pathologist of Moscow (Moscow, Russia)

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

<i>И. Н. Суборцева, А. Л. Меликян</i>	
Миелодиспластические/миелолипролиферативные заболевания	8
<i>В. Г. Потапенко, Н. Б. Михайлова, Б. И. Смирнов, И. А. Скороход, Д. А. Чагинская, В. В. Рябчикова, И. А. Самородова, Э. И. Подольцева, В. В. Ипатов, И. В. Бойков, В. Н. Семелев, Д. А. Горностаев, Т. Г. Потапенко, Т. Г. Кулибаба, Н. В. Медведева, Б. В. Афанасьев</i>	
Роль позитронно-эмиссионной томографии в прогнозировании результатов аутологичной трансплантации стволовых клеток у пациентов с неходжкинскими лимфомами	18
<i>Е. В. Чернышова, Д. С. Абрамов, Д. М. Коновалов, С. С. Ларин, Н. В. Мякова</i>	
Молекулярно-биологические характеристики	
ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы	25
<i>Г. А. Цаур, А. Е. Друй, А. Г. Солодовников, А. М. Попов, А. П. Шапочник, Л. В. Вахонина, А. А. Власова, Т. О. Ригер, Т. Ю. Вержбицкая, Ю. В. Ольшанская, Е. В. Шориков, О. Р. Аракаев, Л. И. Савельев, Л. Г. Фечина</i>	
Делеции гена IKZF1 — независимый прогностический фактор у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников	32

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

<i>М. А. Кучер, Д. Э. Певцов, О. А. Макаренко, А. Л. Алянский, Н. Е. Иванова, М. А. Эстрина, Е. В. Бабенко, Б. Б. Баховадинов, Л. С. Зубаровская, Б. В. Афанасьев</i>	
ABO-несовместимость при аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток: анализ 15-летнего опыта НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой	49

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ
НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

<i>И. М. Бархатов, А. В. Предеус, А. Б. Чухловин</i>	
Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии	56
<i>А. М. Попов, М. В. Белевцев, Е. В. Боякова, Т. Ю. Вержбицкая, Л. В. Мовчан, М. С. Фадеева, А. Б. Пащенко, В. П. Савицкий, А. А. Левадный, Г. А. Цаур, С. А. Кашпор, С. А. Плясунова, Л. Г. Фечина, О. В. Алейникова, А. И. Карачунский</i>	
Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом.	
Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы	64
<i>О. С. Федянина, А. О. Закирова, А. Е. Задорожная, Н. М. Капранов, А. Н. Хвастунова, П. А. Ядгарова, А. В. Филатов, О. С. Бурова, Ф. И. Атауллаханов, С. А. Кузнецова</i>	
Исследование морфологии и распределения α-нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нормальных предшественниках лейкоцитов миелоидного ростка с помощью клеточного биочипа	74

КОНФЕРЕНЦИИ, СИМПОЗИУМЫ, СОВЕЩАНИЯ

Новейшее исследование: клиническое питание способствует успешному преодолению онкологических заболеваний	80
«Процесс лечения и реабилитации неотделим от питания» — интервью с главным врачом Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга д.м.н. Георгием Моисеевичем Манихасом	82

ПРЕСС-РЕЛИЗ

Миссия Nutricia Advanced Medical Nutrition: «Улучшать результаты лечения и качество жизни пациентов»	84
---	-----------

НЕКРОЛОГ

Памяти Александра Эдуардовича Мациониса	85
--	-----------

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

<i>I.N. Subortseva, A.L. Melikyan</i> Myelodysplastic/myeloproliferative diseases	8
<i>V.G. Potapenko, N.B. Mikhaylova, B.I. Smirnov, I.A. Skorokhod, D.A. Chaginskaya, V.V. Ryabchikova, I.A. Samorodova, E.I. Podol'tseva, V.V. Ipatov, I.V. Boykov, V.N. Semelev, D.A. Gornostaev, T.G. Potapenko, T.G. Kulibaba, N.V. Medvedeva, B.V. Afanas'ev</i> Prognostic significance of positron emission tomography in autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma	18
<i>E.V. Chernyshova, D.S. Abramov, D.M. Kononov, S.S. Larin, N.V. Myakova</i> Molecular biological characteristics of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma	25
<i>G.A. Tsaur, A.E. Druy, A.G. Solodnikov, A.M. Popov, A.P. Shapochnik, L.V. Vakhonina, A.A. Vlasova, T.O. Riger, T.Yu. Verzhbitskaya, Yu.V. Olshanskaya, E.V. Shorikov, O.R. Arakaev, L.I. Saveliev, L.G. Fechina</i> IKZF1 deletions are independent prognostic factor in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	32

HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

<i>M.A. Kucher, D.E. Pevtsov, O.A. Makarenko, A.L. Alyanskiy, N.E. Ivanova, M.A. Estrina, E.V. Babenko, B.B. Bakhovadinov, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasyev</i> ABO-incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 15-years experience of R.M. Gorbacheva Memorial Research Institute for Children Oncology, Hematology and Transplantation	49
--	----

BASIC RESEARCH

<i>I.M. Barkhatov, A.V. Predeus, A.B. Chukhlovina</i> Next-generation gene sequencing and its applications in oncohematology	56
<i>A.M. Popov, M.V. Belevtsev², E.V. Boyakova, T.Yu. Verzhbitskaya, L.V. Movchan, M.S. Fadeeva, A.B. Pashchenko, V.P. Savitskiy, A.A. Levadnyy, G.A. Tsaur, S.A. Kashpor, S.A. Plyasunova, L.G. Fechina, O.V. Aleynikova, A.I. Karachunskiy</i> Standardization of flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Russia—Belarus multicenter group experience.	64
<i>O.S. Fedyanina, A.O. Zakirova, A.E. Zadorozhnaya, N.M. Kapranov, A.N. Khvastunova, P.A. Yadgarova, A.V. Filatov, O.S. Burova, F.I. Ataullakhanov, S.A. Kuznetsova</i> Morphology and distribution of α-naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase in normal myelomonocytic precursors studied by the cell microarray.	74

CONGRESSES, CONFERENCES, SYMPOSIA

A recent research: clinical nutrition contributes to the successful overcoming of cancer	80
“Treatment and rehabilitation not be separated from nutrition” — an interview with the Chief physician of the St. Petersburg City Clinical Oncology Dispensary	82

PRESS RELEASE

Mission of Nutricia Advanced Medical Nutrition: “To improve the treatment results and patients quality of life”	84
--	----

OBITUARY

In memory of Alexander Matsionis	85
---	----

Миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания

И. Н. Суборцева, А. Л. Меликян

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Анаит Левонян Меликян anoblood@mail.ru

В классификации Всемирной организации здравоохранения 2008 г. хронические миелоидные злокачественные заболевания (неоплазии, опухоли), которые имеют характеристики как миелодиспластических, так и миелопролиферативных заболеваний, отнесены в группу «миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания (неоплазии)» (МДС/МПЗ). Она объединяет хронический миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом (РАКСТ) и МДС/МПЗ неклассифицированные. За исключением РАКСТ, между заболеваниями данной группы существует сходство молекулярных характеристик и клинических проявлений, что диктует необходимость изучения биологии, выявления конкретных молекулярных маркеров, морфологических особенностей и более четкого определения нозологической формы. В данном обзоре приводятся международные рекомендации по диагностике и лечению МДС/МПЗ.

Ключевые слова: миелопролиферативные заболевания, хронический миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-8-17

Myelodysplastic/myeloproliferative diseases

I. N. Subortseva, A. L. Melikyan

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Passage, Moscow 125167, Russia

Chronic myeloid malignancies that have characteristics of both the myelodysplastic and myeloproliferative disorders allocated to myelodysplastic/myeloproliferative diseases (MDS/MPD) group in 2008 World Health Organization classification. This group includes chronic myelomonocytic leukemia, juvenile myelomonocytic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) and unclassified MDS/MPD. Except RARS-T diseases in this group have similar molecular characteristics and clinical manifestations, which require the study of biology, specific molecular markers, morphological features and a clearer definition of nosology. This review provides information on international guidelines for the diagnosis and treatment of MDS/MPD.

Key words: myeloproliferative diseases, chronic myelomonocytic leukemia, juvenile myelomonocytic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, refractory anemia with ringed sideroblasts

Введение

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разделила хронические миелопролиферативные заболевания на 3 категории: миелопролиферативные заболевания/неоплазии (МПЗ), миелодиспластические синдромы (МДС) и патологии с характеристиками обеих групп — миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания (МДС/МПЗ) [1, 2]. Группа МДС/МПЗ включает хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ), атипичный хронический миелоидный лейкоз (аХМЛ), МДС/МПЗ неклассифицированные (МДС/МПЗн) и рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом (РАКСТ) (рис. 1) [3]. Данная группа объединяет различные нозологические варианты, характеризующиеся наличием признаков как МПЗ, так и дисплазии кроветворения, значительной молекулярной гетерогенностью и отсутствием конкретных генотипических маркеров [4]. Наличие моноцитоза

или эозинофилии является признаком ХММЛ, ЮММЛ или хронической эозинофильной лейкемии, в то время как дифференциальная диагностика между аХМЛ, МДС/МПЗн и МПЗн затруднительна. Молекулярными маркерами заболеваний служат мутации генов, регулирующих сигнальные пути JAK-STAT, MTOR, PI3K/AKT, MEK и эпигенетические изменения [5]. В настоящее время нет опубликованных данных, касающихся заболеваемости различными подтипами, хотя существует мнение, что частота возникновения МДС/МПЗ является довольно низкой.

Современные представления о патогенезе миелодиспластических/миелопролиферативных заболеваний

Стандартное цитогенетическое исследование — анализ единичных нуклеотидных замен с высоким разрешением (high-resolution single nucleotide polymorphism array) — позволяет выявить хромосомные аномалии

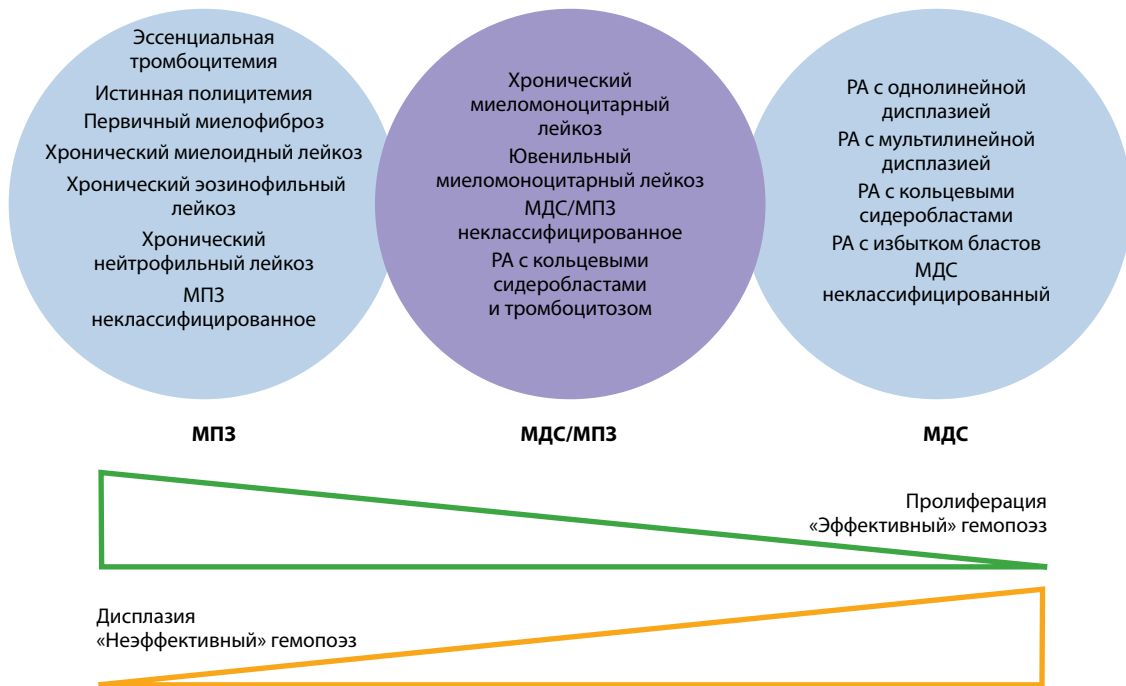


Рис. 1. Миелопролиферативные заболевания (МПЗ) и миелодиспластический синдром (МДС). РА — рефрактерная анемия

у 70 % больных МДС/МПЗ [5]. Большинство из них представляют собой анеуплоидии (трисомия 8, моносомия 7) или делеции (*del17q*, *del13q*, *del20q*); реже — транслокации с участием различных слитых генов тирозинкиназы [6]. Некоторые из этих транслокаций выделены в существующей классификации ВОЗ: миелоидные и лимфоидные заболевания (неоплазии) с эозинофилией и реаранжировками *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*. Транслокации с участием других киназ также наблюдаются у пациентов с МДС/МПЗ или МПЗн. Выявление транслокаций, включающих *PDGFRA*, *PDGFRB* и *ABL1*, имеет не только диагностическое значение, но и характеризует чувствительность к терапии различными препаратами, например ингибиторами тирозинкиназ. Детекция транслокаций с участием *FGFR1* или *JAK2* определяет неэффективность терапии ингибиторами тирозинкиназ, но чувствительность к лечению понатинибом или руксолитинибом [7–10].

Большинство мутантных генов делятся на 4 функциональных класса: сигнальные, эпигенетические, регулирующие сплайсинг и транскрипцию (рис. 2) [11, 12]. Мутации генов — регуляторов сигнальных путей приводят к аномальной аутоактивации пролиферации и ингибированию апоптоза: мутации генов рецепторов факторов роста (*CSF3R*), тирозинкиназ (*JAK2*, *NRAS*, *KRAS*) и регуляторов сигнальных путей (*PTPN11*, *CBL*, *NFI*) [13]. Мутации генов *KRAS* могут быть выявлены в 90 % случаев ЮММЛ и могут являться определяющим признаком этого заболевания [14]. Мутации генов — регуляторов сигнальных путей происходят приблизительно в 50 % случаев аХМЛ и определяют фенотип высокой чувствительности к GM-CSF *in vitro* [15]. У 80 % пациентов с РАКСТ активирован сигнальный

путь JAK-STAT вследствие присутствия мутации *JAK2V617F* или мутаций гена *MPL*. У 67 % больных РАКСТ выявляются мутации гена *SF3B1*. Нарушение функции белка, кодируемого данным геном, приводит к накоплению железа в клетках. Наличие мутации является предиктором появления сидеробластов с вероятностью 97,7 % [16]. У мышей блокировка сигнального каскада NOTCH приводит к формированию фенотипа МДС/МПЗ [17].

Мутации в генах — эпигенетических регуляторах являются нередким событием в группе МДС/МПЗ. Наиболее часто выявляются мутации генов *TET2* и *ASXL1*, реже — *SRSF2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *SUZ12*, *EED* и *UTX* [18, 19]. Взаимодействие между эпигенетическими мутациями является сложным, не существует четких моделей появления данных мутаций, помимо данных о том, что *TET2* и *IDH1/2* являются взаимоисключающими [20]. Мутации в генах, контролирующих процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК, часто встречаются при МДС/МПЗ [21]. Около 50 % пациентов с ХММЛ имеют мутации *SRSF2*, а еще 20 % — мутации других генов комплекса сплайсинга (*SF3B1*, *U2AF35*, *U2AF65* и *SF3A1*) [22]. Мутации гена *SF3B1* нередко могут сочетаться с мутациями *DNMT3*, *JAK2*, *ASXL1* и *TET2* [23, 24]. Исследования мутаций *U2AF35* на мышиных модельных системах выявили ингибирование индукции сплайсинга матричной РНК (мРНК), регуляторных путей и роста. Мутации гена *RUNX1* определяются в 15–30 % наблюдений аХМЛ. *RUNX1* кодирует ядерный связывающий фактор α (CBF α), который играет

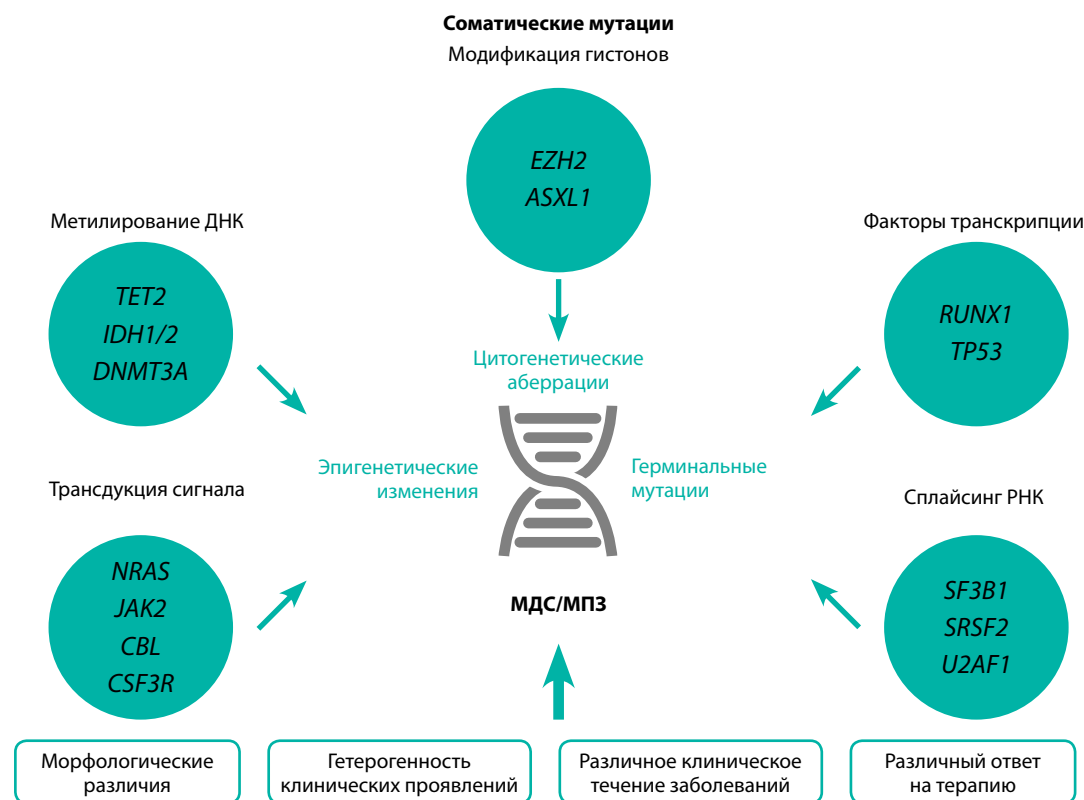


Рис. 2. Схематическое представление генотипической гетерогенности у пациентов с миелодиспластическими/миелопролиферативными заболеваниями (МДС/МПЗ)

фундаментальную роль для кроветворения. *NPM1* и *TP53* мутируют лишь в небольшом проценте случаев. SET-связывающий белок 1 (*SETBP1*) недавно был идентифицирован как новый онкоген. Мутации гена *SETBP1* выявлены в 25 % случаев аХМЛ, реже — при других вариантах МДС/МПЗ [25]. Последствия появления мутаций *SETBP1* неизвестны, но они могут ингибировать активность опухолевого супрессора протеин-фосфатазы PP2A. Незначительное число больных МДС/МПЗ имеют мутации гена *CALR* [26, 27]. Приобретенные соматические мутации при МПЗ (*SETBP1*, *ASXL1*, *EZH2* и других генов) не являются строго специфичными и также найдены при редких врожденных нарушениях развития. Возможным объединяющим фактором является то, что эти мутации изменяют экспрессию гомеостатических генов, определяющих как процессы роста и дифференцировки в эмбриогенезе, так и кроветворение у взрослых [28].

Хронический миеломоноцитарный лейкоз

Ежегодная заболеваемость ХММЛ составляет 1 на 100 тыс. взрослых, средний возраст пациентов — 70 лет, преобладающее большинство больных — мужчины [29]. Ген *BCR-ABL1* и реаранжировка генов *PDGFRA*, *PDGFRB* или *FGFR1* не выявляются при данном подтипе заболевания. Мутация *JAKV617F* встречается менее чем у 10 % пациентов с ХММЛ, в частности в случае превалирования пролиферативных, а не дис-

пластических признаков заболевания [30]. Редко ХММЛ может быть вторичным, опосредованным проводимой ранее терапией по поводу злокачественного новообразования, возникающим на фоне МДС или при прогрессировании первичного миелофиброза при наличии мутации *SRSF2* [31].

Диагноз ХММЛ должен быть установлен на основании лабораторных, морфологических и клинических параметров. В настоящее время общепризнана необходимость изучения молекулярного статуса заболевания. Более 90 % больных ХММЛ имеют одну или несколько мутаций: *TET2* (50–60 %), *SRSF2* (40–50 %), *ASXL1* (35–40 %) и *RUNX1* (15 %). Некоторые исследователи отмечают, что мутации генов *TET2* и *SRSF2* являются специфичными для ХММЛ [32]. Другие мутации затрагивают гены, регулирующие метилирование (*DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*), сплайсинг РНК (*SF3B1*, *U2AF35*, *ZRSR2*), ремоделирование хроматина (*UTX*, *EZH2*) и сигнальные пути (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *JAK2*, *FLT3*, *CSF3R*), в то время как мутации *TP53* встречаются редко [33].

Цитогенетические нарушения включают трисомию 8, моносомию 7, *del(7q)* и реаранжировки с вовлечением 12p. Анализ клональной архитектуры ХММЛ продемонстрировал приобретение новых мутаций с потерей гетерозиготности [32].

Основной характеристикой ХММЛ является возникновение опухолевого клона в CD34⁺CD38[–] клетках с последующим нарушением гранулоцитарно-моноцитарной дифференцировки (рис. 3) [34].

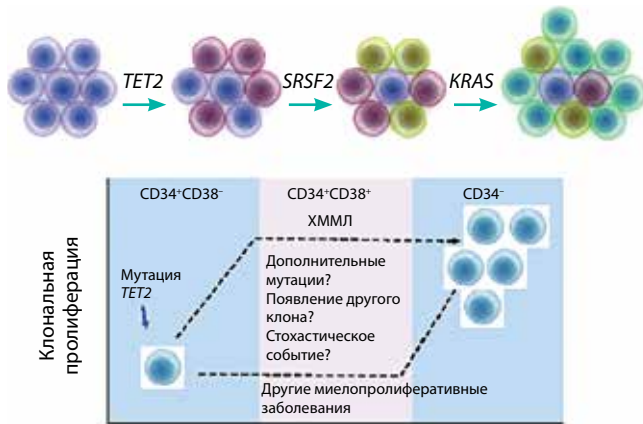


Рис. 3. Ранняя клональная пролиферация ($CD34^+CD38^-$ клетки) при хроническом миеломоноцитарном лейкозе (ХММЛ)

Важной биологической особенностью являются гиперчувствительность к GM-CSF и GM-CSF-зависимое фосфорилирование сигнального пути STAT5. Активация данного сигнального пути показана на мышиных моделях. У мышей с мутациями генов *TET2*, *JAK2*, *CBL* и *NRAS* отмечались активация сигнального пути STAT5 и увеличение образования гемопоэтических колоний. Данное наблюдение свидетельствует о потенциальной эффективности ингибиторов JAK2 в терапии ХММЛ, что требует проведения клинических исследований [35].

Особенностью заболевания является стойкий моноцитоз в периферической крови (моноциты $> 10\%$, $> 1 \times 10^9/\text{л}$). Морфологически моноциты имеют атипичный внешний вид с причудливыми ядрами и гра-

нулами в цитоплазме. У ряда пациентов клетки крови, идентифицированные как моноциты, позже признаются диспластическими и незрелыми гранулоцитами [36]. Клиническими особенностями заболевания являются спленомегалия, специфическое поражение кожи и лимфатических узлов, выпот в брюшную или плевральную полости.

В настоящее время в классификации ВОЗ на основании определения относительного количества бластных клеток в костном мозге ($> 10\%$) выделены 2 группы ХММЛ, отличающиеся по прогнозу: ХММЛ-1 и ХММЛ-2 [37]. Прогностические модели для ХММЛ были созданы в ходе клинических исследований при МДС до эры использования гипометилирующих агентов: IPSS (International Prognostic Scoring System), IPSS-R (International Prognostic Scoring System Revised), MDASC (Global MD Anderson Scoring System), MDAPS (MD Anderson Scoring System for CMML), DS (Düsseldorf Score), SS (Spanish Score), mBS (Modifiedournemouth Score) [38–42].

В настоящее время предложены прогностические системы, включающие генетическую информацию и клинические особенности. Н. Kantarjian и соавт. исследовали мутации гена *ASXL1*, генов, регулирующих сплайсинг (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*), транскрипцию (*RUNX1*, *NPM1*, *TP53*), контролирующих сигнальные пути (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *JAK2*, *FLT3*), а также эпигенетические мутации (*TET2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*) у 312 больных ХММЛ. Они отметили, что мутации гена *ASXL1*, возраст, гемоглобин, лейкоциты, тромбоциты определяют 3 подгруппы пациентов, отличающиеся общей

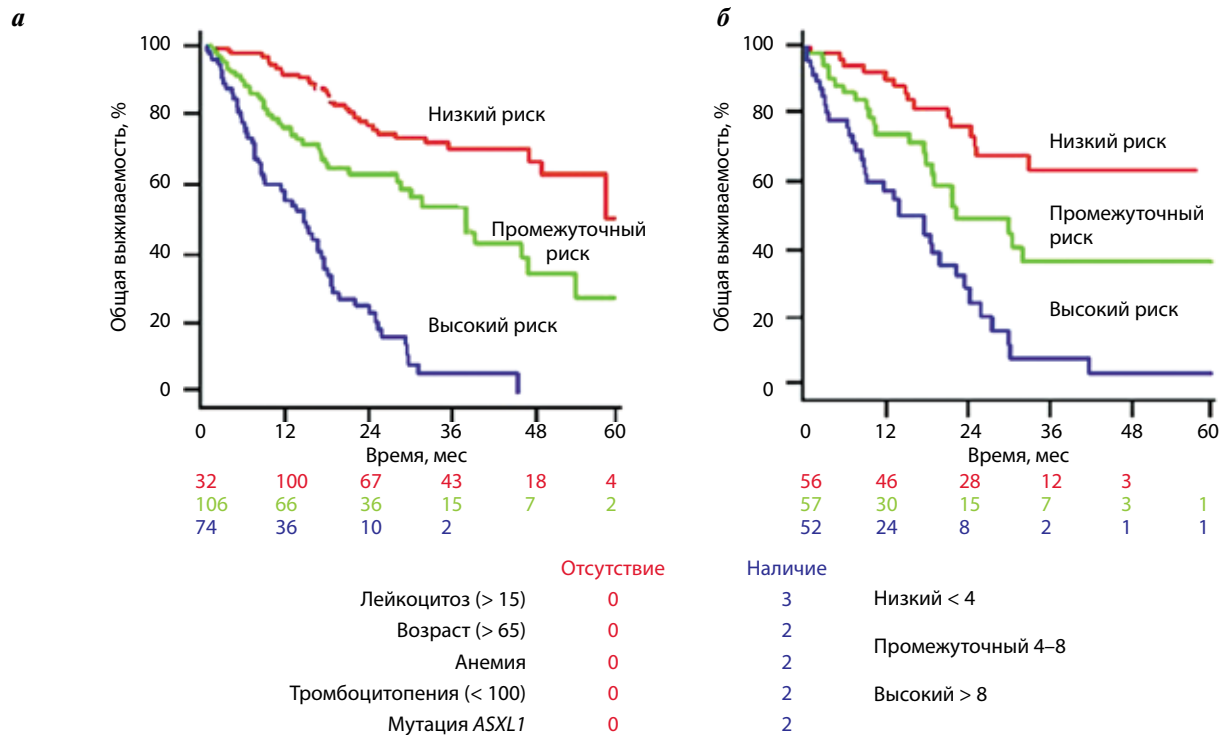


Рис. 4. Общая выживаемость больных хроническим миеломоноцитарным лейкозом: а – Groupe Francophone des Myelodysplasies centers, $n = 312$; б – Munich Leukemia Laboratory cohort, $n = 165$

выживаемостью (рис. 4) [43]. Е. Such и соавт. предложили ХММЛ-специфическую систему подсчета прогностических баллов (CMML-specific Prognostic Scoring System, CPSS), основанную на цитогенетической характеристике, наличии анемии и трансфузионной зависимости. Данная прогностическая шкала выделяет 4 группы риска, различающиеся по общей выживаемости и риску трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [44]. Ряд исследований подтвердили независимое прогностическое значение мутации *SETBP1* [45].

Лечение пациентов с ХММЛ представляет определенные трудности, так как некоторые из них имеют относительно индолентное течение заболевания с медианой выживаемости свыше 10 лет, в то время как в других случаях определяется быстрое прогрессирование заболевания с развитием вторичного ОМЛ, резистентного к проводимой терапии. Трансплантация аллогенных стволовых клеток остается единственным методом лечения, обеспечивающим долгосрочную ремиссию заболевания и потенциально — излечение. Если пациент не является кандидатом для проведения аллогенной трансплантации костного мозга (аллоТКМ), нет однозначных рекомендаций в отношении оптимального лечения.

По данным Французского регистра, 3-летняя общая выживаемость составила 32 % в когорте больных ХММЛ после проведения аллоТКМ в хронической фазе. Н. Eissa и соавт. сообщают о 10-летней общей выживаемости 40 %. Факторы, определяющие благоприятный исход, — группа риска (ХММЛ-1 против ХММЛ-2), неблагоприятный кариотип, индекс коморбидности и возраст. Спленомегалия является неблагоприятным прогностическим фактором. Имеет место гендерное влияние на риск рецидива; так, результаты аллоТКМ, если донор и реципиент женщины, хуже. Ни тип режима кондиционирования, ни проведение предтрансплантационной терапии не влияли на исходы аллоТКМ [46, 47].

Результаты лечения больных ХММЛ с трансформацией во вторичный ОМЛ или при высоком риске трансформации остаются неудовлетворительными. Медиана общей выживаемости равна 2,4 мес для больных, у которых не достигнута полная ремиссия после индукционной химиотерапии, и 28 мес для пациентов, которые достигают полной ремиссии после индукционной химиотерапии и аллогенной трансплантации стволовых клеток [48].

Гипометилирующие агенты в настоящее время — предпочтительный вариант лечения для больных, не являющихся кандидатами для аллоТКМ. Частота получения полного ответа низкая, ответ на терапию непродолжительный. Гипометилирующие агенты не оказывают влияния на общую выживаемость [49]. Мутации *ASXL1*, *RUNX1* и *TET2* определяют лучший ответ на децитабин, в то время как экспрессия *MYB* и *JUN* свидетельствует о низкой чувствительности к терапии [50].

В настоящее время проходят клинические исследования по оценке эффективности ингибиторов JAK2,

МЕК, BCL-XL, BCL-2, клофарабина, гипометилирующих агентов следующего поколения и других новых агентов.

Атипичный хронический миелоидный лейкоз

аХМЛ является крайне редким подтипом МДС/МПЗ. Его частота составляет 1 % от частоты типичного BCR-ABL1-положительного ХМЛ [51]. Диагностика аХМЛ требует исключения не только BCR-ABL1, но и реаранжировки PDGFRA, PDGFRB и FGFR1. Заболевание характеризуется развитием анемии, тромбоцитопении, нейтрофильного лейкоцитоза, дисплазией гранулоцитарного ростка, спленомегалией, в то время как моноцитоз и базофилия не выявляются в периферической крови [52].

Для определения клинических, гистологических и генетических характеристик, которые помогли бы в проведении дифференциальной диагностики аХМЛ и МДС/МПЗн, проанализировано 69 наблюдений аХМЛ и 65 МДС/МПЗн. Больные аХМЛ имели агрессивное течение заболевания, неблагоприятный прогноз и общую выживаемость 12,4 мес по сравнению с 21,8 мес для пациентов с МДС/МПЗн ($p = 0,004$). Медиана уровня лейкоцитов составила $40,8 \times 10^9/\text{л}$ для аХМЛ и $19,4 \times 10^9/\text{л}$ для МДС/МПЗн ($p < 0,001$). Также больные аХМЛ имели повышенный уровень лактатдегидрогеназы сыворотки крови, спленомегалию, анемию, тромбоцитопению менее $100 \times 10^9/\text{л}$, более чем 10 % миелоидных предшественников в периферической крови, уровень базофилов менее 2 %. Гистологическое исследование трепанобиоптата костного мозга выявило гиперклеточность и признаки дисгранулопоэза у всех пациентов с аХМЛ и у 50 % больных МДС/МПЗн. Фиброз костного мозга и остеосклероз, неспецифические комплексные цитогенетические аномалии, i(17q) наблюдались чаще в случае аХМЛ [53].

Специфических молекулярных маркеров аХМЛ не описано, мутации гена *SETBP1*, расположенного на хромосоме 18q21.1, наблюдались у 25 % пациентов с аХМЛ, в 6–15 % наблюдений ХММЛ и менее 3 % случаев ЮММЛ [54]. Функциональное значение этих мутаций еще до конца не изучено. Наиболее часто у больных аХМЛ описывают соматические мутации генов *JAK2*, *NRAS*, *IDH2*, *CBL*, *CSF3R* и *ETNK1*; также были обнаружены единичные случаи со слитными генами *BCR-JAK2* и *NUP98-HOXA9* [55–57].

Между аХМЛ и хроническим нейтрофильным лейкозом существуют клинические и морфологические сходства, однако генетические поломки, лежащие в основе развития данных заболеваний, совершенно различны. Мутация гена *CSF3R* выявляется у 90 % пациентов с хроническим нейтрофильным лейкозом и у 40 % больных аХМЛ [58]. Этот ген кодирует рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора-3 [59]. Соматические мутации *CSF3R* были описаны у больных тяжелой врожденной нейтропенией

и ОМЛ [60]. В последнее время в литературе появились сообщения о сочетанных мутациях *CALR* и *CSF3R* [61].

Тактика лечения больных аХМЛ не разработана в связи с крайне низким уровнем заболеваемости. Большая часть опубликованных данных включают описание аХМЛ в совокупности с другими подтипами заболеваний из группы МДС/МПЗ.

Пациенты, не являющиеся кандидатами для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, получают гипометилирующие агенты. Другие методы лечения включают гидроксикарбамид и леналидомид. Оптимальным является включение пациентов в клинические исследования.

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз

ЮММЛ является редким заболеванием, его распространенность составляет 0,12 на 100 тыс. детей. Средний возраст пациентов — 2 года, преобладают мальчики [62]. Проявлениями ЮММЛ являются моноцитоз, тромбоцитопения в клиническом анализе крови, повышение уровня фетального гемоглобина, инфильтрация моноцитами печени, селезенки, легких, кишечника и других органов, задержка роста. Клиническое течение заболевания характеризуется гетерогенностью: у ряда пациентов, особенно с синдромом Нунан (наследственное заболевание, характеризующееся низким ростом, определенным фенотипом, деформацией грудной клетки и пороками сердца), наблюдается спонтанное разрешение заболевания, несмотря на выявление клонального кроветворения, в то время как в других случаях прогноз крайне неблагоприятный и проведение аллоТКМ неэффективно [63].

У больных нейрофиброматозом и синдромом Нунан наблюдается нарушение регуляции проведения внутриклеточного сигнала по Ras/MAPK-пути и существенно увеличивается риск развития ЮММЛ. Практически во всех случаях ЮММЛ выявляется соматическая или герминальная мутация *RAS* [64]. Были идентифицированы дополнительные мутации *SETBP1* и *JAK3*. Появление данных мутаций определяет неблагоприятный прогноз [65]. Тем не менее мутационный «ландшафт» ЮММЛ отличается от МПЗ взрослых. Мутации генов, регулирующих сплайсинг, и эпигенетические поломки не встречаются у детей [66]. Отличительной особенностью ЮММЛ является высокая чувствительность к GM-CSF *in vitro* [67].

АллоТКМ остается основным методом лечения ЮММЛ, обеспечивая 5-летнюю бессобытийную выживаемость 52 %. Частота возникновения рецидивов составляет 50 % [68]. Проводятся клинические исследования по разработке таргетных препаратов. Ингибиторы FTIs и *RAS* обладают неприемлемой токсичностью и слабой эффективностью. Ингибиторы MEK (траметиниб) и SRC находятся в стадии разработки, проходят клинические исследования по оценке эффективности ингибиторов *JAK2* и гипометилирующих агентов [69–71].

Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом

В классификации ВОЗ 2001 г. РАКСТ отнесена в группу МДС/МПЗ, так как пациенты имели признаки рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами, тромбоцитоз, морфологические признаки эссенциальной тромбоцитемии [72]. К моменту пересмотра классификации ВОЗ в 2008 г. несколько сообщений указывали на выявление мутаций *JAK2V617F* и *MPLW515* при РАКСТ, что является признаком МПЗ. Тем не менее РАКСТ характеризуется плохой способностью образовывать гемопоэтические колонии *in vitro*, что характерно для МДС [37]. Дифференциальная диагностика РАКСТ и рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами с умеренным тромбоцитозом стала сложна после пересмотра классификации ВОЗ в 2008 г., когда был снижен диагностический уровень тромбоцитов для РАКСТ и эссенциальной тромбоцитемии с $600 \times 10^9/\text{л}$ до $450 \times 10^9/\text{л}$. Мутация гена *SF3B1* (60–80 % случаев) приводит к развитию перегрузки железом митохондрий сидеробластов, неэффективному эритропоэзу и анемии (признаки МДС), в то время как мутации *JAK2* или *MPL* вызывают тромбоцитоз (признаки МПЗ) [38].

Как и в случае других болезней из группы МДС/МПЗ, нет однозначного решения относительно оптимальной тактики лечения. Поскольку риск тромботических осложнений при РАКСТ низкий, нет никаких рекомендаций по проведению циторедуктивной терапии или профилактики антиагрегантами. В литературе есть описания отдельных наблюдений о достижении частичной ремиссии на фоне терапии иматинибом или леналидомидом [73]. В рамках клинических исследований возможно проведение терапии ингибиторами *JAK2*.

Миелодиспластические/миелопрлиферативные заболевания неклассифицированные

МДС/МПЗн представляют собой наиболее неоднородную подгруппу заболеваний и включают пациентов, которые не соответствуют диагностическим критериям для других подтипов МДС/МПЗ. МДС/МПЗн составляют менее 5 % от всех МПЗ.

В настоящее время исследование, проведенное в клинике MD Anderson Cancer Center с включением 85 пациентов с МДС/МПЗн, позволило определить основные характеристики заболевания [74]: средний возраст больных 71 год, соотношение мужчины:женщины около 2:1, спленомегалия, нормальное количество моноцитов, *JAK2V617F* в 20–30 % наблюдений, трисомия 8 в 15 % случаев. Медиана общей выживаемости равна 12,4 мес.

Согласно прогностической шкале IPSS 68 % больных отнесены в группу низкого риска несмотря на плохую общую выживаемость, что свидетельствует о необходимости проведения клинических исследований [43].

В настоящее время не существует оптимальных рекомендаций для лечения больных МДС/МПЗн,

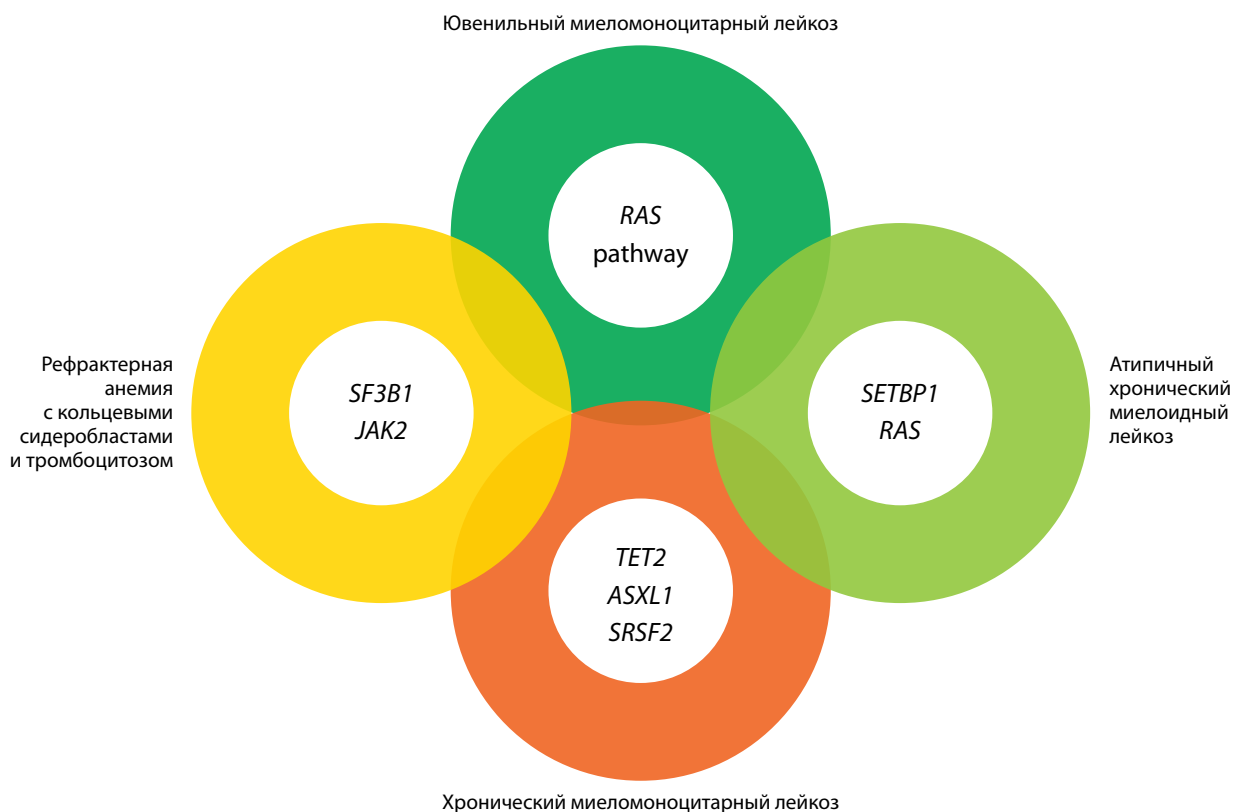


Рис. 5. Молекулярная характеристика заболеваний из группы миелодиспластических/миелопролиферативных

которые не являются кандидатами для аллоТКМ. Общая выживаемость при проведении терапии гипометилирующими агентами по сравнению с наилучшей доступной терапией (интерферон α , циклоспорин, талидомид, леналидомид, антитимоцитарный глобулин) составила 16,4 мес против 11,5 мес [74].

Заключение

Группа МДС/МПЗ включает ряд нозологических форм. Современные исследования показывают значительную генетическую гетерогенность МДС/МПЗ. Были идентифицированы более 30 соматических мутаций генов, в отдельных случаях у одного пациента может быть до 20 мутаций. Мутации генов *TET2*, *ASXL1* и *SRSF2* встречаются наиболее часто (рис. 5) [11].

Важно отметить, что в настоящее время не существует каких-либо конкретных мутаций, которые определяют фенотипические особенности заболевания в данной группе, за исключением *SF3B1* и *JAK2*

у больных РАКСТ и *SETBP1* у больных аХМЛ. Понимание патогенеза является основой для разработки надежной молекулярной классификации МДС/МПЗ.

Не существует консенсуса в лечении пациентов с МДС/МПЗ. Единственным потенциально излечивающим методом терапии является аллоТКМ, которая, однако, возможна не во всех случаях. В последние годы на основе изучения патогенеза данной патологии разрабатывается большое количество лекарственных препаратов, часть из которых найдет свое место в ее лечении.

Важным шагом на пути понимания патогенеза, улучшения диагностики, разработки прогностических моделей, определения оптимальной тактики лечения является создание международных регистров для этих редких гематологических злокачественных новообразований.

Финансирование. Работа поддержана грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых № 14.W01.15.6293-МК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Абдулкадыров К.М. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эс-

сенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). Гематология и трансфузиология 2014;59(4):31–56. [Melikyan A.L., Turkina A.G., Abdulkadyrov K.M. et al. Clinical guidelines for the diagnosis

and treatment of Ph-negative myeloproliferative disorders (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis). Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and

- Transfusiology 2014;59(4):31–56. (In Russ.).
2. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. World Health Organization Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th edn. Lyon: IARC Press, 2008. Pp. 32–7.
 3. Orazi A., Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 2008;22(7):1308–19. DOI: 10.1038/leu.2008.119. PMID: 18480833.
 4. Hebeda K.M., Fend F. Changed concepts and definitions of myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic syndromes (MDS) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in the updated 2008 WHO classification. *J Hematop* 2009;2(4):205–10. DOI: 10.1007/s12308-009-0048-6. PMID: 20309429.
 5. Tiu R.V., Gondek L.P., O’Keefe C.L. et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 2011;117(17):4552–60. DOI: 10.1182/blood-2010-07-295857. PMID: 21285439.
 6. Delhommeau F., Pisani D.F., James C. et al. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(24):2939–53. DOI: 10.1007/s00018-006-6272-7. PMID: 17131059.
 7. Steensma D.P., Dewald G.W., Lasho T.L. et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106(4):1207–9. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1183. PMID: 15860661.
 8. Cools J., DeAngelo D. J., Gotlib J. et al. A tyrosine kinase created by fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* genes is a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003;348(13):1201–14. DOI: 10.1056/NEJMoa025217. PMID: 12660384.
 9. Chase A., Bryant C., Score J., Cross N.C. Ponatinib as targeted therapy for FGR1 fusions associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Haematologica* 2003;98(1):103–6. DOI: 10.3324/haematol.2012.066407. PMID: 22875613.
 10. Lierman E., Selleslag D., Smits S. et al. Ruxolitinib inhibits transforming JAK2 fusion proteins *in vitro* and induces complete remission in t(8;9)(p22;p24)/PCM1-JAK2-positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2012;120(7):1529–31. DOI: 10.1182/blood-2012-06-433821. PMID: 22899477.
 11. Kohlmann A., Grossmann V., Haferlach T. Integration of next-generation sequencing into clinical practice: are we there yet? *Semin Oncol* 2012;39(1):26–36. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2011.11.008. PMID: 22289489.
 12. Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478(7367):64–9. DOI: 10.1038/nature10496. PMID: 21909114.
 13. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелолипролиферативных заболеваний. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):314–25. [Melikyan A.L., Subortseva I.N. Biology of myeloproliferative malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Oncohematology* 2016;9(3):314–25. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-314-325.
 14. Flotho C., Steinemann D., Mullighan C.G. et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis in juvenile myelomonocytic leukemia identifies uniparental disomy surrounding the NF1 locus in cases associated with neurofibromatosis but not in cases with mutant RAS or PTPN11. *Oncogene* 2007;26(39):5816–21. DOI: 10.1038/sj.onc.1210361. PMID: 17353900.
 15. Wang J., Liu Y., Li Z. et al. Endogenous oncogenic Nras mutation promotes aberrant GM-CSF signaling in granulocytic/monocytic precursors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2010;116(26):5991–6002. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281527. PMID: 20921338.
 16. Sattler M., Durstain M.A., Frank D.A. et al. The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol* 1995;23(9):1040–8. PMID: 7543416.
 17. Klinakis A., Lobry C., Abdel-Wahab O. et al. A novel tumor-suppressor function for Notch pathway in myeloid leukemia. *Nature* 2011;473(7346):230–3. DOI: 10.1038/nature09999. PMID: 21562564.
 18. Shih A.H., Abdel-Wahab O., Patel J.P., Levine R.L. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12(9):599–612. DOI: 10.1038/nrc3343. PMID: 22898539.
 19. Makishima H., Visconte V., Sakaguchi H. et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 2012;119(14):3203–10. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399774. PMID: 22323480.
 20. Abdel-Wahab O., Mullally A., Hedvat C. et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009;114(1):144–7. DOI: 10.1182/blood-2009-03-210039. PMID: 19420352.
 21. Pandit S., Zhou Y., Shiue L. et al. Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Mol Cell* 2013;50(2):223–35. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.03.001. PMID: 23562324.
 22. Kar S.A., Jankowska A., Makishima H. et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98(1):107–13. DOI: 10.3324/haematol.2012.064048. PMID: 22773603.
 23. Visconte V., Makishima H., Jankowska A. et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ringed sideroblasts. *Leukemia* 2012;26(3):542–5. DOI: 10.1038/leu.2011.232. PMID: 21886174.
 24. Hirabayashi S., Flotho C., Moetter J. et al. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. *Blood* 2012;119(11):e96–9. DOI: 10.1182/blood-2011-12-395087. PMID: 22238327.
 25. Piazza R., Valletta S., Winkelmann N. et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2013;45(1):18–24. DOI: 10.1038/ng.2495. PMID: 23222956.
 26. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542. PMID: 24325359.
 27. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Материалы 56-го конгресса Американского гематологического общества (декабрь 2014 г., Сан-Франциско). *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2015;8(2):201–32. [Melikyan A.L., Subortseva I.N. Proceedings of the 56th Congress of the American Society of Hematology (December 2014, San Francisco). *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental’nye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice* 2015;8(2):201–32. (In Russ.)].
 28. Emanuel P.D. Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2008;22(7):1335–42. DOI: 10.1038/leu.2008.162. PMID: 18548091.
 29. Rollison D.E., Howlader N., Smith M.T. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 2008;112(1):45–52. DOI: 10.1182/blood-2008-01-134858. PMID: 18443215.
 30. Patnaik M.M., Parikh S.A., Hanson C.A., Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *Br J Haematol* 2014;

- 165(3):273–86. DOI: 10.1111/bjh.12756. PMID: 24467717.
31. Boiocchi L., Espinal-Witter R., Geyer J.T. et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol* 2013;26(2):204–12. DOI: 10.1038/modpathol.2012. PMID: 23018876.
32. Itzykson R., Kosmider O., Renneville A. et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 2013;121(12):2186–98. DOI: 10.1182/blood-2012-06-440347. PMID: 23319568.
33. Itzykson R., Kosmider O., Renneville A. et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2428–36. DOI: 10.1200/JCO.2012.47.3314. PMID: 23690417.
34. Schuler E., Schroeder M., Neukirchen J. et al. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leuk Res* 2014;38(12):1413–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.09.003. PMID: 25444076.
35. Padron E., Painter J.A., Kunigal S. et al. GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(25):5068–77. DOI: 10.1182/blood-2012-10-460170. PMID: 23632888.
36. Itzykson R., Solary E. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27(7):1441–50. DOI: 10.1038/leu.2013.100. PMID: 23558522.
37. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937–51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262. PMID: 19357394.
38. Onida F., Kantarjian H.M., Smith T.L. et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002;99(3):840–9. DOI: 10.1182/blood.V99.3.840. PMID: 11806985.
39. Worsley A., Oscier D.G., Stevens J. et al. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. *Br J Haematol* 1988;68(1):17–21. PMID: 3422815.
40. Gonzalez-Medina I., Bueno J., Torrequebrada A. et al. Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leuk Res* 2002;26(9):821–4. DOI: 10.1016/S0145-2126(02)00021-8. PMID: 12127557.
41. Germing U., Kundgen A., Gattermann N. Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leuk Lymphoma* 2004;45(7):1311–8. DOI: 10.1080/1042819042000207271. PMID: 15359628.
42. Such E., Cervera J., Costa D. et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96(3):375–83. DOI: 10.3324/haematol.2010.030957. PMID: 21109693.
43. Kantarjian H., O'Brien S., Ravandi F. et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 2008;113(6):1351–61. DOI: 10.1002/cncr.23697. PMID: 18618511.
44. Such E., Germing U., Malcovati L. et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(15):3005–15. DOI: 10.1182/blood-2012-08-452938. PMID: 23372164.
45. Laborde R.R., Patnaik M.M., Lasho T.L. et al. SETBP1 mutations in 415 patients with primary myelofibrosis or chronic myelomonocytic leukemia: independent prognostic impact in CMML. *Leukemia* 2013;27(10):2100–2. DOI: 10.1038/leu.2013.97. PMID: 23558523.
46. Park S., Labopin M., Yakoub-Agha I. et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Eur J Haematol* 2013;90(5):355–64. DOI: 10.1111/ejh.12073. PMID: 23320648.
47. Eissa H., Gooley T.A., Sorror M.L. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: relapse-free survival is determined by karyotype and co-morbidities. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(6):908–15. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.09.018. PMID: 20932924.
48. Gonsalves W., Gangat N., Gupta V. et al. The role of induction chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukemia who have undergone leukemia transformation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:S151–64; abstr 216.
49. Wong E., Seymour J., Kenealy M. et al. Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with azacitidine. *Leuk Lymphoma* 2013;54(4):878–80. DOI: 10.3109/10428194.2012.730615. PMID: 22988826.
50. Ades L., Sekeres M.A., Wolffromm A. et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leuk Res* 2013;37(6):609–13. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.01.004. PMID: 23415110.
51. Fend F., Horn T., Koch I. et al. Atypical chronic myeloid leukemia as defined in the WHO classification is a JAK2 V617F negative neoplasm. *Leuk Res* 2008;32(12):1931–5. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.04.024. PMID: 18555525.
52. Hernandez J.M., del Canizo M.C., Cuneo A. et al. Clinical, hematological, cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Ann Oncol* 2000;11(4):441–4. PMID: 10847463.
53. Wang S.A., Hasserjian R.P., Fox P.S. et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(17):2645–51. DOI: 10.1182/blood-2014-02-553800. PMID: 24627528.
54. Trimarchi T., Ntziachristos P., Aifantis I. A new player SETs in myeloid malignancy. *Nat Genet* 2013;45(8):846–7. DOI: 10.1038/ng.2709. PMID: 23892662.
55. Belleso M., Santucci R., Dias D.F. et al. Atypical chronic myeloid leukemia with t(9;22)(p24.11.2), a BCR-JAK2 fusion gene. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(3):218–9. DOI: 10.5581/1516-8484.20130044. PMID: 23904814.
56. Murayama H., Matsushita H., Ando K. Atypical chronic myeloid leukemia harboring NUP98-HOXA9. *Int J Hematol* 2013;98(2):143–4. DOI: 10.1007/s12185-013-1381-1. PMID: 23754767.
57. Gambacorti-Passerini C., Donadoni C., Parmiani A. et al. Recurrent ETNK1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Blood* 2015;125(3):499–503. DOI: 10.1182/blood-2014-06-579466. PMID: 25343957.
58. Gotlib J., Maxson J.E., George T.I., Tyner J.W. The new genetics of chronic neutrophilic leukemia and atypical CML: implications for diagnosis and treatment. *Blood* 2013;122(10):1707–11. DOI: 10.1182/blood-2013-05-500959. PMID: 23896413.
59. Maxson J.E., Gotlib J., Pollea D.A. et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013;368(19):1781–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1214514. PMID: 23656643.
60. Plo I., Zhang Y., Le Couédic J.P. et al. An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med* 2009;206(8):1701–7. DOI: 10.1084/jem.20090693. PMID: 19620628.
61. Tefferi A., Thiele J., Vannucchi A.M., Barbui T. An overview of CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28(7):1407–13. DOI: 10.1038/leu.2014.35. PMID: 24441292.
62. Passmore S.J., Chessells J.M., Kempki H. et al. Paediatric myelodysplastic

- syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. *Br J Haematol* 2003;121(5):758–67. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04361.x. PMID: 12780790.
63. Bader-Meunier B., Tchernia G., Mielot F. et al. Occurrence of myeloproliferative disorder in patients with Noonan syndrome. *J Pediatr* 1997;130(6):885–9. DOI: 10.1016/S0022-3476(97)70273-7. PMID: 9202609.
64. Matsuda K., Shimada A., Yoshida N. et al. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood* 2007;109(12):5477–80. DOI: 10.1182/blood-2006-09-046649. PMID: 17332249.
65. Makishima H., Yoshida K., Nguyen N. et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet* 2013;45(8):942–6. DOI: 10.1038/ng.2696. PMID: 23832012.
66. Perez B., Kosmider O., Cassinat B. et al. Genetic typing of CBL, ASXL1, RUNX1, TET2 and JAK2 in juvenile myelomonocytic leukaemia reveals a genetic profile distinct from chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010;151(5):460–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08393.x. PMID: 20955399.
67. Emanuel P.D., Bates L.J., Castleberry R.P. et al. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 1991;77(5):925–9. PMID: 1704804.
68. Woods W.G., Barnard D.R., Alonzo T.A. et al. Prospective study of 90 children requiring treatment for juvenile myelomonocytic leukemia or myelodysplastic syndrome: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 2002;20(2):434–40. DOI: 10.1200/jco.2002.20.2.434. PMID: 11786571.
69. Bunda S., Kang M.W., Sybingco S.S. et al. Inhibition of SRC corrects GM-SCF hypersensitivity that underlies juvenile myelomonocytic leukemia. *Cancer Res* 2013;73(8):2540–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3425. PMID: 23400592.
70. Kong G., Wunderlich M., Yang D. et al. Combined MEK and JAK inhibition abrogates murine myeloproliferative neoplasm. *J Clin Invest* 2014;124(6):2762–73. DOI: 10.1172/JCI74182. PMID: 24812670.
71. Furlan I., Balz C., Flotho C. et al. Intriguing response to azacitidine in a patient with myelomonocytic leukemia and monosomy 7. *Blood* 2009;113(12):2867–8. DOI: 10.1182/blood-2008-12-195693. PMID: 19299654.
72. Wardrop D., Steensma D.P. Is refractory anaemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) a necessary or useful diagnostic category? *Br J Haematol* 2008;144(6):809–17. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07526.x. PMID: 19120370.
73. Szpurka H., Tiu R., Murugesan G. et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006;108(7):2173–81. DOI: 10.1182/blood-2006-02-005751. PMID: 16741247.
74. DiNardo C.D., Daver N., Jain N. et al. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy. *Leukemia* 2014;28(4):958–61. DOI: 10.1038/leu.2014.8. PMID: 24492324.

Роль позитронно-эмиссионной томографии в прогнозировании результатов аутологичной трансплантации стволовых клеток у пациентов с неходжкинскими лимфомами

В.Г. Потапенко^{1,2}, Н.Б. Михайлова¹, Б.И. Смирнов³, И.А. Скороход², Д.А. Чагинская², В.В. Рябчикова², И.А. Самородова², Э.И. Подольцева², В.В. Ипатов⁴, И.В. Бойков⁴, В.Н. Семелев⁴, Д.А. Горностаев⁴, Т.Г. Потапенко⁵, Т.Г. Кулибаба⁵, Н.В. Медведева², Б.В. Афанасьев¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²Санкт-Петербургский городской центр онкогематологии на базе СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»; Россия, 197110 Санкт-Петербург, проспект Динамо, 3;

³ФГАУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»; Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5;

⁴ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России; Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6;

⁵ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9

Контакты: Всеволод Геннадьевич Потапенко potapenko.vsevolod@mail.ru

Цель исследования — сравнение прогностической ценности позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с другими факторами прогноза эффективности высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК) у пациентов с неходжкинскими лимфомами.

Материалы и методы. Проанализированы данные 49 пациентов, получавших лечение в период с октября 2007 г. по ноябрь 2015 г. Медиана возраста составила 36,2 года (7–60 лет), медиана времени наблюдения — 24 мес (1–82 мес). Исследованы значимости: пола, ответа на первичное лечение, скорости развития рецидива, варианта химиотерапии 2-й линии, В-симптомов, конгломератов более 5 см (в рецидиве и непосредственно перед ВДХТ), уровня альбумина и активности лактатдегидрогеназы крови, компьютерно-томографического (КТ) ответа, общего количества линий химиотерапии, режима кондиционирования перед АТГСК, метаболической активности опухоли до ВДХТ (ПЭТ1, n = 49) и после АТГСК (ПЭТ2, n = 39).

Результаты. Общая и бессобытийная 2-летняя выживаемость составила 74,4 и 79,1 % соответственно. Худший прогноз оказался у пациентов с прогрессированием лимфомы по данным КТ на момент начала ВДХТ. ПЭТ-статус лимфомы показал прогностическое значение при достижении полного или частичного КТ-ответа. Общая 2-летняя выживаемость пациентов с ПЭТ1-негативным и ПЭТ1-позитивным статусом составила 95,4 и 71,0 % соответственно (p = 0,019); больных с ПЭТ2-позитивным и ПЭТ2-негативным статусом — 59,8 и 100 % соответственно (p = 0,001). Бессобытийная 2-летняя выживаемость в группах с ПЭТ2-позитивным и ПЭТ2-негативным статусом составила 54,4 и 94,4 % соответственно (p = 0,02). При сочетанном анализе ПЭТ1 и ПЭТ2 показано, что прогностическое значение ПЭТ2 полностью нивелировало значение ПЭТ1. При многофакторном анализе только ПЭТ1-статус оказался значимым в прогнозировании общей выживаемости.

Выводы. Химиочувствительность опухоли, оцененная с помощью КТ, является самым важным фактором прогноза. При достижении полного или частичного КТ-ответа ПЭТ-негативность до или после ВДХТ/АТГСК является благоприятным прогностическим фактором. Наихудший прогноз имеют пациенты с метаболической активностью опухоли до и после ВДХТ/АТГСК.

Ключевые слова: позитронно-эмиссионная томография, лимфома, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, высокодозная химиотерапия

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-18-24

Prognostic significance of positron emission tomography in autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma

V.G. Potapenko^{1,2}, N.B. Mikhaylova¹, B.I. Smirnov³, I.A. Skorokhod², D.A. Chaginskaya², V.V. Ryabchikova², I.A. Samorodova², E.I. Podol'tseva², V.V. Ipatov⁴, I.V. Boykov⁴, V.N. Semelev⁴, D.A. Gornostaev⁴, T.G. Potapenko⁵, T.G. Kulibaba⁵, N.V. Medvedeva², B.V. Afanas'ev¹

¹I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

²Saint Petersburg City Oncohematological Center based on City Clinical Hospital No 31; 3 Dinamo Prospekt, Saint Petersburg 197110, Russia;

³V.I. Ul'yanov (Lenin) Saint Petersburg State Electrotechnical University "LETI"; 5 Professora Popova St., Saint Petersburg 197376, Russia;

⁴S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of Russia; 6 Akademika Lebedeva St., Saint Petersburg 194044, Russia;

⁵Saint Petersburg State University; 7–9 Universitetskaya Naberezhnaya, Saint Petersburg 199034, Russia

Objective: evaluation and comparison of positron emission tomography (PET) prognostic value with other predictors of effectiveness in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) receiving high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation (AH SCT).

Materials and methods. The retrospective data on 49 consecutive patients with NHL receiving high-dose chemotherapy with AH SCT was analyzed. The median age was 36.2 (7–60) years. Median follow-up is currently 24 (1–82) months. Prognostic factors analyzed included sex, response to the initial chemotherapy, time to relapse, second-line chemotherapy regimen type, B-symptoms on relapse, serum lactate dehydrogenase and albumin levels, response assessed by computer tomography (CT), number of chemotherapy lines, condition regimen, PET-scan results before (PET1, n = 49) and after (PET2, n = 39) AH SCT.

Results. Two-year overall and event-free survivals were 74.4 and 79.1 %, respectively. Patients with CT-confirmed progression prior to AH SCT had the worse prognosis. Prognostic significance of PET-status was shown in chemosensitive patients (partial/complete response). The overall survival in PET1-negative and PET1-positive patients were 95.4 vs 71.0 % ($p = 0.019$), respectively. In PET2-positive and PET2-negative patients the overall and event-free survivals were 59.8 vs 100 % ($p = 0.001$) and 54.4 vs 94.4 % ($p = 0.02$), respectively. In combined analysis of PET1 and PET2 statuses prognostic significance of PET2 prevailed over PET1 results significance. The multivariate analysis confirmed only PET1 significance for survival prediction.

Conclusion. Chemosensitivity of the tumor, assessed by CT, is the most important prognostic factor. In chemosensitive patients achievement PET1 or PET2 negativity means better prognosis. The patients with PET positivity prior and after AH SCT have the worst prognosis.

Key words: positron emission tomography, lymphoma, autologous hematopoietic stem cell transplantation, high-dose chemotherapy

Введение

Высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ВДХТ/АТГСК) проводится пациентам с химиорезистентными или рецидивными формами лимфом. Эффективность такого лечения достигает 72 % [1, 2]. Важнейшим фактором успеха является ответ опухоли на лечение, который можно описать с помощью рентгеновской компьютерной томографии (КТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

ПЭТ в качестве нового метода диагностики стала широко применяться с начала 2000-х годов. Она позволяет более точно определять стадию болезни и оценивать эффект лечения [3, 4]. Применению ПЭТ в ВДХТ/АТГСК у пациентов с разными типами лимфом посвящено довольно много работ, авторы которых утверждают, что по значимости ПЭТ превосходит традиционные факторы прогноза. В большинстве исследований число пациентов небольшое, отсутствует рандомизация, применяются разные технологии оценки опухолевого метаболизма, поэтому их данные часто

противоречивы. Результаты 4 наиболее крупных работ приведены в табл. 1.

В большинстве исследований показана важность ПЭТ-статуса перед ВДХТ в отношении как общей, так и бессобытийной выживаемости у пациентов с неходжкинскими лимфомами [5–16].

Цель нашего исследования — сравнить по значимости ПЭТ до и после ВДХТ/АТГСК с традиционными факторами прогноза.

Материалы и методы

Проанализированы ретроспективные данные 49 пациентов с разными типами неходжкинских лимфом. Диагнозы были установлены на основании критериев Всемирной организации здравоохранения [17]. ВДХТ/АТГСК проводилась в Первом СПбГМУ им И.П. Павлова, Санкт-Петербургской ГКБ № 31 и ВМА им. С.М. Кирова в период с 2008 по 2015 г. Медиана возраста пациентов составила 36,2 года (7–60 лет).

Химиорезистентностью считали недостижение частичной ремиссии или раннее прогрессирование в период

Таблица 1. Значение ПЭТ-статуса перед высокодозной химиотерапией с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в прогнозировании выживаемости у пациентов с лимфомами

Автор	Число пациентов	Тип анализа	Диагноз	Терапия «спасения»	Режим кондиционирования	Медиана периода наблюдения, мес	Общая выживаемость, ПЭТ ⁻ /ПЭТ ⁺ , %	Бессобытийная выживаемость, ПЭТ ⁻ /ПЭТ ⁺ , %
Bondly C. и соавт., 2006 [15]	100	Проспективный	НХЛ	НУ	BEAM/ Zevalin BEAM	11,8	77/61 (1 год; $p = 0,08$)	66/34 (1 год; $p = 0,007$)
Schot B.W. и соавт., 2007 [6]	78	Проспективный	ЛХ/НХЛ	DHAP-VIM-DHAP (ритуксимаб для НХЛ), miniBEAM	BEAM	24,0	НУ	72/29 (2 года; $p < 0,001$)
Alousi A.M. и соавт., 2008 [14]	174	Ретроспективный	НХЛ	НУ	НУ	66,0	Влияние не доказано	55/20 ($p < 0,001$)
Sauter C.S. и соавт., 2015 [12]	129	Ретроспективный	ДККЛ	DHAP/EPOCH/ICE	НУ	43,6	86/54 (3 года; $p < 0,001$)	77/49 (3 года; $p < 0,001$)

Примечание. ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография; ЛХ — лимфома Ходжкина; НХЛ — неходжкинская лимфома; ДККЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома; НУ — не указано; ПЭТ⁻/ПЭТ⁺ — ПЭТ-негативный/ПЭТ-позитивный статус.

менее 3 мес после окончания химиотерапии; рецидивом — появление опухолевого очага в период более 3 мес после достижения полного ответа.

Всем пациентам перед началом и после окончания первичной химиотерапии, перед сменой лечения и перед ВДХТ/АТГСК была выполнена КТ грудной клетки, органов брюшной полости, малого таза, а при наличии шейной лимфаденопатии — также шеи.

ПЭТ-исследование (от мочки уха до средней трети бедра) проводили дважды: не менее чем через 3 нед после окончания химиотерапии перед ВДХТ/АТГСК (ПЭТ1) и в течение 3 мес после ВДХТ/АТГСК (ПЭТ2). ПЭТ-позитивность определена как фиксация радиофармпрепарата вне мест физиологического накопления.

Исследования уровней альбумина и активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) входили в стандартный биохимический скрининг пациентов перед ВДХТ/АТГСК.

Ответ на лечение оценивали в соответствии с критериями Cheson, включающими ПЭТ [18].

ВДХТ/АТГСК проводилась по показаниям: рецидив, преодоление химиорезистентности у пациентов, не достигших частичного ответа после первичной химиотерапии. При агрессивных типах лимфом с плохим прогнозом (лимфома Беркитта, Т-лимфобластная лимфома, первично-медиастинальная лимфома с факторами риска раннего прогрессирования, анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфома зоны мантии, ангиоиммунобластная лимфома) ВДХТ/АТГСК выполнялась для консолидации 1-й или частичной ремиссии.

Линия терапии рассматривалась как потребность в смене курса лечения при его неэффективности и при наличии показаний к лечению.

В качестве терапии 2-й линии использовали разные схемы химиотерапии с включением высокодозных препаратов платины, метотрексата, этопозида (DHP, GemOx, Dexa-BEAM, ICE и др.) в соответствии с опубликованными протоколами.

Основные режимы кондиционирования включали BEAM и Bendamustine-EAM.

Общая характеристика пациентов представлена в табл. 2.

Таблица 2. Общая характеристика пациентов

Параметр	n	%
Пол:		
мужчины	25	51
женщины	24	49
Диагноз:		
диффузная В-крупноклеточная лимфома	16	33
первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома	13	26
лимфома мантийной зоны	8	16
лимфома Беркитта	2	4
лимфома неклассифицируемая, промежуточная между лимфомой Ходжкина и диффузной В-крупноклеточной	4	9
другие (фолликулярная 1–2-го цитологического типа, Т-лимфобластная, НК/Т-лимфома, Т-клеточная неутонченная, ангиоиммунобластная ALK-позитивная)	6	12

Первичная химиотерапия:		
CHOP и CHOP-подобные курсы (EPOCH, SCEPOCH, CHOP, COP) + ритуксимаб для CD20-позитивных лимфом	38	78
ABVD	2	4
HyperCVAD	2	4
другие (HOVON, RMA, OLL-2009, карбоплатин + лучевая терапия)	4	8
NHL-BFM	3	6
Ответ на первичную терапию:		
полная ремиссия	22	45
частичная ремиссия	11	22
стабилизация	9	18
прогрессирование	7	14
Показания к ВДХТ/АТГСК:		
ранний рецидив	6	12
поздний рецидив	5	10
первичная химиорезистентность	26	53
консолидация 1-й ремиссии	12	24
В-симптомы до начала терапии 2-й линии:		
были	3	6
не было	43	88
неизвестно	3	6
Конгломераты более 5 см в рецидиве:		
были	17	35
не было	21	43
неизвестно	11	22
Противорецидивная химиотерапия:		
DHP	14	28
ICE	10	20
другие (GfOx, интратекальные введения метотрексата, цитарабина, дексаметазона, MIV, ASD, NHL-BFM-04)	6	12
dexaBEAM	3	6
не проводилась	17	34
Уровень лактатдегидрогеназы крови:		
нормальный	33	67
повышенный	7	15
неизвестно	8	18
Уровень альбумина крови:		
нормальный	26	53
пониженный	7	14
неизвестно	16	33
Конгломераты более 5 см перед ВДХТ/АТГСК:		
были	10	20
не было	32	65
неизвестно	7	14
КТ-статус лимфомы перед ВДХТ/АТГСК:		
полный ответ	19	39
частичный ответ	20	40
стабилизация	3	6
прогрессирование	7	15
ПЭТ-статус лимфомы перед ВДХТ/АТГСК:		
позитивный	23	47
негативный	26	53
ПЭТ-статус лимфомы после ВДХТ/АТГСК:		
позитивный	14	29
негативный	25	51
неизвестно	10	20
Число линий химиотерапии:		
1	17	35
2	23	46
3	5	10
4	4	9
Режим кондиционирования:		
BEAM	25	51
Bendamustine-EAM	19	39
CBV	4	8
мелфалан в монорежиме	1	2

Примечание. ВДХТ/АТГСК — высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток; КТ — компьютерная томография; ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография

Статистический анализ. За общую выживаемость принят период от даты трансфузии стволовых клеток крови до последнего контакта или смерти по любой причине. За бессобытийную выживаемость принят период от даты трансфузии стволовых клеток крови до события (прогрессирование, тяжелая инфекция, критические проявления токсичности препаратов). Выживаемость рассчитывали по методу Каплана–Майера. В многофакторном регрессионном анализе Кокса использовали построение простых моделей пропорциональности риска. Модели получены как при варианте пошагового включения независимых переменных, так и способом исключения, при этом результаты одинаковы. Модели проверены на выполнение пропорциональности рисков, нарушений не обнаружено [19]. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости менее 5 % ($p < 0,05$). Для создания списка потенциальных предикторов многофакторной регрессии Кокса были выбраны следующие независимые переменные:

- пол;
- ответ на первичное лечение;
- длительность ремиссии;
- В-симптомы в рецидиве;
- конгломераты более 5 см в рецидиве и непосредственно перед ВДХТ/АТГСК;
- уровень альбумина перед ВДХТ/АТГСК;
- активность ЛДГ крови перед ВДХТ/АТГСК;
- КТ-ответ на лечение, оцененный перед ВДХТ/АТГСК;
- общее число линий химиотерапии;
- режим кондиционирования;
- ПЭТ-статус перед ВДХТ/АТГСК (ПЭТ1);
- ПЭТ-статус после ВДХТ/АТГСК (ПЭТ2).

Для выявления переменных, влияющих на выживаемость, были использованы метод Каплана–Майера и однофакторный вариант регрессии Кокса, а также описательные статистики пакета SPSS 19.

Результаты

Медиана периода наблюдения составила 24 мес (1–82 мес); 2-летняя общая и бессобытийная выживаемость – 76,4 и 72,5 % соответственно; летальность – 12,2 % ($n = 6$). Причины летальности: прогрессирование – 5 (83 %) случаев; не связанные с трансплантацией – 1 (17 %).

У всех пациентов было выполнено ПЭТ1-исследование, а ПЭТ2 по техническим причинам проведено только 39 больным. У 11 пациентов с ПЭТ1-свечением достигнута ПЭТ2-негативность (ПЭТ-2⁻).

Для оценки наблюдаемой выживаемости использовали тест Каплана–Майера. ПЭТ1 показала достоверное значение только в прогнозировании общей выживаемости. Общая 2-летняя выживаемость пациентов с ПЭТ-негативным (ПЭТ1⁻) и ПЭТ-позитивным (ПЭТ1⁺) статусами составила 95,4 и 71,0 % соответственно ($p = 0,019$) (рис. 1).

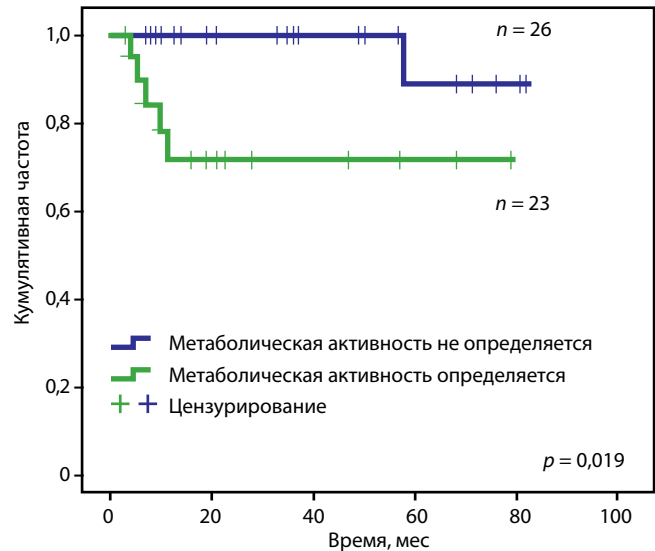


Рис. 1. Общая выживаемость пациентов в зависимости от статуса опухоли по данным позитронно-эмиссионной томографии перед высокодозной химиотерапией с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

Общая 2-летняя выживаемость пациентов с ПЭТ2⁺ и ПЭТ2⁻ статусами составила 59,8 и 100 % соответственно ($p = 0,001$); бессобытийная – 54,4 и 94,4 % соответственно ($p = 0,002$) (рис. 2, 3).

При сочетанном анализе ПЭТ1 и ПЭТ2 выявлены статистически значимые различия в общей выживаемости пациентов с ПЭТ1⁺ПЭТ2⁺ статусом по сравнению с ПЭТ1⁻ПЭТ2⁻ и ПЭТ1⁺ПЭТ2⁻. Ход кривых выживаемости пациентов с ПЭТ1⁻ или ПЭТ2⁻ повторяется (рис. 4, 5).

Наибольшее различие в выживаемости имеют группы пациентов ПЭТ1⁺ПЭТ2⁺ и ПЭТ1⁻ПЭТ2⁻. Статистически достоверных различий в общей выживаемости

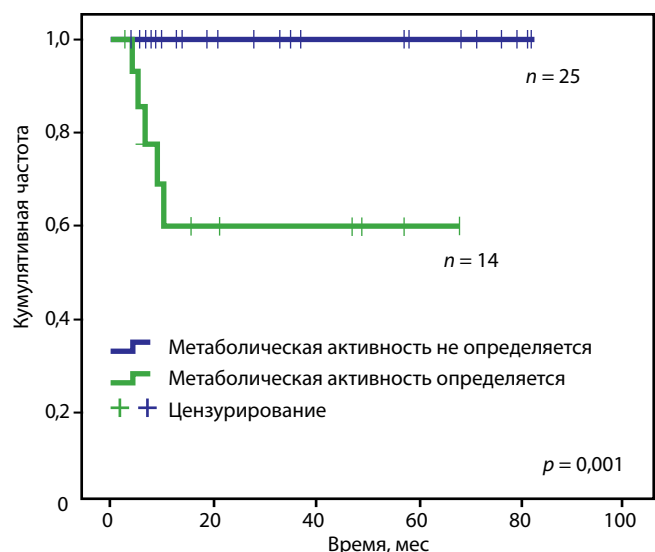


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов в зависимости от статуса опухоли по данным позитронно-эмиссионной томографии после высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

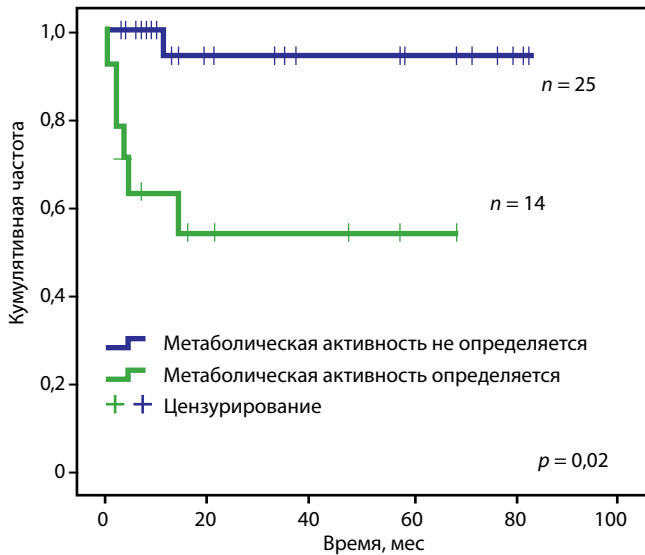


Рис. 3. Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от статуса опухоли по данным позитронно-эмиссионной томографии после высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

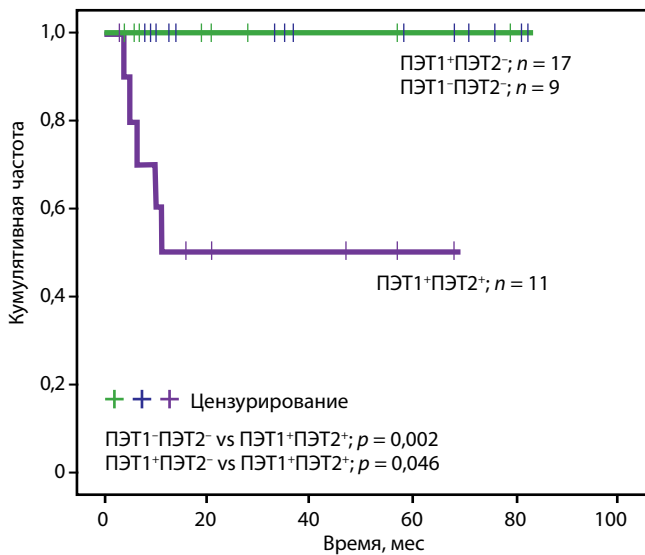


Рис. 4. Общая выживаемость пациентов в зависимости от статуса опухоли по данным позитронно-эмиссионной томографии перед высокодозной химиотерапией с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ПЭТ1) и после нее (ПЭТ2)

пациентов со статусами ПЭТ1+ПЭТ2- и ПЭТ-ПЭТ2- нет.

При анализе бессобытийной выживаемости выявлены статистически значимые различия в выживаемости при ПЭТ1-ПЭТ2- и ПЭТ1+ПЭТ2+ статусах. Других различий не обнаружено.

Результаты однофакторного Кокс-регрессионного анализа остальных маркеров прогноза представлены в табл. 3 и 4.

По данным многофакторного Кокс-регрессионного анализа с оценкой прогностической значимости маркеров, влияющих на общую выживаемость, наиболее

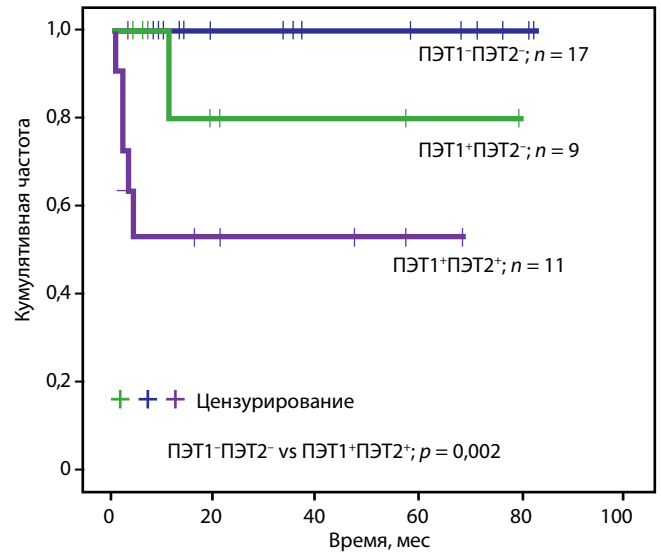


Рис. 5. Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от статуса опухоли по данным позитронно-эмиссионной томографии перед высокодозной химиотерапией с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ПЭТ1) и после нее (ПЭТ2)

важными оказались повышение активности ЛДГ в крови ($p = 0,009$) и ПЭТ1-статус ($p = 0,037$).

Значимым для прогноза бессобытийной выживаемости оказался только КТ-ответ перед ВДХТ/АТГСК ($p < 0,001$).

Обсуждение и выводы

Уменьшение опухолевой массы как объективный критерий химиочувствительности — залог успеха ВДХТ/АТГСК, поэтому ответ, оцененный методом КТ, как показало и наше исследование, остается главным фактором успешной ВДХТ/АТГСК. Значимость результатов ПЭТ оказалась второстепенной в связи с высоким риском ложного свечения. В то же время результаты ПЭТ до и после ВДХТ/АТГСК позволяют выделить группу пациентов с худшим прогнозом. При этом достижение ПЭТ-негативности, неважно — до или после ВДХТ/АТГСК, практически уравнивает шансы пациентов на излечение. При сравнении прогностического значения ПЭТ1 и ПЭТ2 оказалось, что значимость ПЭТ2 позволяет пренебречь данными ПЭТ1. Похожие результаты получены и в других исследованиях [16]. С учетом разнородности лимфом и небольшой медианы периода наблюдения (2 года) выявленное в многофакторном анализе влияние ПЭТ1 на общую (но не на бессобытийную) выживаемость, вероятнее всего, случайно и будет нивелировано по мере увеличения срока наблюдения.

Роль активности ЛДГ перед ВДХТ/АТГСК в прогнозе описана в отдельных работах [6], а в большей части уже в однофакторном анализе статистически достоверного влияния активности ЛДГ на выживаемость не выявляется [5, 11, 16]. В нашем исследовании, несмотря на небольшое число наблюдений, выявлено статистически достоверное снижение общей выживаемости

Таблица 3. Однофакторный Кокс-регрессионный анализ факторов прогноза бессобытийной выживаемости

Фактор	Отношение рисков	95 % доверительный интервал	Значимость	Число пациентов
ПЭТ2-позитивность	0,07	0,009–0,61	0,016	39
Недостижение ответа по данным компьютерной томографии	0,42	0,008–0,222	< 0,001	49

Примечание. ПЭТ2 – позитронно-эмиссионная томография после высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Таблица 4. Однофакторный Кокс-регрессионный анализ факторов прогноза общей выживаемости

Фактор	Отношение рисков	95 % доверительный интервал	Значимость	Число пациентов
Повышение активности лактатдегидрогеназы	0,12	0,02–0,76	0,024	40
Более 2 линий химиотерапии	0,18	0,03–0,9	0,037	49
ПЭТ1-позитивность	0,1	0,01–0,97	0,048	49

Примечание. ПЭТ1 – позитронно-эмиссионная томография до высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

при повышении активности ЛДГ. Наиболее вероятно, что это связано с преобладанием пациентов с диффузной В-крупноклеточной и первичной медиастинальной лимфомами, для которых повышение активности ЛДГ имеет прогностическое значение.

Потребность в смене режима химиотерапии косвенно говорит о химиорезистентности. В некоторых работах отмечено снижение выживаемости при необходимости перехода на другой вариант лечения (2-ю линию). По нашему наблюдению, прогноз пациентов с 3 и более линиями химиотерапии в анамнезе также ухудшался.

Пол, длительность 1-й ремиссии, уровень альбумина крови перед ВДХТ/АТГСК, объем опухолевой

массы, ответ на первичную химиотерапию, В-симптоматика в рецидиве по результатам Кокс-регрессионного анализа не показали статистически достоверного прогностического значения.

Наша работа продемонстрировала, что ПЭТ имеет перспективы для оценки химиочувствительности как один из главных критериев выбора лечения. Дальнейшие исследования желательно проводить на больших группах пациентов, по более стандартизированной методике оценки результатов ПЭТ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Жуков Н.В., Румянцев А.Г., Усс А.Л. и др. Эффективность и безопасность высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у больных с неблагоприятным течением лимфомы Ходжкина. Опыт трансплантационных центров России, Украины и республики Беларусь. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2014;13(1): 22–31. [Zhukov N.V., Rumyantsev A.G., Uss A.L. et al. Efficiency and safety of high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with an unfavorable Hodgkin's lymphoma. Experience of Russian, Ukrainian and Belarus transplantation centers. Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology, Oncology and Immunopathology in Pediatrics 2014;13(1):22–31 (In Russ.)].
2. Федоренко Д.А., Мельниченко В.Я., Ионов Т.И. и др. Клиническая оценка эффективности аутологичной трансплантации кроветворных стволовых клеток при лимфомах. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова 2013;8(4):62–5. [Fedorenko D.A., Mel'nicenko V.Ya., Ionova T.I. et al. Clinical evaluation of autologous hematopoietic stem cells transplantation in lymphomas. Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova = Bulletin of N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center 2013;8(4):62–5. (In Russ.)].
3. Barrington S.F., Mikhael N.G., Kostakoglu L. et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. J Clin Oncol 2014;32(27):3048–58. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.5229. PMID: 25113771.
4. Асланиди И.П., Мухортова О.В., Шурупова И.В. и др. Позитронно-эмиссионная томография: уточнение стадии болезни при злокачественных лимфомах. Клиническая онкогематология 2010;3(2):119–29. [Aslanidi I.P., Mukhortova O.V., Shurupova I.V. et al. Positron emission tomography: staging of malignant lymphomas. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2010;3(2):119–29. (In Russ.)].
5. Cremerius U., Fabry U., Wildberger J.E. et al. Pre-transplant positron emission

- tomography (PET) using fluorine-18-fluoro-deoxyglucose (FDG) predicts outcome in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002;30(2):103–11. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703607. PMID: 12132049.
6. Schot B.W., Zijlstra J.M., Sluiter W.J. et al. Early FDG-PET assessment in combination with clinical risk scores determines prognosis in recurring lymphoma. *Blood* 2007;109(2):486–91. DOI: 10.1182/blood-2005-11-006957. PMID: 17003382.
7. Spaepen K., Stroobants S., Dupont P. et al. Prognostic value of pretransplantation positron emission tomography using fluorine 18-fluorodeoxyglucose in patients with aggressive lymphoma treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Blood* 2003;102(1):53–9. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3842. PMID: 12609836.
8. Svoboda J., Andreadis C., Elstrom R. et al. Prognostic value of FDG-PET scan imaging in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38(3):211–6. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705416. PMID: 16770314.
9. Becherer A., Mitterbauer M., Jaeger U. et al. Positron emission tomography with [¹⁸F]2-fluoro-D-2-deoxyglucose (FDG-PET) predicts relapse of malignant lymphoma after high-dose therapy with stem cell transplantation. *Leukemia* 2002;16(2):260–7. DOI: 10.1038/sj.leu.2402342. PMID: 11840293.
10. Filmont J.E., Czernin J., Yap C. et al. Value of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography for predicting the clinical outcome of patients with aggressive lymphoma prior to and after autologous stem-cell transplantation. *Chest* 2003;124(2):608–13. PMID: 12907550.
11. Crocchiolo R., Canevari C., Assanelli A. et al. Pre-transplant ¹⁸FDG-PET predicts outcome in lymphoma patients treated with high-dose sequential chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2008;49(4):727–33. DOI: 10.1080/10428190701885545. PMID: 18398740.
12. Sauter C.S., Matasar M.J., Meikle J. et al. Prognostic value of FDG-PET prior to autologous stem cell transplantation for relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015;125(16):2579–81. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606939. PMID: 25758829.
13. Palmer J., Goggins T., Broadwater G. et al. Early post transplant (F-18)2-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography does not predict outcome for patients undergoing auto-SCT in non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(6):847–51. DOI: 10.1038/bmt.2010.203. PMID: 20856212.
14. Alousi A.M., Saliba R.M., Okoroji G.J. et al. Disease staging with positron emission tomography or gallium scanning and use of rituximab predict outcome for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2008;142(5):786–92. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07277.x. PMID: 18564354.
15. Bondly C., Johnston P.B., Lowe V. et al. Positive positron emission tomography (PET) pre-autologous stem cell transplant (ASCT) in non-Hodgkin lymphoma (NHL) does not preclude successful outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(2 Suppl 1):18–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.11.060.
16. Qiao W., Zhao J., Xing Y. et al. Predictive value of [¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for clinical outcome in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma prior to and after autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2014;55(2):276–82. DOI: 10.3109/10428194.2013.797974. PMID: 23617323.
17. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon: IARC, 2008.
18. Cheson B.D., Pfistner B., Juweid M.E. et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25(5):579–86. PMID: 17242396.
19. Kleinbaum D.G., Klein M. *Survival Analysis. A Self-Learning Text*. 2nd edn. Springer, 2002. 583 p.

Молекулярно-биологические характеристики ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы

Е.В. Чернышова, Д.С. Абрамов, Д.М. Коновалов, С.С. Ларин, Н.В. Мякова

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Дмитрий Сергеевич Абрамов abramovd_s@bk.ru

ALK-позитивная анапластическая крупноклеточная лимфома представляет гетерогенную группу зрелых Т-клеточных неходжкинских лимфом, которая характеризуется экспрессией CD30/Ki-1 и типичной транслокацией с вовлечением гена тирозинкиназы анапластической лимфомы. В последнее время большое внимание уделяют выявлению прогностических факторов течения данного заболевания. К ним относят клинические, гистологические и молекулярно-генетические особенности, связанные с активацией внутриклеточных сигнальных путей. В данном обзоре рассматриваются механизмы действия киназы анапластической лимфомы и возможные молекулярные мишени таргетной терапии.

Ключевые слова: ALK-позитивная анапластическая крупноклеточная лимфома, дети, киназа анапластической лимфомы, прогностические факторы, сигнальные пути, ингибиторы тирозинкиназ

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-25-31

Molecular biological characteristics of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma

E. V. Chernyshova, D. S. Abramov, D. M. Konovalov, S. S. Larin, N. V. Myakova

Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia

ALK-positive anaplastic large cell lymphoma is a heterogeneous group of mature T-cell non-Hodgkin lymphoma, and is characterized by CD30/Ki-1 expression. Recently, value of various prognostic factors is investigated. These include clinical, histological and molecular genetic changes associated with different signaling pathways activation. Some features of the mechanism of action of anaplastic lymphoma kinases and targeted therapies possibilities addressed in this review.

Key words: ALK-positive anaplastic large cell lymphoma, children, anaplastic lymphoma kinase, prognostic factors, signaling pathways, tyrosine kinase inhibitors

Введение

ALK-позитивная анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK⁺ АККЛ) представляет гетерогенную группу зрелых Т-клеточных неходжкинских лимфом с экспрессией CD30/Ki-1. ALK⁺ АККЛ впервые была выделена в самостоятельную нозологическую форму в конце 80-х годов прошлого столетия, когда в группе CD30-позитивных крупноклеточных анапластических лимфом была описана повторяющаяся транслокация t(2;5)(p23;q35) с последующей aberrантной экспрессией белка тирозинкиназы, названного впоследствии киназой анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK) [1]. В структуре детской заболеваемости неходжкинскими лимфомами частота данной патологии составляет около 10–20 %. Заболеванию подвержены дети и молодые люди до 30 лет, однако встречаются случаи дебюта у пациентов старше 60 лет [2, 3].

Клиническое течение ALK⁺ АККЛ характеризуется поражением лимфатических узлов и экстранодальным

вовлечением кожи, мягких тканей, костей, легких, печени, головного мозга. У большинства пациентов ALK⁺ АККЛ диагностируют на III–IV стадии с периферической и абдоминальной лимфаденопатией, поражением костного мозга [4].

Для ALK⁺ АККЛ отмечен благоприятный прогноз. Вместе с тем существует группа пациентов, рефрактерных к проводимой терапии, в 10–20 % случаев возникают рецидивы заболевания. Таким образом, актуальными являются поиск новых молекулярных мишеней для таргетной терапии и выявление маркеров прогноза течения данного заболевания.

Морфологические и клинические факторы прогноза течения ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы

Гистологическая картина ALK⁺ АККЛ разнообразна и согласно классификации Всемирной организации здравоохранения включает 2 морфологических типа — общий (common type; рис. 1) и редкий (non common

type; рис. 2), который, в свою очередь, представлен несколькими гистологическими вариантами (по частоте встречаемости): гистиоцитарный, мелкоклеточный, смешанноклеточный (в одной пораженной зоне сочетает несколько вариантов), гигантский (напоминающий лимфому Ходжкина), саркомоподобный [4–6].

Для опухолевых клеток характерна обязательная экспрессия антигенов ALK, CD30, белков цитотоксических гранул TIA-1, гранзимов В и/или перфоринов, в большинстве случаев эпителиального мембранного антигена ЕМА и вариабельная экспрессия Т-клеточных антигенов CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7 [7, 8]. В большинстве случаев при иммуногистохимическом исследовании на клетках опухоли не обнаруживают экспрессию пан-Т-клеточных маркеров [9].

Редкие гистологические варианты ALK⁺ АККЛ могут быть ассоциированы с худшим прогнозом течения заболевания. Так, в исследовании, охватившем 361 случай ALK⁺ АККЛ, были выделены 2 группы больных в зависимости от гистологической картины: пациенты с общим морфологическим типом (65 %) и пациенты с редким морфологическим типом опухоли, преимущественно лимфогистиоцитарным и мелкоклеточным вариантами, доля которых составила 32 %. Отмечено, что прогноз для больных с редким морфологическим типом статистически значимо хуже. Кроме того, данный морфологический тип ассоциирован с поражениями кожи и средостения. В группе пациентов с мелкоклеточным гистологическим вариантом ($n = 22$) соотношение риска рецидива лимфом оказалось в 4,7 раза выше по сравнению с общим морфологическим вариантом. Данное соотношение составляет 1,5 для группы из 9 больных с лимфогистиоцитарным вариантом [10].

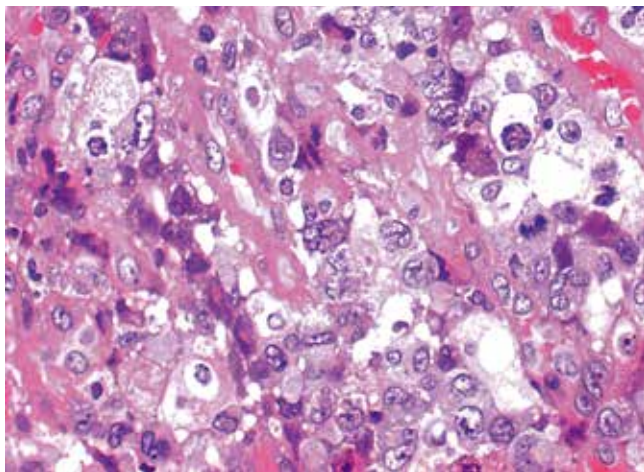


Рис. 1. ALK-позитивная анапластическая крупноклеточная лимфома (общий тип), окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$. Клетки опухоли крупного размера, формируют солидные поля, в лимфатическом узле распространяются интрасинусоидально и парафолликулярно. Элементы опухоли содержат обильную цитоплазму, крупное бобовидное или почковидное ядро, встречаются многоядерные клетки с расположением ядер в виде «венка» или «подковы». Клетки имеют высокую митотическую активность, большое количество атипичных фигур митозов

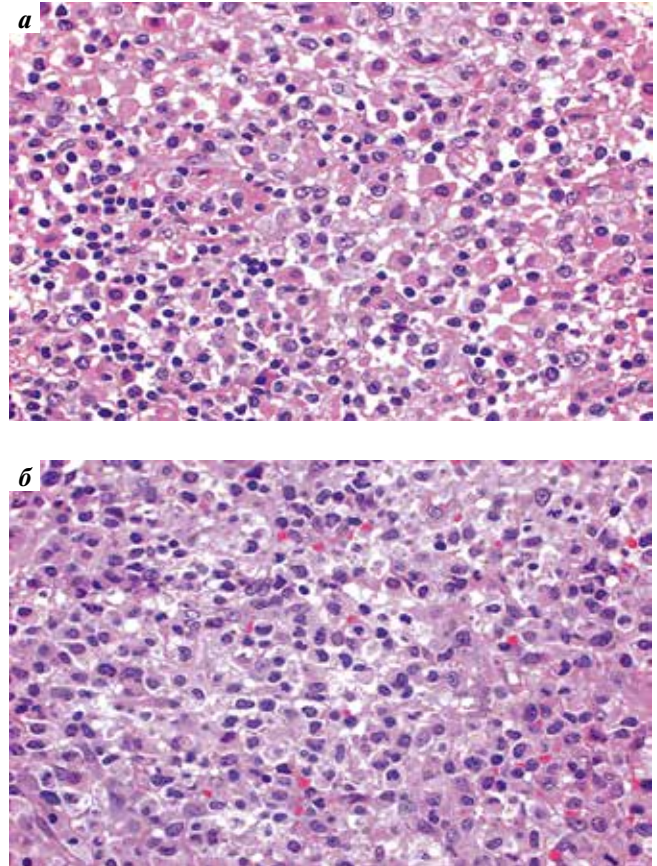


Рис. 2. ALK-позитивная анапластическая крупноклеточная лимфома (редкий тип), окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$: а — гистиоцитарный вариант, представляющий собой полиморфный опухолевый инфильтрат состоящий из разрозненных опухолевых клеток и примеси большого количества гистиоцитов; б — мелкоклеточный вариант, который имеет морфологическую схожесть с другими злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями, клетки опухоли расположены диффузно, размер клетки не превышает размер нормального лимфоцита, нет апоптотической активности, патологические митозы отсутствуют

К клиническим факторам, связанным с худшим прогнозом и высоким риском ранних рецидивов опухоли, относят поражение средостения, кожи, висцеральное вовлечение, увеличение концентрации лактатдегидрогеназы и появление В-симптомов [11–14].

Роль киназы анапластической лимфомы в патогенезе заболевания

В конце 80-х годов прошлого столетия несколькими исследовательскими группами была описана повторяющаяся транслокация $t(2;5)(p23;q35)$ в части CD30-позитивных АККЛ [1]. В 1994 г. был детектирован продукт, которым является рекомбинантный белок рецептора тирозинкиназы анапластической лимфомы (ALK) и нуклеофозмина [15]. В дальнейших исследованиях обнаружено более десятка партнеров транслокаций ALK (см. таблицу) [16–25].

Рекомбинантные белки ALK вовлечены в онкогенную трансформацию клеток и обнаружены при других онкологических заболеваниях. Аберрантная экспрессия

Транслокации с участием гена *ALK* [4, 7]

Транслокация	Белок-партнер	Частота, %	Рекомбинантный белок (кДа)	Экспрессия белка в клетке	Тип опухоли
t(2;5)(p23;q35)	NPM (нуклеофозмин)	70–80	NPM-ALK (80)	Ядро, ядрышки, цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ; ALK ⁺ ДКБКЛ
t(1;2)(q25;p23)	TPM3 (тропомиозин 3)	12–18	TPM3-ALK (104)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ; MBO
t(2;3)(p23;q21)	TRK-fused gene (TFG)	2	TFG-ALK (113, 97, 85)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ
inv (2)(p23;q35)	AT1C	2	AT1C-ALK (96)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ; MBO
t(2;17)(p23;q23)	CLTC1 (белок, подобный тяжелым цепям клатрина)	2	CLTC1-ALK (250)	Цитоплазматическая гранулярная	ALK ⁺ АККЛ; ALK ⁺ ДКБКЛ; MBO
t(2;X)(p23;q11–12)	MSN (моезин)	< 1	MSN-ALK (125)	Клеточная мембрана	ALK ⁺ АККЛ
t(2;19)(p23;p13)	TPM4 (тропомиозин 4)	< 1	TPM4-ALK (95–105)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ; MBO
t(2;17)(p23;q25)	ALO17	< 1	ALO17-ALK (–)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ
t(2;2)(p23;q13) or inv(2)(p23;q11–13)	RANBP2 (RAN-связывающий белок 2)	< 1	RANBP2-ALK (160)	Ядрышки	MBO
t(2;22)(p23;q11.2)	MYH9 (тяжелая цепь немиеоцитарного миозина)	< 1	MYH9-ALK (220)	Цитоплазма	ALK ⁺ АККЛ
t(2;11;2)(p23;p15;q31)	CARS (цистеинил-тРНК-синтетаза)	< 1	CARS-ALK (130)	–	MBO
ins (3'ALK)(4q22–24)	–	< 1	–	Цитоплазматическая гранулярная	ALK ⁺ ДКБКЛ
t(2;4)(p23;q21)	SEC31L1 (гомолог SEC31)	< 1	SEC31L1-ALK (–)	Цитоплазма	MBO
inv(2)(p21;p23)	EML4	6	EML4-ALK (–)	–	НМКРЛ

Примечание. ALK – *anaplastic lymphoma kinase*; АККЛ – крупноклеточная анапластическая лимфома; MBO – миофибробластные опухоли; ДКБКЛ – диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома; НМКРЛ – немелкоклеточный рак легких.

ALK была выявлена и впервые описана G. Delsol и соавт. в диффузной В-крупноклеточной лимфоме, неопластические клетки которой экспрессируют маркеры плазматических клеток (CD138), CD4, но негативны по большинству В-клеточных маркеров и CD30 [26]. Открытие в 1999 г. рекомбинантных белков TPM3-ALK, TPM4-ALK в клетках миофибробластической опухоли подтвердило предположение о вовлечении транслокаций с участием ALK в развитие данной патологии [27, 28]. Экспрессия ALK определяется в 10 % случаев в клеточном субстрате нейробластом, в клеточных линиях глиобластомы и рабдомиосаркомы [29–31]. Кроме того, в опухолевых клетках рака молочной железы показана экспрессия ALK с более агрессивным течением при детекции плейотропина [32]. Рекомбинантный белок TPM4-ALK детектируется при плоскоклеточном раке пищевода [33]. Наконец, в 6 % случаев немелкоклеточного рака легкого типичны химерные белки EML4-ALK [20].

Киназа анапластической лимфомы, также известная как CD246, относится к суперсемейству инсулиновых

рецепторов. В состав ALK входят внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий глицин-богатые повторы, LDL и MAM, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, обладающий каталитической активностью. Лигандами ALK служат плейотропин и мидкин, экспрессия которых определяет эмбриональную закладку нервной системы, миграцию нейронов и ангиогенез [34]. Физиологическая роль киназы АККЛ у взрослых до конца не изучена, однако в когорте пациентов, получивших лечение ингибиторами тирозинкиназы (кризотиниб), описаны необъяснимые побочные эффекты в виде брадикардии, снижения уровня тестостерона у мужчин, нарушения зрения [35–37].

Олигомеризация киназных доменов рекомбинантных белков имитирует связывание лиганда с тирозинкиназой, являясь спусковым механизмом активации и проведения ключевых сигналов роста и пролиферации клеток. Так, сигнальные пути Ras-ERK необходимы для пролиферации, каскады *a* JAK3-STAT3 и PI3K-Akt определяют изменения фенотипа и иммортализацию клеток АККЛ [4, 38]. Далее приведены схемы основных

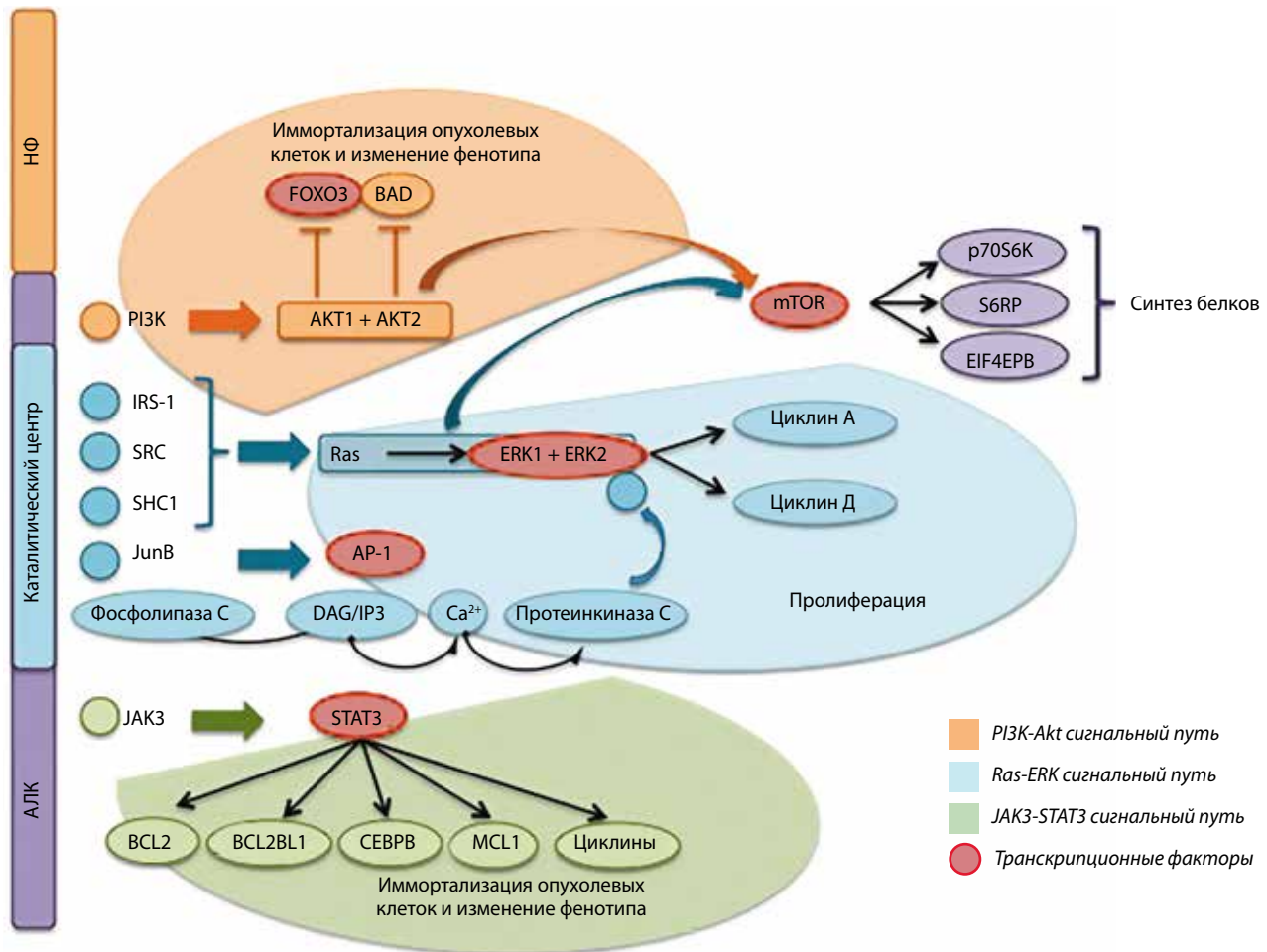


Рис. 3. Общая схема внутриклеточных сигнальных каскадов рекомбинантных белков киназы анапластической лимфомы (АЛК). НФ — нуклеофизмин

внутриклеточных каскадов, участвующих в онкогенной трансформации опухолевых клеток.

JAK3-STAT3 сигнальный путь [38]. Иммортизация опухолевых клеток происходит за счет активации белков — преобразователей сигнала и активаторов транскрипции STAT3. STAT-белки фосфорилируются JAK-киназами, после чего димеризуются и двигаются к ядру, чтобы обеспечить транскрипцию антиапоптотических факторов и регуляторов клеточного цикла: BCL2, BCL2BL1, CEBPB, MCL1, циклинов (рис. 3).

Ras-ERK сигнальный путь [38]. Для запуска Ras-ERK сигнального каскада необходима стыковка нескольких адаптеров (IRS-1, SHC1, SRC) со специфическими тирозиновыми остатками тирозинкиназы ALK, после чего с комплексом молекул взаимодействует SHP2-GRB2, активируя Ras, который, в свою очередь, фосфорилирует транскрипционные факторы ERK1 и ERK2 (см. рис. 3). В результате фосфорилирования ERK1 и ERK2 инактивируется белок p21, увеличивая активность циклинов D3 и A, что в конечном итоге приводит к нерегулируемому клеточному циклу и росту. Кроме того, активация пути Ras-ERK приводит к фосфорилированию мишеней mTOR: рибосомального белка киназы S6 (p70S6K), S6 рибосомального

белка (S6RP), инактивации связывающего протеина 4E (EIF4EBP), следствием чего являются рибосомальный биогенез и синтез белков. Имеет место и прямое связывание фосфолипазы C с тирозиновым остатком ALK. Фосфолипаза C катализирует гидролиз фосфатидилинозитола до 2 молекул, являющихся вторичными мессенджерами: диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3). Инозитолтрифосфат, связываясь с Ca²⁺-каналами эндоплазматического ретикулума, высвобождает из него Ca²⁺, повышая концентрацию иона в цитоплазме. Диацилглицерол в присутствии Ca²⁺ активирует протеинкиназу C (см. рис. 3).

PI3K-Akt сигнальный путь [38]. NPM1-ALK связывает регуляторную субъединицу p85 PI3K, эффекторными молекулами которой являются AKT1 и AKT2, которые инактивируют проапоптотический фактор BAD и блокируют молекулы FOXO3 путем фосфорилирования аминокислотных остатков Tyr24, Ser256, Ser319. Мишенями FOXO3 служат гены, транскрибирующие молекулы апоптоза, блокаторы G1-фазы клеточного цикла и метаболизма (см. рис. 3).

JunB сигнальный путь [39]. Запуск Ras-ERK и PI3K-Akt сигнальных каскадов является пусковым для белков семейства JunB, которые, образуя гомо- и гетеродимеры,

формируют транскрипционный фактор AP-1. Гены, ответственные за синтез белков, регулирующих пролиферативную активность и апоптоз, служат мишенями фактора AP-1. Активация JunB сигнального пути инициирует экспрессию мембранного антигена CD30 и белка GzB в клеточных культурах ALK⁺ АККЛ, что указывает на участие GzB в патогенезе этого заболевания (см. рис. 3).

Клиническое значение киназы анапластической лимфомы

ALK являются привлекательной мишенью для применения ингибиторов в силу их широкой распространенности в опухолевых тканях, в то время как экспрессия и функции тирозинкиназ ALK в нормальных тканях ограничены. Наибольший интерес в клинической практике представляет кризотиниб (PF-02341066), фармакологическое действие которого обусловлено связыванием внутриклеточного киназного домена [40]. В исследованиях *in vitro* показано дозозависимое снижение аутофосфорилирования тирозинкиназы ALK. Кризотиниб запускает апоптоз в клеточных линиях, содержащих продукты транслокаций с участием гена ALK, а именно Karpas-299 (NPM-ALK), SU-DHL-1 (NPM-ALK), NCI-H3122 (EML4-ALK) [41]. Применение кризотиниба в клинических испытаниях показало «драматическое» улучшение прогноза у пациентов с ALK⁺ немелкоклеточным раком легкого. Медиана выживаемости без прогрессирования основного заболевания составила 7,7 мес в группе терапии кризотинибом, в то время как в группе пациентов, получающих стандартную химиотерапию, этот показатель был равен 3 мес. Уровень объективного ответа составил 60 и 20 % в группах лечения кризотинибом и стандартной терапии соответственно [42]. Применение кризотиниба при рецидивах ALK⁺ АККЛ и воспалительных миофибробластических опухолях также показало убедительный эффект.

Несмотря на блестящие результаты клинических испытаний кризотиниба при ALK⁺ опухолях, у большинства пациентов возникают ранние рецидивы в течение года и развивается нечувствительность к препарату. Выделяют 2 основных механизма

возникновения резистентности к кризотинибу. Наиболее распространенной причиной являются мутации и амплификации гена *ALK*, что приводит к снижению эффективности ингибирования. Выявление мутаций в киназных доменах F1174 и I1171 в ходе терапии ALK⁺ АККЛ может являться основанием для применения ингибиторов тирозинкиназ следующих поколений [4]. Запуск альтернативных внутриклеточных каскадов опухолевыми клетками рассматривается в качестве следующего механизма развития резистентности. Активация сигнальных путей STAT3 и EMT в клетках немелкоклеточного рака легкого приводит к ускользанию опухоли от иммунного надзора [43]. Совместная терапия кризотинибом и ингибиторами STAT3 восстанавливает чувствительность резистентных к кризотинибу клеток [44]. Новые ингибиторы сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR индуцируют апоптоз и аутофагию клеточных линий нейробластом [45].

Заключение

ALK⁺ АККЛ представляет группу зрелых неходжкинских Т-клеточных лимфом, опухолевый субстрат которых содержит рекомбинантные белки тирозинкиназ. Драйвером опухолевой трансформации клеток служит aberrантная активация и усиление основных внутриклеточных сигнальных каскадов. Открытие рекомбинантных белков ALK и их роли в патогенезе болезни привело к всплеску интереса к применению ингибиторов тирозинкиназ, в частности кризотиниба и следующих поколений ALK-ингибиторов, в клинической практике. Вместе с тем существует группа пациентов, для которых характерно развитие ранних рецидивов и резистентности к ингибиторам тирозинкиназ. Целесообразным может являться совместное применение кризотиниба и других ингибиторов внутриклеточных сигнальных каскадов. Таким образом, дальнейшее изучение механизмов онкогенной трансформации клетки, а также выявление и применение новых ингибиторов транскрипционных факторов, активируемых в сигнальных каскадах ALK, — перспективные направления в фармакологическом поиске новых препаратов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stein H., Mason D.Y., Gerdes J. et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66(4):848–58. PMID: 3876124.
2. Kinney M.C., Higgins R.A., Medina E.A. Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(1):19–43. DOI: 10.1043/2010-0507-RAR. 1. PMID: 21204709.
3. Wright D., McKeever P., Carter R. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: findings from the UK Children's Cancer Study Group. *J Clin Pathol* 1997;50(2):128–34. PMID: 9155693.
4. Boi M., Zucca E., Inghirami G., Bertoni F. Advances in understanding the pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol*

- 2015;168(6):771–83.
DOI: 10.1111/bjh.13265. PMID: 25559471.
5. Benharroch D., Meguerian-Bedoyan Z., Lamant L. et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998;91(6):2076–84. PMID: 9490693.
6. Falini B., Bigerna B., Fizzotti M. et al. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas (“ALK lymphomas”) with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* 1998;153(3):875–86. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65629-5. PMID: 9736036.
7. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, 2008.
8. Krenacs L., Wellmann A., Sorbara L. et al. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin’s disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood* 1997;89(3):980–9. PMID: 9028330.
9. Bonzheim I., Geissinger E., Roth S. et al. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* 2004;104(10):3358–60. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1037. PMID: 15297316.
10. Lamant L., McCarthy K., d’Amore E. et al. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: Results of the ALCL99 Study. *J Clin Oncol* 2011;29(35):4669–76. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.5411. PMID: 22084369.
11. Brugières L., Deley M.C., Pacquement H. et al. CD30(+) anaplastic large-cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology. *Blood* 1998;92(10):3591–8. PMID: 9808552.
12. Seidemann K., Tiemann M., Schrappe M. et al. Short-pulse B-non-Hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood* 2001;97(12):3699–706. PMID: 11389005.
13. Williams D.M., Hobson R., Imeson J. et al. Anaplastic large cell lymphoma in childhood: analysis of 72 patients treated on The United Kingdom Children’s Cancer Study Group chemotherapy regimens. *Br J Haematol* 2002;117(4):812–20. PMID: 12060115.
14. Le Deley M.C., Reiter A., Williams D. et al. Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study. *Blood* 2008;111(3):1560–6. DOI: 10.1182/blood-2007-07-100958. PMID: 17957029.
15. Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B. et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin’s lymphoma. *Science* 1994;263(5151):1281–4. PMID: 8122112.
16. Hernández L., Pinyol M., Hernández S. et al. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood* 1999;94(9):3265–8. PMID: 10556217.
17. Touriol C., Greenland C., Lamant L. et al. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood* 2000;95(10):3204–7. PMID: 10807789.
18. Tort F., Pinyol M., Pulford K. et al. Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest* 2001;81(3):419–26. PMID: 11310834.
19. Ma Z., Hill D.A., Collins M.H. et al. Fusion of ALK to the Ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37(1):98–105. DOI: 10.1002/gcc.10177. PMID: 12661011.
20. Soda M., Choi Y.L., Enomoto M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448(7153):561–6. DOI: 10.1038/nature05945. PMID: 17625570.
21. Cools J., Wlodarska I., Somers R. et al. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34(4):354–62. DOI: 10.1002/gcc.10033. PMID: 12112524.
22. Lamant L., Dastugue N., Pulford K. et al. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* 1999;93(9):3088–95. PMID: 10216106.
23. Takeuchi K., Choi Y.L., Togashi Y. et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(9):3143–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3248. PMID: 19383809.
24. Debelenko L.V., Arthur D.C., Pack S.D. et al. Identification of CARS-ALK fusion in primary and metastatic lesions of an inflammatory myofibroblastic tumor. *Lab Invest* 2003;83(9):1255–65. PMID: 13679433.
25. Panagopoulos I., Nilsson T., Domanski H.A. et al. Fusion of the SEC31L1 and ALK genes in an inflammatory myofibroblastic tumor. *Int J Cancer* 2006;118(5):1181–6. DOI: 10.1002/ijc.21490. PMID: 16161041.
26. Delsol G., Lamant L., Mariamé B. et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation. *Blood* 1997;89(5):1483–90. PMID: 9057627.
27. Griffin C.A., Hawkins A.L., Dvorak C. et al. Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 1999;59(12):2776–80. PMID: 10383129.
28. Lawrence B., Perez-Atayde A., Hibbard M.K. et al. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2000;157(2):377–84. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64550-6. PMID: 10934142.
29. Lamant L., Pulford K., Bischof D. et al. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am J Pathol* 2000;156(5):1711–21. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65042-0. PMID: 10793082.
30. Powers C., Aigner A., Stoica G.E. et al. Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem* 2002;277(16):14153–8. DOI: 10.1074/jbc.M112354200. PMID: 11809760.
31. Pillay K., Govender D., Chetty R. ALK protein expression in rhabdomyosarcomas. *Histopathology* 2002;41(5):461–7. PMID: 12405914.
32. Perez-Pinera P., Garcia-Suarez O., Menendez-Rodriguez P. et al. The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) beta/zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362(1):5–10. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.050. PMID: 17706593.
33. Jazii F.R., Najafi Z., Malekzadeh R. et al. Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12(44):7104–12. PMID: 17131471.
34. Hallberg B., Palmer R.H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2013;13(10):685–700. DOI: 10.1038/nrc3580. PMID: 24060861.
35. Ou S.H., Bazhenova L., Camidge D.R. et al. Rapid and dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(12):2044–6. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318200f9ff. PMID: 21102269.
36. Weickhardt A.J., Rothman M.S., Salian-Mehta A. et al. Rapid-onset hypogonadism secondary to crizotinib use in men with metastatic nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118(21):5302–9. DOI: 10.1002/cncr.27450. PMID: 22488744.
37. Kwak E.L., Bang Y.J., Camidge D.R. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363(18):1693–703. DOI: 10.1056/NEJMoa1006448. PMID: 20979469.

38. Chiarle R., Voena C., Ambrogio C. et al. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):11–23. DOI: 10.1038/nrc2291. PMID: 18097461.
39. Pearson J.D., Lee J.K., Bacani J.T. et al. NPM-ALK and the JunB transcription factor regulate the expression of cytotoxic molecules in ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4(2):124–33. PMID: 21326808.
40. George S.K., Vishwamitra D., Manshour R. et al. The ALK inhibitor ASP3026 eradicates NPM-ALK+ T-cell anaplastic large-cell lymphoma in vitro and in a systemic xenograft lymphoma model. *Oncotarget* 2014;5(14):5750–63. DOI: 10.18632/oncotarget.2170. PMID: 25026277.
41. Cui J.J., Tran-Dubé M., Shen H. et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J Med Chem* 2011;54(18):6342–63. DOI: 10.1021/jm2007613. PMID: 21812414.
42. Guo L., Zhang H., Shao W., Chen B. Crizotinib as a personalized alternative for targeted anaplastic lymphoma kinase rearrangement in previously treated patients with non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:5491–7. DOI: 10.2147/DDDT.S91988. PMID: 26491259.
43. Cuyàs E., Pérez-Sánchez A., Micol V. et al. STAT3-targeted treatment with silibinin overcomes the acquired resistance to crizotinib in ALK-rearranged lung cancer. *Cell Cycle* 2016;1–6. DOI: 10.1080/15384101.2016.1245249. PMID: 27753543.
44. Wang Y., Wang L., Guan S. et al. Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis. *Sci Rep* 2016;6:19423. DOI: 10.1038/srep19423. PMID: 26786851.
45. Moore N.F., Azarova A.M., Bhatnagar N. et al. Molecular rationale for the use of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in combination with crizotinib in ALK-mutated neuroblastoma. *Oncotarget* 2014;5(18):8737–49. DOI: 10.18632/oncotarget.2372. PMID: 25228590.

Делеции гена *IKZF1* – независимый прогностический фактор у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников

Г.А. Цаур¹⁻⁴, А.Е. Друй^{2,5}, А.Г. Солодовников^{2,4}, А.М. Попов⁵, А.П. Шапочник⁶,
Л.В. Вахонина^{1,2}, А.А. Власова¹, Т.О. Ригер^{1,2}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Ю.В. Ольшанская⁵,
Е.В. Шориков⁷, О.Р. Аракаев^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,4}, Л.Г. Фечина¹

¹ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

²ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

³ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»;
Россия, 620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19;

⁴ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 620030 Екатеринбург, ул. Репина, 3;

⁵ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

⁶ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 460021 Оренбург, проспект Гагарина, 11;

⁷ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 119049 Москва, 4-й Добрынинский переулок, 1/9

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

Целью работы являлась оценка прогностического значения делеций гена *IKZF1* у 141 ребенка с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ). Определение делеций *IKZF1* проводили методом множественной лигазной амплификации зондов. Делеции *IKZF1* были обнаружены у 15 (10,6 %) пациентов, их чаще выявляли у детей старше 10 лет ($p = 0,007$), при инициальном лейкоцитозе выше $30 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,003$) и наличии транслокации $t(9;22)(q34;q11)$ ($p = 0,003$). Наличие делеций сопровождалось замедленным клиренсом бластных клеток: МЗ-статусом костного мозга на 15-й день индукционной терапии ($p = 0,003$), отсутствием клино-гематологической ремиссии ($p < 0,001$), высоким уровнем минимальной остаточной болезни на 15, 36 и 85-й дни терапии ($p = 0,014$; $p < 0,001$; $p = 0,001$ соответственно). Больные с делециями *IKZF1* имели более низкие показатели бессобытийной выживаемости (БСВ) ($0,30 \pm 0,15$ и $0,89 \pm 0,03$; $p < 0,001$) и общей выживаемости (ОВ) ($0,44 \pm 0,19$ и $0,93 \pm 0,02$; $p < 0,001$) и более высокую кумулятивную вероятность развития рецидива ($0,67 \pm 0,18$ и $0,07 \pm 0,02$; $p < 0,001$). Проведение многофакторного анализа показало, что делеции *IKZF1* являются независимым фактором, снижающим БСВ (относительный риск (ОР) 4,755; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,856–12,185; $p = 0,001$), ОВ (ОР 4,208; 95 % ДИ 1,322–13,393; $p = 0,015$) и увеличивающим риск рецидива (ОР 9,083; 95 % ДИ 3,119–26,451; $p < 0,001$). На более ярко неблагоприятное прогностическое значение делеций *IKZF1* проявилось в группе промежуточного риска ($p < 0,001$), а у больных из групп стандартного и высокого риска наличие делеций не было связано с прогнозом. Большинство делеций *IKZF1* – 12 (80 %) из 15 – было выявлено в группе «другие В-линейные ОЛЛ» ($n = 83$). В этой группе делеции *IKZF1* являлись независимым фактором, снижающим БСВ (ОР 6,172; 95 % ДИ 1,834–20,767; $p = 0,003$) и увеличивающим риск рецидива (ОР 16,303; 95 % ДИ 3,324–79,965; $p = 0,015$). Таким образом, мы показали, что делеции гена *IKZF1* являются независимым фактором, ухудшающим прогноз ВП-ОЛЛ у детей.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, прогноз, факторы риска, делеции гена *IKZF1*

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-32-48

IKZF1 deletions are independent prognostic factor in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

G.A. Tsaur¹⁻⁴, A.E. Druy^{2,5}, A.G. Solodnikov^{2,4}, A.M. Popov⁵, A.P. Shapochnik⁶, L.V. Vakhonina^{1,2}, A.A. Vlasova¹, T.O. Riger^{1,2},
T.Yu. Verzhbitskaya^{1,2}, Yu.V. Olshanskaya⁵, E.V. Shorikov⁷, O.R. Arakayev^{1,2}, L.I. Savelyev^{1,2,4}, L.G. Fechina¹

¹Regional Children's Clinical Hospital No 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

²Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

³Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin; 19 Mira St., Ekaterinburg 620002, Russia;

⁴Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Repina St., Ekaterinburg 620030, Russia;

⁵Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

⁶Orenburg Regional Clinical Oncological Dispensary; 11 Gagarina Prospekt, Orenburg 460021, Russia;

⁷Morozov Pediatric City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; 1/9 4th Dobryninskiy Pereulok, Moscow 119049, Russia

We assessed the prognostic significance of *IKZF1* gene deletions in 141 pediatric patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) on Russian multicenter trial in pediatric clinics of Ekaterinburg and Orenburg. *IKZF1* deletions were estimated by multiplex ligation-dependent probe amplification. *IKZF1* deletions were revealed in 15 (10.6 %) patients. *IKZF1* deletions were associated with age older

than 10 years ($p = 0.007$), initial white blood cell count higher than $30 \times 10^9/l$ ($p = 0.003$), $t(9;22)(q34;q11)$ ($p = 0.003$) and delayed blast clearance: M3 status of bone marrow at day 15 of remission induction ($p = 0.003$), lack of hematological remission at day 36 ($p < 0.001$) and high levels of minimal residual disease at days 15, 36 and 85 ($p = 0.014$; $p < 0.001$; $p = 0.001$ correspondingly). Patients with *IKZF1* deletions had significantly lower event-free survival (EFS) (0.30 ± 0.15 vs 0.89 ± 0.03 ; $p < 0.001$) and overall survival (OS) (0.44 ± 0.19 vs 0.93 ± 0.02 ; $p < 0.001$), while cumulative incidence of relapse was higher (0.67 ± 0.18 vs 0.07 ± 0.02 ; $p < 0.001$). In the multivariate analysis *IKZF1* deletions were associated with decreased EFS (hazard ratio (HR) 4.755; 95 % confidence interval (CI) 1.856–12.185; $p = 0.001$), and OS (HR 4.208; 95 % CI 1.322–13.393; $p = 0.015$), but increased relapse risk (HR 9.083; 95 % CI 3.119–26.451; $p < 0.001$). *IKZF1* deletions retained their prognostic significance in the intermediate risk group patients ($p < 0.001$), but not in standard or high-risk groups. Majority of *IKZF1* deletions – 12 (80 %) of 15 – were revealed in the “B-other” group ($n = 83$). In this cohort of patients *IKZF1* deletions led to inferior EFS (HR 6.172; 95 % CI 1.834–20.767; $p = 0.003$) and higher relapse rate (HR 16.303; 95 % CI 3.324–79.965; $p = 0.015$). Thus, our results showed that *IKZF1* deletions are independent risk factor in BCP-ALL patients.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, children, prognosis, risk factors, *IKZF1* deletions

Введение

Использование интенсивной программной полихимиотерапии значительно улучшило прогноз течения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. На сегодняшний день общая выживаемость (ОВ) пациентов превышает 90 %, а бессобытийная выживаемость (БСВ) – 80 %. В то же время остаются отдельные группы больных, эффективность терапии в которых значительно ниже. Поиск и тщательная характеристика этих прогностически неблагоприятных групп необходимы для корректной стратификации, своевременного планирования трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и использования новых таргетных препаратов.

Одной из таких групп с неблагоприятным исходом ОЛЛ являются больные с делециями в гене *IKZF1*, расположенном в хромосомном районе 7p12.2. Ген *IKZF1*, состоящий из 8 экзонов, кодирует белок из 519 аминокислот, часто обозначаемый как IKAROS. Экзон 1 не транслируется, но, возможно, вместе с промоторным регионом регулирует транскрипцию гена [1]. Экзоны 4–6 кодируют 4 N-концевых цинковых пальца, которые необходимы для связывания с ДНК, а экзон 8 – 2 C-концевых цинковых пальца, которые необходимы IKAROS для димеризации, а также для связывания с другими членами своего семейства белков [2, 3] (рис. 1а, б). Данное семейство состоит из 5 белков, которые получили свои обозначения на основе имен персонажей греческой мифологии (табл. 1). Описано 9 изоформ белка IKAROS, синтезирующихся преимущественно вследствие альтернативного сплайсинга. Исключение составляет только изоформа 6, в подавляющем большинстве случаев образующаяся при делеции экзонов 4–7 гена *IKZF1* [1]. В норме IKAROS является транскрипционным фактором, и при этом он способствует дифференцировке лимфоидных клеток на самых ранних этапах лимфопоэза, блокирует их пролиферацию и контролирует миграционные свойства гемопоэтических клеток [8, 9].

У больных ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) описано около 30 точечных мутаций в гене *IKZF1* [10–14], однако наиболее частым генетическим событием в нем являются делеции. Делеции могут

затрагивать как весь ген *IKZF1*, так и отдельные его экзоны (так называемые фокальные делеции). Наиболее часто встречаются делеции экзонов 4–7, реже тотальные делеции гена (экзоны 1–8), еще реже делеции экзонов 2–7, 4–8, 2–3, 2–8 (даны в порядке убывания частоты) [10, 15–17] (рис. 1в).

Впервые связь делеций с прогнозом ВП-ОЛЛ была описана 2 исследовательскими группами в 2007 г. [18, 19]. После этого возник большой интерес к данной проблематике, и делеции в гене *IKZF1* были описаны не только при ВП-ОЛЛ у детей и взрослых. Было показано, что они выявляются у подавляющего большинства больных Ph-позитивным ОЛЛ [6, 15, 20], а также более чем в половине случаев лимфоидного бластного криза при хроническом миелоидном лейкозе [15, 21], в 40 % случаев при *BCR-ABL1*-подобном профиле экспрессии генов [22] и примерно у трети больных ОЛЛ и болезнью Дауна [23]. Во всех этих случаях делеции *IKZF1* являются независимым прогностическим фактором, связанным с неблагоприятным прогнозом заболевания. Также изредка делеции *IKZF1* встречаются при Т-линейных ОЛЛ [24], вторичном остром миелоидном лейкозе [25], однако в этих случаях их прогностическая роль остается неясной.

Таблица 1. Структура семейства белков, к которому относится IKAROS (по данным [4–6])

Название белка	Размер белка (число аминокислот)*	Название гена	Локализация гена	Число экзонов*
IKAROS (IKZF1)	519	<i>IKZF1</i>	7p12.2	8
HELIOS (IKZF2)	526	<i>IKZF2</i>	2q34	9
AIOLOS (IKZF3)	509	<i>IKZF3</i>	17q12–21.1	8
EOS (IKZF4)	585	<i>IKZF4</i>	12q13.2	12
PEGASUS (IKZF5)	419	<i>IKZF5</i>	10q26.13	5

*Размер белка и количество экзонов в гене приведены по данным [7].

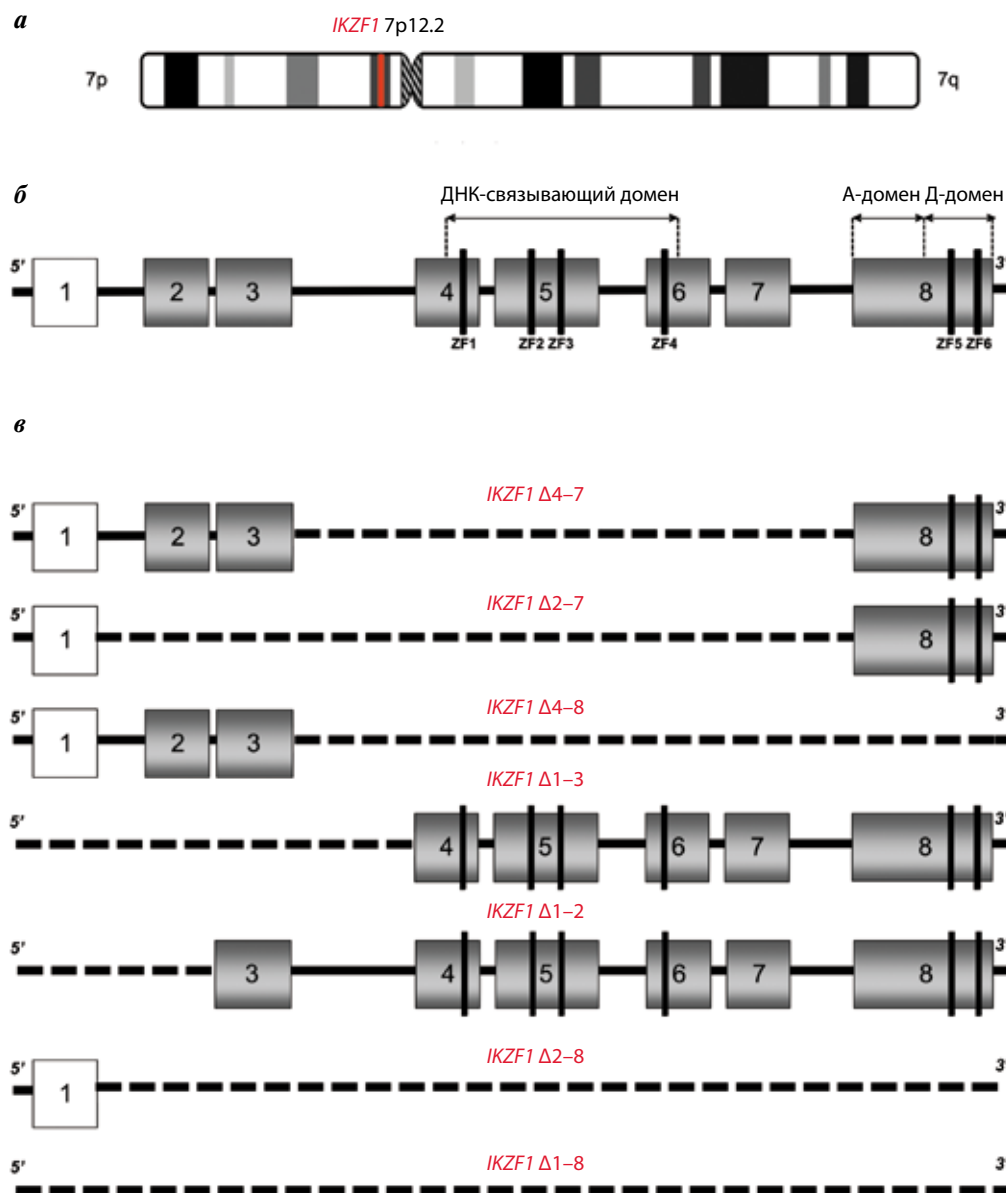


Рис. 1. Локализация и структура гена *IKZF1*: а — схема расположения гена *IKZF1* в хромосомном районе 7p12.2; б — структура гена *IKZF1* с указанием кодирующих (2–8) и некодирующего (1) экзонов (ZF — цинковые пальцы); в — структура различных изоформ *IKZF1* в зависимости от типа делеции

Взаимосвязь между делециями гена *IKZF1* и прогнозом ВП-ОЛЛ у детей была показана многими исследовательскими группами (AIEOP, BFM, COG, DCOG, NOPHO) [11, 24, 26–28], однако в нашей стране, где в большинстве педиатрических клиник применяют протоколы группы «Москва–Берлин» (MB), подобное исследование ранее не проводили.

Цель исследования — оценить прогностическое значение делеций гена *IKZF1* у детей с ВП-ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ALL-MB 2008.

Материалы и методы

В исследование был включен 141 пациент с ВП-ОЛЛ, получавший лечение по протоколу ALL-MB 2008 в отделе детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 г. Екатеринбург ($n = 120$)

и детском онкологическом отделении Оренбургского областного клинического онкологического диспансера ($n = 21$) с апреля 2008 г. по октябрь 2013 г. Критериями включения в данное исследование были диагноз ВП-ОЛЛ, возраст от 1 года до 16 лет, а также наличие ДНК, выделенной из бластных клеток, взятых во время установления диагноза. В исследуемой группе было 75 (53,2 %) мальчиков и 66 (46,8 %) девочек в возрасте от 1,1 года до 16 лет (медиана 3,15 года). Медиана времени наблюдения составила 4,2 года. Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании стандартных морфологических показателей [29] и данных иммунофенотипирования согласно критериям European Group for the Immunological Characterization of Leukemias [30, 31]. При проведении цитогенетического исследования применяли краткосрочное культивирование клеток

в течение 24 ч. Дифференциальную окраску хромосом на G-полосы проводили красителем Гимза после предварительной обработки препаратов трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 11 метафазных пластинок. Анализ хромосом выполняли в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека, принятой на момент выполнения стандартного цитогенетического исследования [32–34]. В ходе данной работы все кариотипы были повторно оценены с учетом рекомендаций International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013 [34]. У 2 (1,4 %) детей диагностирована болезнь Дауна. Все больные ВП-ОЛЛ также обследованы методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом химерный транскрипт *BCR-ABL1* выявлен в 2 (1,4 %) случаях, *ETV6-RUNX1* – в 32 (22,7 %), *TCF3-PBX1* – в 5 (3,5 %), *MLL-MLLT3* – в 1 (0,7 %) случае, а химерные транскрипты *MLL-AF4* и *MLL-MLLT1* не были обнаружены в исследуемой группе. Методика определения химерных транскриптов в целом идентична описанной нами ранее [35, 36].

Исходя из критериев стратификации протокола ALL-MB 2008 [37] в группу стандартного риска были включены 62 (44,0 %) больных, промежуточного риска – 64 (45,4 %), высокого риска – 15 (10,6 %) пациентов.

Группу риска по критериям Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI) [38] рассчитывали исходя из возраста на момент диагностики и величины инициального лейкоцитоза. Для включения в группу низкого риска необходимо одновременное наличие 2 условий: лейкоцитоз ниже $50 \times 10^9/\text{л}$ и возраст старше 1 года, но младше 10 лет. К группе низкого риска отнесено 95 (67,4 %) пациентов. В группу высокого риска были включены 46 (32,6 %) больных с лейкоцитозом выше $50 \times 10^9/\text{л}$ и/или в возрасте 10 лет и старше.

Деление на группы цитогенетического риска проводили согласно рекомендациям A.V. Moorman и соавт. [39]. Группа низкого цитогенетического риска включала 48 (34,0 %) больных с транслокацией $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$, $t(17;19)(q23;p13)/TCF3-HLF$, перестройки $11q23/MLL$, околотаплоидный кариотип (менее 30 хромосом), низкая гиподиплоидия/околотриплоидный кариотип (30–39/66–78 хромосом), внутрехромосомная амплификация 21 (iAMP21). Группа промежуточного риска ($n = 90$; 63,8 %) включала любые другие хромосомные аномалии, а также нормальный кариотип.

Группу «другие В-линейные ОЛЛ» ($n = 83$; 58,9 %) выделяли после исключения всех неслучайных количественных (высокая гипердиплоидия, гиподиплоидия) и структурных ($t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$,

$t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$, $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1$, перестройки $11q23/MLL$) цитогенетических aberrаций.

Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) методом проточной цитометрии проводили по ранее описанной методике [40, 41] с выделением групп риска по результатам оценки на 15, 36 и 85-й дни (а для группы высокого риска – после 1-го блока высокодозной химиотерапии) [42]. Оценку МОБ на 15-й день выполнили у 116, на 36-й день – у 119, на 85-й день – у 118 больных.

Выявление делеций в гене *IKZF1* проводили методом множественной лигазной амплификации зондов (MLPA) с использованием наборов SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1 и SALSA MLPA P202 IKZF1 (IKAROS) (оба – MRC-Holland, Нидерланды) согласно инструкции производителя. На 1-м этапе все образцы ДНК исследовали с помощью набора SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1. Данный набор содержит по 1 зонду для каждого из 8 экзонов гена *IKZF1*, 7 зондов для гена *PAX5*, 6 зондов для гена *ETV6*, 5 зондов для гена *RBI*, по 4 зонда для гена *BTG1* и нижерасположенного региона, 4 зонда для гена *EBF1*, 3 зонда для *CDKN2A/B* и 5 зондов для региона PAR1, в который входят гены *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *P2RY8*. Образцы, в которых выявлены делеции *IKZF1*, повторно тестировали с помощью набора SALSA MLPA P202 IKZF1 (IKAROS). Набор P202 содержит по 2 зонда к каждому экзону *IKZF1*. Делецию *IKZF1* считали обнаруженной при согласованном выявлении обоими наборами. Фрагментный анализ выполняли на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Япония).

Полученные данные анализировали с применением программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды). Пики, выявляемые в ходе фрагментного анализа, нормализовали по отношению к 5 контрольным ДНК, полученным от здоровых доноров. Относительную высоту пиков от 0,75 до 1,25 по отношению к контрольным ДНК расценивали как нормальное количество, соответствующее диплоидному набору. Значения менее 0,75 и более 1,25 соответствовали делеции или увеличению числа копий соответственно. Значения менее 0,25 расценивали как биаллельную делецию.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение SAS, Statistica 8.0 и R-statistics. При сравнении по качественным признакам использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса, при сравнении по количественным признакам – критерий Манна–Уитни. Результаты терапии оценивали по кривым БСВ и ОВ, построенным по методу Каплана–Майера, а также по кумулятивной вероятности развития рецидива (КВР). Для сравнения кривых использовали непараметрические критерий log-rank (для БСВ и ОВ) и критерий Грея (для КВР). При расчете БСВ под событиями понимали рецидив, смерть вследствие любой причины как первое событие, выход из-под наблюдения. Стандартную ошибку рассчитывали

по формуле Гринвуда. Расчет относительного риска (ОР) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) был проведен по методу пропорционального риска Кокса в однофакторной и многофакторной моделях. Многофакторный анализ проведен для значимых в однофакторном анализе показателей в зависимости от их значимости на основании величин p и ОР методом последовательного исключения. Параметры сравнивали с использованием теста Вальда. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Делеции в гене *IKZF1* выявлены у 15 (10,6 %) пациентов. Делеция всего гена обнаружена в 3 (20 %) случаях, самые частые из фокальных делеций — делеции экзонов 4–7 и экзонов 2–7 — обнаружены в 4 (26,7 %) случаях каждая. Более подробно типы выявленных делеций представлены в табл. 2. Все обнаруженные делеции являлись моноаллельными.

Связь делеций *IKZF1* с различными инициальными факторами, а также с показателями ответа на терапию приведена в табл. 3. Из нее видно, что больные, у которых обнаружены делеции *IKZF1*, были старше остальных (медиана возраста 9,7 и 3,2 года соответственно; $p = 0,007$), они чаще относились к группе высокого риска при лечении по протоколу ALL-MB 2008 (53,3 и 5,6 % соответственно; $p < 0,001$) и группе высокого риска по NCI (66,7 и 28,6 % соответственно; $p = 0,007$). У больных с делециями *IKZF1* чаще выявляли инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$ (60,0 и 21,3 % соответственно; $p = 0,007$) и транслокацию $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$ (13,3 и 0 % соответственно; $p = 0,003$). Наличие делеций *IKZF1* сопровождалось замедленным клиренсом бластных клеток: МЗ-статус костного мозга на 15-й день индукционной терапии регистрировали чаще, чем у больных без делеций (40,0 и 9,4 % соответственно; $p = 0,003$), также чаще выявляли высокий уровень МОБ на 15, 36 и 85-й дни терапии ($p = 0,014$; $p < 0,001$; $p = 0,001$ соответственно). Кроме того, при наличии делеций *IKZF1* 4 (26,7 %) пациента не достигли клинко-гематологической ремиссии к 36-му дню индукционной терапии, что встречалось статистически значимо чаще, чем в группе без делеций (2,4 %; $p < 0,001$).

Больные с делециями гена *IKZF1* имели статистически значимо более низкую БСВ по сравнению с пациентами без делеций ($0,30 \pm 0,15$ и $0,89 \pm 0,03$ соответственно; $p < 0,001$), что в первую очередь было обусловлено более высокой КВР в этой группе ($0,67 \pm 0,18$ и $0,07 \pm 0,02$ соответственно; $p < 0,001$). ОВ была статистически значимо ниже у больных с наличием делеций *IKZF1* по сравнению с теми, у кого делеции не были выявлены ($0,44 \pm 0,19$ и $0,93 \pm 0,02$ соответственно; $p < 0,001$) (рис. 2).

Однофакторный анализ всех инициальных переменных и показателей ответа на терапию (без учета данных определения МОБ) показал, что прогности-

чески неблагоприятными факторами, влияющими на возникновение неблагоприятных событий у больных ОЛЛ, получавших лечение по протоколу ALL-MB 2008, кроме делеций *IKZF1* являлись группа высокого риска при лечении по данному протоколу ($p < 0,001$), группа высокого риска по NCI ($p = 0,001$), группа высокого цитогенетического риска ($p = 0,032$), возраст старше 10 лет ($p = 0,008$), инициальный лейкоцитоз как выше $30 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,001$), так и выше $50 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,001$), число бластных клеток более 1000 на 8-й день индукционной терапии ($p = 0,033$), МЗ-статус костного мозга на 15-й день индукционной терапии ($p < 0,001$), отсутствие клинко-гематологической ремиссии на 36-й день ($p < 0,001$). В то же время проведение многофакторного анализа выявило только 3 прогностически значимых показателя в исследуемой группе: делеции *IKZF1*, инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$ и более 25 % бластных клеток на 15-й день терапии (табл. 4). Идентичные показатели оказались прогностически важными в многофакторном анализе и в тех случаях, когда в качестве неблагоприятного события рассматривались только рецидивы (табл. 5) или смерть от любых причин (табл. 6).

Различия в прогнозе между больными с делециями *IKZF1* и без них сохранялись для группы промежуточного риска при лечении по протоколу ALL-MB 2008 (БСВ $0,26 \pm 0,22$ и $0,90 \pm 0,05$; $p < 0,001$; КВР $0,73 \pm 0,30$ и $0,08 \pm 0,05$; $p < 0,001$) (рис. 3), но не достигли статистической значимости у больных из группы высокого риска (БСВ $0,25 \pm 0,15$ и $0,57 \pm 0,19$; $p = 0,467$; КВР $0,71 \pm 0,19$ и $0,20 \pm 0,18$; $p = 0,179$) (рис. 4). Интересно отметить, что в группу стандартного риска протокола ALL-MB 2008 было отнесено всего 2 пациента с делециями *IKZF1*, и оба они находятся в 1-й продолжающейся ремиссии.

Отдельно был проведен анализ влияния делеций *IKZF1* на результаты терапии среди 83 больных из группы «другие В-линейные ОЛЛ». Большинство делеций — 12 (80 %) из 15 — были выявлены именно в этой группе. Частота выявления делеций *IKZF1* среди «других В-линейных ОЛЛ» составила 14,5 %. Так же как и в общей группе больных, делеции *IKZF1* приводили к более низкой БСВ ($0,24 \pm 0,18$ и $0,88 \pm 0,04$ соответственно;

Таблица 2. Виды делеций гена *IKZF1*, выявленные методом множественной лигазной амплификации зондов

Вид делеции <i>IKZF1</i>	Абс.	%
Полная делеция гена (экзоны 1–8)	3	20,0
Частичная делеция гена, в том числе:	12	80,0
экзонов 4–7	4	26,7
экзонов 2–7	4	26,7
экзонов 4–8	2	13,3
экзонов 2–3	1	6,7
экзонов 1–5	1	6,7
Всего	15	100

Таблица 3. Инициальная характеристика и ответ на терапию пациентов с наличием и отсутствием делеций *IKZF1*

Показатель	Делеция <i>IKZF1</i> (n = 15)	Отсутствие делеции <i>IKZF1</i> (n = 126)	p
Возраст, медиана (диапазон), лет	9,7 (1,2–15,4)	3,2 (1,1–16,0)	0,007
Мальчики/девочки, n (%)	8 (53,3)/7 (46,7)	67 (53,2)/59 (46,8)	0,817
Группа риска по ALL-MB 2008, n (%): стандартная (n = 62) промежуточная (n = 64) высокая (n = 15)	2 (13,3) 5 (33,3) 8 (53,3)	60 (47,6) 59 (46,8) 7 (5,6)	< 0,001
Группа риска по NCI, n (%): низкая (n = 95) высокая (n = 46)	5 (33,3) 10 (66,7)	90 (71,4) 36 (28,6)	0,007
Инициальный лейкоцитоз $> 30 \times 10^9/\text{л}$, n (%)	9 (60,0)	27 (21,4)	0,003
Инициальный лейкоцитоз $> 50 \times 10^9/\text{л}$, n (%)	6 (40,0)	22 (17,3)	0,081
Размер селезенки на 4 см и более ниже реберной дуги, n (%)	6 (40,0)	52 (41,3)	0,836
Наличие нейрорлейкоза, n (%)	3 (20,0)	20 (15,9)	0,958
Наличие t(12;21)(p13;q22)/ <i>ETV6-RUNX1</i> , n (%)	0	32 (25,4)	0,060
Наличие t(9;22)(q34;q11)/ <i>BCR-ABL1</i> , n (%)	2 (13,3)	0	0,003
Наличие t(1;19)(q23;p13)/ <i>TCF3-PBX1</i> , n (%)	1 (6,7)	4 (3,1)	0,967
Наличие перестроек 11q23/ <i>MLL</i>	0	1 (0,8)	0,198
Группа цитогенетического риска, n (%): низкая (n = 48) промежуточная (n = 91) высокая (n = 3)	0 13 (86,7) 2 (13,3)	48 (38,1) 77 (61,1) 1 (0,8)	< 0,001
Более 1000 бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии, n (%)	2 (13,3)	6 (4,8)	0,438
М3-статус костного мозга на 15-й день терапии, n (%)	6 (40,0)	12 (9,5)	0,003
Отсутствие ремиссии на 36-й день терапии, n (%)	4 (26,7)	3 (2,4)	< 0,001
МОБ на 15-й день терапии, n (%)*: < 0,1 % 0,1–10 % ≥ 10 %	2 (18,2) 4 (36,4) 5 (45,4)	42 (40,0) 50 (47,6) 13 (12,4)	0,014
МОБ на 36-й день терапии, n (%): < 0,1 % ≥ 0,1 %	4 (33,3) 8 (66,7)	93 (86,9) 14 (13,1)	< 0,001
МОБ на 85-й день терапии, n (%): < 0,01 % ≥ 0,01 %	7 (58,3) 5 (41,7)	99 (93,4) 7 (6,6)	0,001

Примечание. МОБ – минимальная остаточная болезнь. *Определение МОБ на 15, 36 и 85-й дни терапии проведено только у части пациентов (подробно см. в разделе «Материалы и методы»).

Здесь и в табл. 4–10: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$).

$p < 0,001$) и более высокой КВР ($0,73 \pm 0,27$ и $0,06 \pm 0,03$ соответственно; $p < 0,001$) (рис. 5). В этой группе больных делеция *IKZF1* являлись независимым фактором, снижающим БСВ (ОР 6,172; 95 % ДИ 1,834–20,767; $p = 0,003$) (табл. 7) и увеличивающим риск рецидива (ОР 16,303; 95 % ДИ 3,324–79,965; $p = 0,015$) (табл. 8), но не влияющим на риск смерти (ОР 1,386; 95 % ДИ 0,192–10,004; $p = 0,746$) (табл. 9).

Важно отметить, что даже при включении в многофакторную модель такого мощного показателя, как МОБ, делеция *IKZF1* сохраняли свое независимое прогно-

стическое значение по влиянию на БСВ, ОВ и риск рецидива (табл. 10). А внутри группы больных с делециями *IKZF1*, несмотря на малое количество наблюдений, результаты определения МОБ на 36-й и 85-й дни терапии позволили разделить больных на группы с разным прогнозом. Так, при величине МОБ менее 0,1 % на 36-й день БСВ пациентов с делециями *IKZF1* составила $0,67 \pm 0,27$, тогда как при более высокой МОБ – 0 ($p = 0,046$). А при любом положительном результате на 85-й день БСВ пациентов с делециями *IKZF1* также была существенно ниже по сравнению

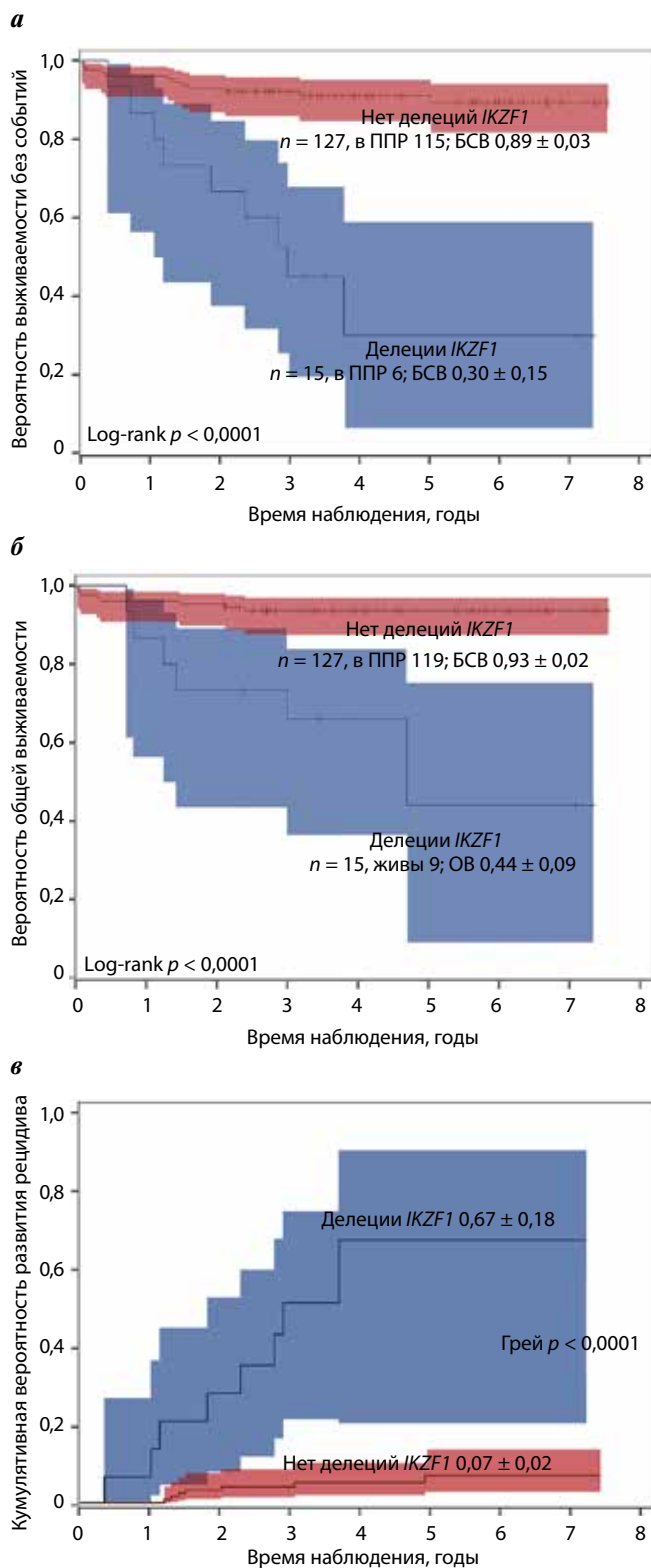


Рис. 2. Прогностическое значение делеций *IKZF1* в общей группе пациентов: а — бессобытийная выживаемость (БСВ) в зависимости от наличия делеций *IKZF1*; б — общая выживаемость в зависимости от наличия делеций *IKZF1*; в — кумулятивная вероятность развития рецидива. Медиана времени наблюдения 4,2 года. Здесь и на рис. 3–5: ППР — полная продолжающаяся ремиссия

с МОБ-негативными пациентами этой же группы (0 и $0,69 \pm 0,19$ соответственно; $p = 0,036$).

Обсуждение

Для выявления делеций *IKZF1* можно использовать разные методики: исследование спектра однонуклеотидных полиморфизмов (SNP array) [19], микроматричный анализ на чипах высокой плотности [26], прямое секвенирование [11], MLPA [43], ПЦР с детекцией методом капиллярного электрофореза [44]. Проведенные сравнительные исследования показали сходные результаты при использовании разных методов [11, 24]. Мы применили метод MLPA, который ранее хорошо зарекомендовал себя для выявления делеций *IKZF1* [24, 27, 43]. Он технически легко выполним и не требует специального оборудования, кроме амплификатора для ПЦР и оборудования для капиллярного электрофореза (в нашем случае — генетического анализатора ABI Prism 3130).

Выявленная нами частота делеций *IKZF1* у больных ВП-ОЛЛ (10,6 %) оказалась несколько ниже, чем данные, полученные в Швеции (15,0 %) [45], Нидерландах (13,7 %) [11], Италии (13,2 %) [27] и Германии (12,1 %) [24], но близка к результатам, опубликованным исследователями из Тайваня (10,7 %) [44]. В то же время у детей с ОЛЛ в Чехии была получена даже более низкая частота распространенности делеций *IKZF1* (6,8 %) [46]. Скорее всего, выявленные различия связаны с географическими особенностями вследствие разного этнического состава населения.

Опубликованные данные о спектре делеций *IKZF1* показали, что наиболее частыми являются делеции экзонов 4–7 и всего гена (экзоны 1–8), на долю которых суммарно приходится около 70 % всех делеций [17, 24, 27]. Наши данные показали несколько меньшую относительную частоту этих наиболее частых вариантов, которые суммарно были выявлены у 47 % больных. У наших пациентов 2 самыми частыми вариантами были делеции экзонов 2–7 и 4–7, обнаруженные в 26,7 % случаев каждая, а делеция всего гена встречалась несколько реже — у 20,0 % пациентов. Причиной полученных различий может быть относительно небольшое число выявленных нами случаев с делецией *IKZF1*. Однако этот вопрос требует отдельного изучения на большей выборке больных.

Неоднократно в рамках разных терапевтических протоколов показано, что делеции гена *IKZF1* независимо от их типа и количества вовлеченных экзонов [13] являются фактором, ассоциированным с неблагоприятным исходом при *BCR-ABL1*-негативном ВП-ОЛЛ у детей [10, 11, 24, 26, 27, 45]. Наши данные подтвердили эти более ранние находки. Для детей, получавших лечение по протоколу ALL-MB 2008, наличие делеций в гене *IKZF1* являлось независимым прогностическим фактором, существенно снижающим показатели БСВ и ОВ, в первую очередь за счет повышения вероятности рецидива.

На сегодняшний день особый интерес для исследователей представляет группа «другие В-линейные ОЛЛ», что связано, с одной стороны, с отсутствием

Таблица 4. Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение неблагоприятных событий у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников

Показатель	Число пациентов	Число событий	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	75	9	Референтное	—	0,373			
Женский	66	11	1,493	0,618—3,609				
Возраст								
Младше 10 лет	115	12	Референтное	—	0,008	Референтное	—	0,479
Старше 10 лет	26	8	3,348	1,368—8,195		1,628	0,422—6,280	
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	105	9	Референтное	—	0,001	Референтное	—	0,010
Более 30 × 10 ⁹ /л	36	11	4,688	1,921—11,436		3,493	1,349—9,042	
Нейролейкоз								
Нет	118	15	Референтное	—	0,255			
Есть	23	5	1,800	0,654—4,957				
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	83	11	Референтное	—	0,652			
4 см и более	58	9	1,225	0,507—2,957				
Группа цитогенетического риска								
Низкая	48	4	Референтное	—	0,040	Референтное	—	0,996
Промежуточная	90	14						
Высокая	3	2	2,699	1,047—6,956		1,003	0,290—3,471	
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	62	4	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,595
Промежуточная	64	7						
Высокая	15	9	4,556	2,296—9,044		1,351	0,518—3,520	
Группа риска по NCI								
Низкая	95	7	Референтное	—	0,001	Референтное	—	0,953
Высокая	46	13	4,782	1,900—12,039		0,963	0,275—3,378	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	133	17	Референтное	—	0,033	Референтное	—	0,727
Более 1000	8	3	3,833	1,117—13,156		0,794	0,184—3,418	
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	106	7	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	< 0,001
M2	17	3						
M3	18	10	3,522	2,141—5,795		2,873	1,708—4,830	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	134	16	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,675
Нет	7	4	7,259	2,406—21,904		0,749	0,194—2,890	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	126	11	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,001
Есть	15	9	9,017	3,702—21,965		4,755	1,856—12,185	

Таблица 5. Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение рецидивов у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников

Показатель	Число пациентов	Число рецидивов	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	75	6	Референтное	—	0,230			
Женский	66	9	1,886	0,670—5,311				
Возраст								
Младше 10 лет	115	10	Референтное	—	0,083			
Старше 10 лет	26	5	2,586	0,883—7,568				
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	105	7	Референтное	—	0,003	Референтное	—	0,006
Более 30 × 10 ⁹ /л	36	8	4,780	1,711—13,351		4,975	1,593—15,542	
Нейролейкоз								
Нет	118	10	Референтное	—	0,064			
Есть	23	5	2,758	0,941—8,079				
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	83	9	Референтное	—	0,988			
4 см и более	58	6	1,008	0,359—2,833				
Группа цитогенетического риска								
Низкая	48	3	Референтное	—	0,038	Референтное	—	0,870
Промежуточная	90	10						
Высокая	3	2	3,247	1,066—9,892		1,130	0,262—4,873	
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	62	3	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,999
Промежуточная	64	6						
Высокая	15	6	4,414	1,996—9,758		1,001	0,271—2,806	
Группа риска по NCI								
Низкая	95	6	Референтное	—	0,008	Референтное	—	0,536
Высокая	46	9	4,101	1,453—11,575		0,621	0,137—4,547	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	133	12	Референтное	—	0,006	Референтное	—	0,336
Более 1000	8	3	6,008	1,683—21,449		2,125	0,458—9,868	
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	106	5	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	< 0,001
M2	17	3						
M3	18	7	3,656	2,057—6,497		3,311	1,796—6,103	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	134	13	Референтное	—	0,030	Референтное	—	0,367
Нет	7	2	5,217	1,172—23,218		0,446	0,076—2,575	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	126	7	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	< 0,001
Есть	15	8	13,942	4,999—38,885		9,083	3,119—26,451	

Таблица 6. Анализ прогностических показателей, влияющих на риск смерти у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников

Показатель	Число па- циентов	Число смертей	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относитель- ный риск	95 % доверитель- ный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	75	7	Референтное	—	0,967			
Женский	66	6	1,023	0,343–3,051				
Возраст								
Младше 10 лет	115	6	Референтное	—	0,002	Референтное	—	0,115
Старше 10 лет	26	7	5,657	1,900–16,841		2,631	0,790–8,764	
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	105	5	Референтное	—	0,003	Референтное	—	0,032
Более 30 × 10 ⁹ /л	36	8	5,603	1,818–17,266		3,598	1,120–11,564	
Нейролейкоз								
Нет	118	10	Референтное	—	0,476			
Есть	23	3	1,599	0,439–5,821				
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	83	7	Референтное	—	0,630			
4 см и более	58	6	1,308	0,439–3,985				
Группа цитогенетического риска								
Низкая	48	2	Референтное	—	0,021	Референтное	—	0,430
Промежуточная	90	9						
Высокая	3	2	3,933	1,235–12,532		1,844	0,403–8,432	
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	62	3	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,543
Промежуточная	64	3						
Высокая	15	7	4,631	2,003–10,706		0,665	0,178–2,480	
Группа риска по NCI								
Низкая	95	3	Референтное	—	0,002	Референтное	—	0,771
Высокая	46	10	8,002	2,200–29,228		0,695	0,060–8,036	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	133	11	Референтное	—	0,091			
Более 1000	8	2	3,688	0,810–16,782				
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	106	5	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,007
M2	17	1						
M3	18	7	3,430	1,846–6,371		2,500	1,183–4,870	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	134	9	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,432
Нет	7	4	11,736	3,575–38,525		1,892	0,386–9,286	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	126	7	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,015
Есть	15	6	8,280	2,768–24,770		4,208	1,322–13,393	

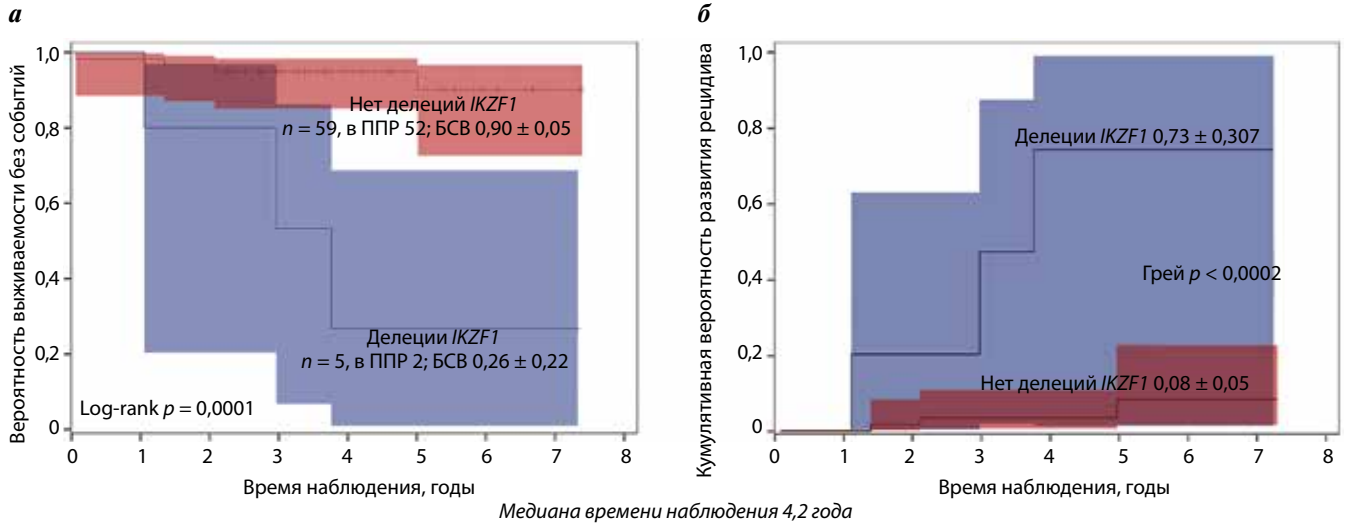


Рис. 3. Прогностическое значение делеций IKZF1 в группе промежуточного риска: а — бессобытийная выживаемость (БСВ) в зависимости от наличия делеций IKZF1; б — кумулятивная вероятность развития рецидива

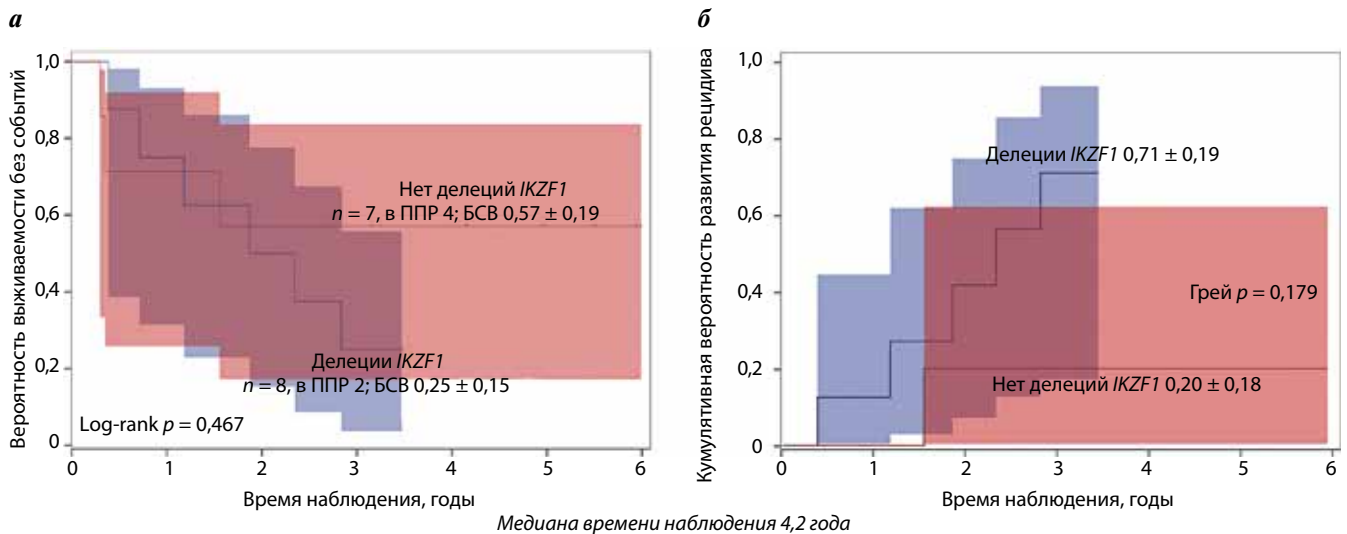


Рис. 4. Прогностическое значение делеций IKZF1 в группе высокого риска: а — бессобытийная выживаемость (БСВ) в зависимости от наличия делеций IKZF1; б — кумулятивная вероятность развития рецидива

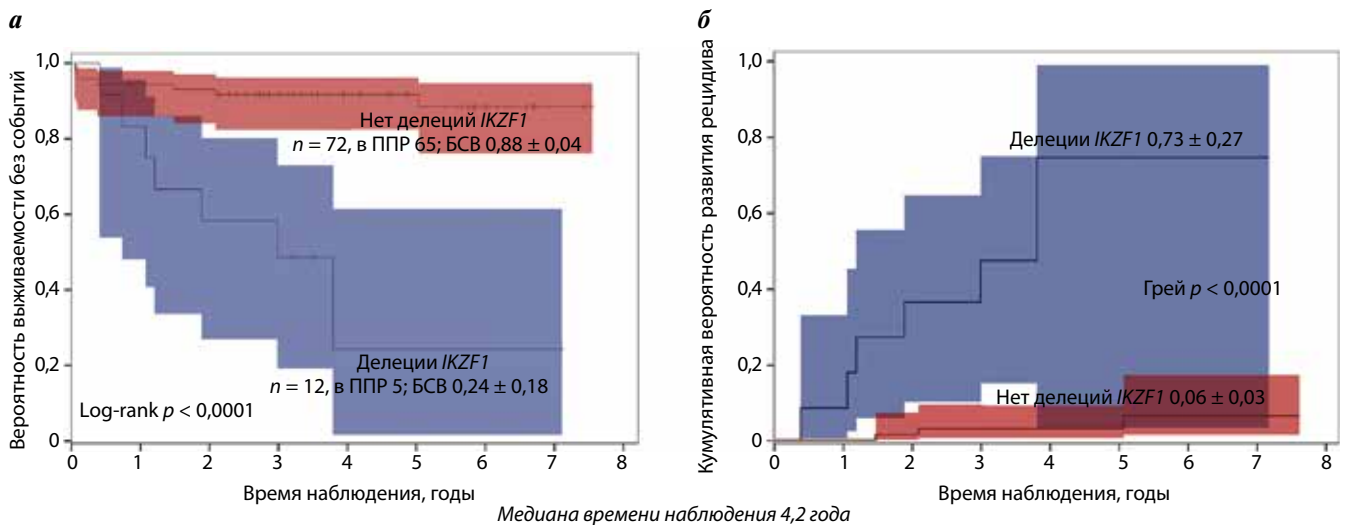


Рис. 5. Прогностическое значение делеций IKZF1 в группе «другие В-линейные острые лимфобластные лейкозы»: а — бессобытийная выживаемость (БСВ) в зависимости от наличия делеций IKZF1; б — кумулятивная вероятность развития рецидива

Таблица 7. Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение неблагоприятных событий у пациентов группы «другие В-линейные острые лимфобластные лейкозы»

Показатель	Число пациентов	Число событий	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	46	6	Референтное	—	0,428			
Женский	37	7	1,557	0,521—4,649				
Возраст								
Младше 10 лет	65	7	Референтное	—	0,016	Референтное	—	0,476
Старше 10 лет	18	6	3,833	1,284—11,437		1,646	0,417—6,493	
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	59	6	Референтное	—	0,025	Референтное	—	0,147
Более 30 × 10 ⁹ /л	24	7	3,501	1,169—10,491		2,415	0,735—7,918	
Нейролейкоз								
Нет	69	9	Референтное	—	0,173			
Есть	14	4	2,268	0,698—7,367				
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	45	6	Референтное	—	0,492			
4 см и более	38	7	1,466	0,492—4,364				
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	33	2	Референтное	—	0,002	Референтное	—	0,644
Промежуточная	40	6						
Высокая	10	5	3,986	1,675—9,483		1,330	0,397—4,458	
Группа риска по NCI								
Низкая	54	5	Референтное	—	0,022	Референтное	—	0,464
Высокая	29	8	3,737	1,214—11,501		0,480	0,067—3,418	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	78	11	Референтное	—	0,099			
Более 1000	5	2	3,563	0,786—16,148				
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	60	5	Референтное	—	0,001	Референтное	—	0,019
M2	9	1						
M3	14	7	2,944	1,599—5,416		2,183	1,140—4,182	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	77	9	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,903
Нет	6	4	9,538	2,866—31,739		1,109	0,212—5,792	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	71	6	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,003
Есть	12	7	9,882	3,223—30,299		6,172	1,834—20,767	

Таблица 8. Анализ прогностических показателей, влияющих на риск возникновения рецидивов у пациентов группы «другие В-линейные острые лимфобластные лейкозы»

Показатель	Число пациентов	Число рецидивов	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	46	3	Референтное	—	0,147			
Женский	37	7	2,799	0,696—11,252				
Возраст								
Младше 10 лет	65	6	Референтное	—	0,220			
Старше 10 лет	18	3	2,384	0,595—9,554				
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	59	4	Референтное	—	0,037	Референтное	—	0,195
Более 30 × 10 ⁹ /л	24	5	4,101	1,093—15,394		3,092	0,562—17,029	
Нейролейкоз								
Нет	69	5	Референтное	—	0,034	Референтное	—	0,015
Есть	14	4	4,155	1,115—15,487		6,476	1,448—28,964	
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	45	4	Референтное	—	0,481			
4 см и более	38	5	1,605	0,431—5,981				
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	33	1	Референтное	—	0,006	Референтное	—	0,838
Промежуточная	40	5						
Высокая	10	3	4,466	1,541—12,941		0,829	0,139—4,962	
Группа риска по NCI								
Низкая	54	4	Референтное	—	0,088			
Высокая	29	5	3,163	0,843—11,871				
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	78	7	Референтное	—	0,024	Референтное	—	0,858
Более 1000	5	2	6,179	1,276—29,913		0,793	0,062—10,141	
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	60	3	Референтное	—	0,001	Референтное	—	0,016
M2	9	1						
M3	14	5	3,465	1,639—7,327		2,786	1,120—6,411	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	77	7	Референтное	—	0,011	Референтное	—	0,443
Нет	6	2	7,817	1,598—38,121		0,434	0,052—3,661	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	71	3	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	0,001
Есть	12	6	20,668	4,946—86,361		16,303	3,324—79,965	

Таблица 9. Анализ прогностических показателей, влияющих на риск смерти у пациентов группы «другие В-линейные острые лимфобластные лейкозы»

Показатель	Число пациентов	Число смертей	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>	относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Пол								
Мужской	46	4	Референтное	—	0,770			
Женский	37	4	1,229	0,307—4,917				
Возраст								
Младше 10 лет	65	3	Референтное	—	0,008	Референтное	—	0,098
Старше 10 лет	18	5	6,976	1,664—29,246		3,747	0,785—17,880	
Инициальный лейкоцитоз								
Менее 30 × 10 ⁹ /л	59	3	Референтное	—	0,043	Референтное	—	0,280
Более 30 × 10 ⁹ /л	24	5	4,386	1,046—18,382		2,564	0,465—14,139	
Нейролейкоз								
Нет	69	6	Референтное	—	0,514			
Есть	14	2	1,647	0,332—8,164				
Размер селезенки ниже реберной дуги								
Менее 4 см	45	3	Референтное	—	0,330			
4 см и более	38	5	2,037	0,487—8,527				
Группа риска по протоколу ALL-MB 2008								
Стандартная	33	2	Референтное	—	0,022	Референтное	—	0,424
Промежуточная	40	2						
Высокая	10	4	3,420	1,190—9,833		0,536	0,116—2,470	
Группа риска по NCI								
Низкая	54	2	Референтное	—	0,026	Референтное	—	0,584
Высокая	29	6	6,144	1,239–30,474		0,370	0,011—13,030	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
Менее 1000	78	6	Референтное	—	0,036	Референтное	—	0,265
Более 1000	5	2	5,530	1,113—27,461		2,622	0,481—14,291	
Статус костного мозга на 15-й день терапии								
M1	60	3	Референтное	—	0,006	Референтное	—	0,802
M2	9	0						
M3	14	5	2,952	1,356—6,428		0,772	0,101—5,887	
Достижение ремиссии к 36-му дню терапии								
Есть	77	4	Референтное	—	< 0,001	Референтное	—	< 0,001
Нет	6	4	17,417	4,277—70,932		14,373	3,293—62,728	
Делеции в гене IKZF1								
Нет	71	4	Референтное	—	0,008	Референтное	—	0,746
Есть	12	4	6,479	1,615—26,001		1,386	0,192—10,004	

Таблица 10. Многофакторный анализ прогностических показателей с учетом делеций *IKZF1* и минимальной остаточной болезни на 15, 36 и 85-й дни терапии у 115 пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников

Показатель	Относительный риск	95 % доверительный интервал	<i>p</i>
Бессобытийная выживаемость			
Величина МОБ на 15-й день терапии более 10 %	4,327	1,597–11,725	0,004
Величина МОБ на 85-й день терапии более 0,01 %	3,934	1,176–13,161	0,026
Делеции в гене <i>IKZF1</i>	6,966	1,834–20,767	0,003
Риск развития рецидива			
Величина МОБ на 15-й день терапии более 10%	4,632	1,734–12,379	0,002
Делеции в гене <i>IKZF1</i>	8,688	2,551–29,593	0,001
Общая выживаемость			
Величина МОБ на 15-й день терапии более 10%	17,286	2,178–137,174	0,007
Делеции в гене <i>IKZF1</i>	7,228	1,509–34,613	0,013

Примечание. МОБ – минимальная остаточная болезнь.

каких-либо известных прогностических факторов у этой категории больных, а с другой — со значительной долей этих больных среди всех случаев ВП-ОЛЛ. Проводится интенсивный поиск различных маркеров (*BCR-ABL1*-подобный профиль экспрессии генов, делеции генов *PAX5*, *IKZF1*, *RBI*, *ERG*, *CDKN2A/B*, внутрихромосомная амплификация 21), которые помогли бы лучше охарактеризовать эту гетерогенную группу больных. И одним из таких маркеров может являться делеция *IKZF1*. Частота выявления делеций *IKZF1* среди «других В-линейных ОЛЛ» несколько выше, чем в общей группе ВП-ОЛЛ у детей, но и здесь делеции *IKZF1* — важный прогностический фактор, ассоциированный с неблагоприятным исходом [27, 45].

С точки зрения стратификации пациентов наиболее важным оказалось влияние делеций *IKZF1* на прогноз ОЛЛ в группе промежуточного риска при лечении по протоколу ALL-MB 2008. Пациенты без делеций *IKZF1* в группе промежуточного риска имели БСВ, сравнимую с группой стандартного риска, в то время как при наличии делеций исход ОЛЛ был крайне негативным. Таким образом, введение результатов определения данной молекулярно-генетической аберрации в систему стратификации позволит более адекватно выделять группу высокого риска. Важно отметить, что более половины (57,1 %) больных,

не достигших ремиссии к 36-му дню терапии, имели делеции *IKZF1*.

Нами были получены убедительные данные о взаимосвязи делеций *IKZF1* с показателями ответа на терапию по протоколу ALL-MB 2008. Больные с делециями *IKZF1* статистически значимо чаще имели МЗ-статус костного мозга на 15-й день терапии, высокий уровень МОБ на 15, 36 и 85-й дни терапии. Сходные результаты о связи делеций с высоким уровнем МОБ были получены и другими исследователями [24, 27, 45, 46]. Ранее нами было показано, что, как и в рамках других зарубежных протоколов терапии ОЛЛ, при лечении по протоколу ALL-MB 2008 величина МОБ на разных этапах терапии является одним из наиболее значимых факторов негативного прогноза [38]. Однако даже при наличии такого мощного фактора риска, как МОБ, делеции *IKZF1* сохраняли свое независимое прогностическое значение при ВП-ОЛЛ у детей. Интересно, что внутри групп как с делециями *IKZF1*, так и без них высокий уровень МОБ имел важное прогностическое значение.

Ранее в работе Е. Waanders и соавт. [12] было предложено совместно использовать результаты определения МОБ и выявления делеций *IKZF1* для выделения группы высокого риска. Однако в нашем исследовании добавление больных с делециями *IKZF1* к пациентам с высоким уровнем МОБ на 36-й день терапии дополнительно позволило прогнозировать развитие рецидива лишь у 1 больного. Возможно, при увеличении мощности исследования совместное применение 2 критериев высокого риска будет представляться более обоснованным.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного анализа нами показано, что делеции гена *IKZF1* являются независимым фактором, ухудшающим прогноз ВП-ОЛЛ у детей. Наиболее ярко это проявилось в группе промежуточного риска, а также в группе «другие В-линейные ОЛЛ». Больные с делециями *IKZF1* имели более медленный ответ на терапию. Прогностическое значение делеций *IKZF1* сохранялось в разных подгруппах пациентов, выделенных по другим факторам риска. Мы считаем, что тестирование на статус гена *IKZF1* должно быть обязательным для всех детей с ВП-ОЛЛ. В то же время полученные результаты должны быть уточнены в рамках многоцентровой группы терапии ОЛЛ с включением большего числа больных.

Благодарности. Авторы выражают благодарность всем врачам и медицинским сестрам отдела детской онкологии и гематологии ГБУЗ СО ОДКБ № 1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа поддержана постановлением № 211 Правительства Российской Федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Olsson L., Johansson B. Ikaros and leukaemia. *Br J Haematol* 2015;169(4): 479–91. DOI: 10.1111/bjh.13342. PMID: 25753742.
2. Payne K.J., Huang G., Sahakian E. et al. Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation. *J Immunol* 2003;170(6):3091–8. PMID: 12626565.
3. Francis O.L., Payne J.L., Su R.J., Payne K.J. Regulator of myeloid differentiation and function: the secret life of Ikaros. *World J Biol Chem* 2011;2(6):119–25. DOI: 10.4331/wjbc.v2.i6.119. PMID: 21765977.
4. Morgan B., Sun L., Avitahl N. et al. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* 1997;16(8):2004–13. DOI: 10.1093/emboj/16.8.2004. PMID: 9155026.
5. Kelley C., Ikeda T., Koipally J. et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 1998;8(9):508–15. PMID: 9560339.
6. Iacobucci I., Iraci N., Messina M. et al. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2012;7(7):e40934. DOI: 10.1371/journal.pone.0040934. PMID: 22848414.
7. Gene: IKZF1. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000185811;r=7:50304124-50405101 (last access date 02.12.2016).
8. Koipally J., Georgopoulos K. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 2000;275(26):19594–602. DOI: 10.1074/jbc.M000254200. PMID: 10766745.
9. Joshi I., Yoshida T., Jena N. et al. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* 2014;15(3):294–304. DOI: 10.1038/ni.2821. PMID: 24509510.
10. Mullighan C., Su X., Zhang J. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 2009;360(5):470–80. DOI: 10.1056/NEJMoa0808253. PMID: 19129520.
11. Kuiper R., Waanders E., van der Velden V. et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010;24(7):1258–64. DOI: 10.1038/leu.2010.87. PMID: 20445578.
12. Waanders E., van der Velden V., van der Schoot C. et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79 % of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(2):254–8. DOI: 10.1038/leu.2010.275. PMID: 21102428.
13. Roberts K., Li Y., Payne-Turner D. et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(11):1005–15. DOI: 10.1056/NEJMoa1403088. PMID: 25207766.
14. Olsson L., Albitar F., Castor A. et al. Cooperative genetic changes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with deletions or mutations of IKZF1. *Genes Chromosomes Cancer* 2015;54(5):315–25. DOI: 10.1002/gcc.22245. PMID: 25727050.
15. Mullighan C.G., Miller C.B., Radtke I. et al. BCR-ABL1-lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110–4. DOI: 10.1038/nature06866. PMID: 18408710.
16. Olsson L., Castor A., Behrendtz M. et al. Deletions of IKZF1 and SPRED1 are associated with poor prognosis in a population-based series of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia diagnosed between 1992 and 2011. *Leukemia* 2014;28(2):302–10. DOI: 10.1038/leu.2013.206. PMID: 23823658.
17. Boer J., van der Veer A., Rizopoulos D. et al. Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. *Leukemia* 2016;30(1):32–8. DOI: 10.1038/leu.2015.199. PMID: 26202931.
18. Kuiper R.P., Schoenmakers E.F., van Reijmersdal S.V. et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21(6):1258–66. DOI: 10.1038/sj.leu.2404691. PMID: 17443227.
19. Mullighan C., Goorha S., Radtke I. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758–64. DOI: 10.1038/nature05690. PMID: 17344859.
20. Martinelli G., Iacobucci I., Storlazzi C.T. et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5202–7. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.6408. PMID: 19770381.
21. Nakayama H., Ishimaru F., Avitahl N. et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1999;59(16):3931–4. PMID: 10463586.
22. van der Veer A., Waanders E., Pieters R. et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood* 2013;122(15):2622–9. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462358. PMID: 23974192.
23. Buitenkamp T., Pieters R., Gallimore N. et al. Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia* 2012;26(10):2204–11. DOI: 10.1038/leu.2012.84. PMID: 22441210.
24. Dorge P., Meissner B., Zimmermann M. et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica* 2013;98(3):428–32. DOI: 10.3324/haematol.2011.056135. PMID: 22875627.
25. Jaeger R., Gisslinger H., Passamonti F. et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(7):1290–8. DOI: 10.1038/leu.2010.99. PMID: 20508609.
26. Chen I.M., Harvey R., Mullighan C. et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group Study. *Blood* 2012;119(15):3512–22. DOI: 10.1182/blood-2011-11-394221. PMID: 22368272.
27. Palmi C., Valsecchi M.G., Longinotti G. et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* 2013;98(8):1226–31. DOI: 10.3324/haematol.2012.075432. PMID: 23585525.
28. Öfverholm I., Tran A.N., Heyman M. et al. Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia* 2013;27(9):1936–9. DOI: 10.1038/leu.2013.92. PMID: 23538749.
29. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451–8. PMID: 188440.
30. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6. PMID: 7564526.
31. Béné M.C., Nebe T., Bettelheim P. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus

- proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567–74. DOI: 10.1038/leu.2010.312. PMID: 21252983.
32. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Ed. by: L. Shaffer, N. Tommerup. Basel: Karger, 2005.
33. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Ed. by: L. Schaffer, M. Slovak, L. Campbell. Basel: Karger, 2009.
34. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Ed. by L. Schaffer, J. McGovan-Jordan, M. Schmid. Basel: Karger, 2013.
35. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2010;5(2):46–54. [Tsaur G.A., Nasedkina T.V., Popov A.M. et al. Prediction of outcome in infants acute lymphoblastic leukemia by time to achievement of molecular remission. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2010;5(2):46–54. (In Russ.)].
36. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2011;(4):107–11. [Tsaur G.A., Druy A.E., Popov A.M. et al. Microfluidic biochips for RNA quantity and quality evaluation in patients with oncological disorders. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoj akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Research* 2011;(4):107–11. (In Russ.)].
37. Литвинов Д.В., Карелин А.Ф., Романова К.И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор.Ру* 2015;(10):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A.F., Romanova K.I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: current possibilities and unsolved problems. *Doctor.Ru* 2015;(10):30–7. (In Russ.)].
38. Smith M., Arthur D., Camitta B. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14(1):18–24. DOI: 10.1200/jco.1996.14.1.18. PMID: 8558195.
39. Moorman A.V., Ensor H.M., Richards S.M. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):429–38. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70066-8. PMID: 20409752.
40. Цаур Г.А., Попов А.М., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2016;11(1):62–74. [Tsaur G.A., Popov A.M., Fechina L.G., Rumyantsev S.A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(1):62–74. (In Russ.)].
41. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(5):31–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Methodology of flow cytometry application for minimal residual disease monitoring in childhood CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics* 2012;(5):31–5. (In Russ.)].
42. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью. *Онкогематология* 2015;10(4):44–55. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(4):44–55. (In Russ.)].
43. Schwab C., Jones L., Morrison H. et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49(12):1104–13. DOI: 10.1002/gcc.20818. PMID: 20815030.
44. Yang Y., Hung C., Chen J. et al. IKZF1 deletions predict a poor prognosis in children with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: a multicenter analysis in Taiwan. *Cancer Sci* 2011;102(10):1874–81. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02031.x. PMID: 21740479.
45. Olsson L., Ivanov Öfverholm I., Noren-Nystrom U. et al. The clinical impact of IKZF1 deletions in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia is independent of minimal residual disease stratification in Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology treatment protocols used between 1992 and 2013. *Br J Haematol* 2015;170(6):847–58. DOI: 10.1111/bjh.13514. PMID: 26018335.
46. Volejnikova J., Mejstrikova E., Dörge P. et al. Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(3):420–7. DOI: 10.1002/pbc.24299. PMID: 22997141.

ABO-несовместимость при аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток: анализ 15-летнего опыта НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой

М.А. Кучер, Д.Э. Певцов, О.А. Макаренко, А.Л. Алянский, Н.Е. Иванова, М.А. Эстрина, Е.В. Бабенко, Б.Б. Баховадинов, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12

Контакты: Максим Анатольевич Кучер doctorkucher@yandex.ru

Введение. Наличие несовместимости по антигенам эритроцитов системы ABO при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) может являться провоцирующим фактором в развитии иммунологических осложнений, снижать эффективность лечения.

Материалы и методы. В исследование, проводившееся с мая 1999 г. по декабрь 2015 г. в НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, включен 1131 пациент с гематологическими, онкологическими и наследственными заболеваниями, которым было выполнено 1428 аллоТГСК: от неродственного донора — 814 (57,0 %), от родственного — 344 (24,1 %); от гаплоидентичного — 267 (18,7 %), из пуповинной крови — у 3 (0,2 %). Возраст больных составил 0–76 лет, медиана — 25 лет.

Результаты. В 52,6 % случаев ($n = 780$) определялась ABO-несовместимость: большая — в 37,8 % ($n = 295$); малая — в 45,4 % ($n = 354$); комбинированная — в 16,8 % ($n = 131$). Наличие ABO-несовместимости при аллоТГСК не оказывало влияния на общую выживаемость ($p = 0,56$) и увеличение частоты острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) ($p = 0,2$). Выявлено увеличение частоты острой РТПХ при комбинации немиелоаблативного режима кондиционирования и ABO-несовместимости — 30,8 % по сравнению с миелоаблативным — 15,3 % ($p = 0,002$).

Заключение. Наличие ABO-несовместимости не является лимитирующим фактором при проведении аллоТГСК, однако предъявляет высокие требования к профилактике иммунных осложнений и гемотрансфузионной сопроводительной терапии.

Ключевые слова: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ABO-несовместимость

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-49-55

ABO-incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 15-years experience of R.M. Gorbacheva Memorial Research Institute for Children Oncology, Hematology and Transplantation

M.A. Kucher, D.E. Pevtsov, O.A. Makarenko, A.L. Alyanskiy, N.E. Ivanova, M.A. Estrina, E.V. Babenko, B.B. Bakhovadinov, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasiev

R.M. Gorbacheva Memorial Research Institute for Children Oncology, Hematology and Transplantation,
Acad. I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 12 Rentgena St.,
Saint Petersburg, 197022, Russia

Introduction. ABO-incompatibility in different types of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) may be an additional aggravating factor for the development of immunological complications and decrease treatment efficacy.

Materials and methods. From May 1999 to December 2015 in R.M. Gorbacheva Memorial Research Institute for Children Oncology, Hematology and Transplantation 1131 patients with malignancies and hereditary diseases were included to the study, which were performed 1428 allogeneic HSCT: allogeneic unrelated — 814 (57.0 %), allogeneic related — 344 (24.1 %), haploidentical — 267 (18.7 %), umbilical cord blood in 3 patients (0.2 %). Age was 0–76 years, median — 25 years.

Results. In 54.6 % of cases ($n = 780$) ABO-incompatibility was determined: major — 37.8 % ($n = 295$); minor — 45.4 % ($n = 354$); combined — 16.8 % ($n = 131$). ABO-incompatibility in allogeneic HSCT did not influence overall survival ($p = 0.56$), frequency of acute graft-versus-host disease (GVHD) ($p = 0.2$). There was an increased frequency of acute GVHD in combination with reduced intensity conditioning regimens and ABO-incompatibility (30.8 %) compared with myeloablative regimens (15.3 %; $p = 0.002$).

Conclusion. The presence of ABO-incompatibility is not a limiting factor to perform allogeneic HSCT, however, it demands high quality prophylaxis and sophisticated transfusion therapy to prevent immune complications.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, ABO-incompatibility

Введение

В последние годы аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) стала рутинным методом лечения целого ряда онкологических, гематологических и наследственных заболеваний [1]. К 2012 г. общее число выполненных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у взрослых и детей превысило 1 млн [2].

Наиболее важным фактором успеха при проведении аллоТГСК является совместимость по HLA-системе тканевых антигенов между донором и реципиентом гемопоэтических стволовых клеток. От степени совместимости во многом зависит вероятность приживления трансплантата, развития острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

На сегодняшний день недостаточно точно определена роль АВ0-несовместимости, которая встречается в 25–50 % случаев, в качестве прогностического фактора развития осложнений при проведении аллоТГСК [3, 4]. Результаты исследований указывают на то, что АВ0-несовместимость способствует росту частоты осложнений, таких как острая РТПХ [5], острый и отсроченный гемолиз, парциальная красноклеточная аплазия (ПККА) [6], аутоиммунная гемолитическая анемия [7]; уменьшает эффективность лечения за счет удлинения сроков приживления трансплантата [8], увеличения риска его неприживления [9], повышения летальности и снижения качества жизни [10, 11]. В то же время исследования, посвященные АВ0-несовместимости, часто имеют прямо противоположные результаты и не выявляют ее негативного влияния на исход лечения [5, 12, 13]. Неоднозначность выводов свидетельствует о необходимости проведения исследований в этой области.

Существует 3 варианта АВ0-несовместимости: малая (20–25 % всех случаев ТГСК), большая (20–25 %) и комбинированная (5 %) (табл. 1).

Материалы и методы

В исследование, проводившееся с мая 1999 г. по декабрь 2015 г. в НИИ детской онкологии, гематологии

и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, включен 1131 пациент с гематологическими, онкологическими и наследственными заболеваниями, которым было выполнено 1428 аллоТГСК: от неродственного донора – 814 (57 %), от родственного – 344 (24,1 %), от гаплоидентичного – 267 (18,7 %), из пуповинной крови – 3 (0,2 %). Возраст больных составил 0–76 лет, медиана – 25 лет. Преобладали пациенты с лейкозами: острый миелобластный лейкоз – 37 % ($n = 602$), острый лимфобластный лейкоз – 30 % ($n = 501$), хронический миелолейкоз – 6 % ($n = 94$). Пациенты с лимфомой Ходжкина ($n = 70$) и неходжкинскими лимфомами ($n = 42$) составили 7 %, миелодиспластическим синдромом – 2 % ($n = 77$), апластической анемией – 1,5 % ($n = 57$), врожденными заболеваниями – 1,5 % ($n = 54$).

При анализе полученных данных использовали общепринятые определения и классификации осложнений после ТГСК [15]. Приживлением трансплантата считали 1-й день повышения абсолютного числа нейтрофилов $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$ в периферической крови в течение 3 последовательных дней без дополнительной стимуляции гемопоэза гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Приживлением эритроидного ростка считали уровень ретикулоцитов $> 1\%$ ($30 \times 10^{12}/\text{л}$) в периферической крови, 100 % донорский химеризм, отсутствие или снижение изогемагглютининов реципиента, независимость от гемотрансфузий. Приживлением мегакариоцитарного ростка считали стойкое повышение уровня тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$ в течение 3 дней и более без трансфузий тромбоцитного концентрата.

ПККА определялась при обнаружении в аспирате костного мозга миелоидного, лимфоидного и мегакариоцитарного ростков, при отсутствии предшественников эритропоэза (эритробластов) и ретикулоцитопении в периферической крови. Диагностику и стадирование острой РТПХ проводили, ориентируясь на общепринятые критерии согласительной конференции по проблемам РТПХ [16].

Определение группы крови осуществляли с помощью стандартных методик в геле (Bio-Rad Laboratories). Для

Таблица 1. Виды несовместимости по антигенам эритроцитов системы АВ0 [14]

Реципиент	Донор			
	0 (I)	A (II)	B (III)	AB (IV)
0 (I)	—	Большая	Большая	Большая
A (II)	Малая	—	Комбинированная	Большая
B (III)	Малая	Комбинированная	—	Большая
AB (IV)	Малая	Малая	Малая	—

Примечание. Малая АВ0-несовместимость определяется при трансфузии реципиенту донорского трансплантата с изоагглютинином α и β (группа донора 0 (I) реципиенту с групповой принадлежностью A (II) или B (III) или группа донора A (II) или B (III) реципиенту с группой AB (IV)); большая АВ0-несовместимость характеризуется наличием в плазме реципиента изоагглютининов к антигенам эритроцитов системы АВ0 донора; при комбинированной АВ0-несовместимости антигены и изоагглютинины присутствуют как в донорском трансплантате, так и у реципиента.

выполнения прямого антиглобулинового теста использовали стандартную гелевую методику (IDLiss Coombs, DC-Screening I, Bio-Rad Laboratories).

В качестве профилактики трансфузионных и иммунных осложнений при большой АВ0-несовместимости перед инфузией трансплантата проводили удаление несовместимых эритроцитов (седиментация с 6 % гидроксипропилакрахмалом), при малой — удаление плазмы путем центрифугирования, при комбинированной применяли сочетание методов.

В случае проведения ТГСК при наличии групповой несовместимости между донором и реципиентом заместительную гемотрансфузионную терапию осуществляли согласно общепринятым рекомендациям [17].

Статистическую обработку данных выполняли с помощью приложения Microsoft Excel 2007 и программы IBM SPSS Statistics v. 13.0, с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, критерия Стьюдента, таблиц сопряженности и критерия χ^2 Пирсона, непараметрического метода сравнения выборок — критерия Манна–Уитни, многофакторного анализа — регрессии Кокса. Общую выживаемость оценивали с помощью метода Каплана–Майера с log-rank-тестом, для сравнения выживаемости в группах использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Различия между отдельными показателями считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении аллоТГСК от родственного, неродственного и гаплоидентичного доноров ($n = 1428$) в 52,6 % случаев ($n = 780$) определялась АВ0-несовместимость, что является несколько более высокой частотой по сравнению с данными мировой литературы в результате вариативности полиморфизма генов у многонационального населения граждан Российской Федерации и значимого числа неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток из международных регистров. Распределение вариантов АВ0-несовместимости соответствовало общим тенденциям: большая — 37,8 % ($n = 295$), малая — 45,4 % ($n = 354$), комбинированная — 16,8 % ($n = 131$). Анализ эффективности аллоТГСК и течения посттрансплантационного периода проводили в зависимости от варианта АВ0-несовместимости. В 4 группах реципиентов гемопоэтических стволовых клеток различия в равной доле отмечали в степени HLA-совместимости, количестве CD34⁺ и источнике трансплантата, что указывает на однородность групп сравнения (табл. 2).

При анализе влияния АВ0-несовместимости на общую выживаемость в зависимости от вида аллоТГСК — от родственного, неродственного, гаплоидентичного доноров, из пуповинной крови — не было получено данных, указывающих на увеличение летальности ($p = 0,56$; $\chi^2 = 2$). Пятилетняя общая выживаемость составила

Таблица 2. Характеристика пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от неродственного и родственного доноров в зависимости от варианта АВ0-несовместимости

Характеристика	Число пациентов					p
	Всего (n = 1158)	AB0-несовместимость				
		совместимы (n = 510)	большая (n = 237)	малая (n = 294)	комбинированная (n = 117)	
Возраст (медиана), лет	24 (0–68)	24 (1–67)	26 (0–62)	26 (0–68)	25 (2–64)	0,4
Пол, мужской/женский	642/516	294/216	126/111	164/130	58/59	0,37
Пол донора, мужской/женский	722/398	318/177	144/83	187/83	73/39	0,97
Статус заболевания до ТГСК: ремиссия рецидив/прогрессирование	836 306	362 143	168 64	222 68	84 31	0,5
Режим кондиционирования: миелоаблативный немиелоаблативный без режима	329 815 14	149 352 9	62 172 3	85 207 2	33 84 0	0,63
HLA-совместимость: полная неполная	977 169	448 55	196 39	232 59	101 16	0,003
Источник трансплантата: КМ ПСКК КМ + ПСКК	497 650 11	253 251 6	93 144 0	108 183 3	43 72 2	0,002
CD34 ⁺ × 10 ⁶ /кг, медиана	5,40	5,24	5,25	5,84	5,66	0,02

Примечание. ТГСК — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; КМ — костный мозг; ПСКК — периферические стволовые клетки крови.

в случае АВ0-совместимых ТГСК 53,4 %, при большой АВ0-несовместимости – 49,2 %, малой – 51,1 %, комбинированной – 49,6 % (рис. 1).

Наличие АВ0-несовместимости при отдельных видах аллоТГСК в контрольных точках Д+100, Д+365, Д+1000 не влияло на общую выживаемость ($p = 0,8$; $\chi^2 = 0,6$ – на примере аллоТГСК от неродственного донора). Мнение и данные авторов относительно негативного эффекта АВ0-несовместимости на общую выживаемость носят противоречивый характер – большинство из них не отмечают ее снижения. Результаты 10-летнего опыта работы ($n = 1108$) французской группы указывают на влияние малой АВ0-несовместимости на общую выживаемость при немиелоаблативных режимах кондиционирования наряду с отсутствием ремиссии и включением антитимоцитарного глобулина (тимоглобулина) > 10 мг/кг в схемы профилактики РТПХ [18].

В настоящем исследовании только малая АВ0-несовместимость при аллоТГСК от родственного ($n = 157$) и гаплоидентичного донора ($n = 79$) являлась фактором риска, оказывающим влияние на 3-летнюю выживаемость ($p = 0,01$; $\chi^2 = 10,3$ и $p = 0,002$; $\chi^2 = 15,3$ соответственно) (рис. 2). Однако стоит отметить небольшую группу наблюдения в данном случае, что требует анализа большей по численности когорты пациентов.

Важный вопрос о влиянии АВ0-несовместимости на частоту возникновения и степень тяжести острой РТПХ остается спорным: в ряде публикаций отмечена более высокая частота острой РТПХ III–IV степени при большой и малой АВ0-несовместимости [8]. С другой

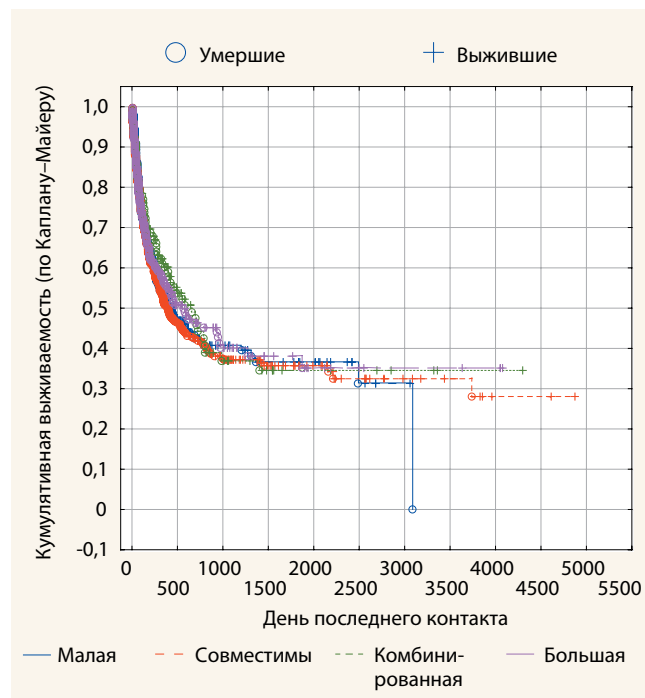


Рис. 1. Общая выживаемость при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от варианта АВ0-несовместимости

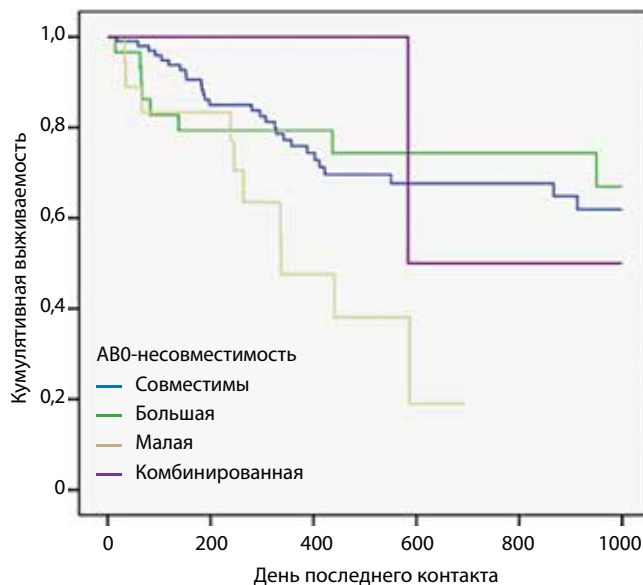


Рис. 2. Общая 3-летняя выживаемость при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от родственного донора в зависимости от АВ0-несовместимости ($p = 0,01$; $\chi^2 = 10,3$)

стороны, группа ученых из Сиэтла по данным Национальной программы доноров костного мозга США не выявила существенной разницы в частоте развития острой РТПХ в зависимости от АВ0-несовместимости [19].

В нашем исследовании у пациентов с аллоТГСК от неродственного, родственного и гаплоидентичного доноров при наличии АВ0-несовместимости не отмечалось увеличения частоты развития острой РТПХ ($p = 0,2$; $\chi^2 = 4,3$ и $p = 0,37$; $\chi^2 = 3,0$ соответственно).

Однако с учетом вероятности персистенции клеток иммунной системы реципиента при использовании немиелоаблативных режимов кондиционирования и возможности потенцирования иммунологического конфликта проводили анализ совместного влияния АВ0-несовместимости и вида схемы кондиционирования на течение посттрансплантационного периода. Полученные данные указывают на отсутствие различий в увеличении летальности при АВ0-несовместимости как при миелоаблативных, так и при немиелоаблативных режимах кондиционирования в 3 контрольных точках: Д+100, Д+365, Д+1000 ($p = 0,7$ и $p = 0,1$ соответственно).

В ходе оценки влияния режима кондиционирования на развитие острой РТПХ выявлено увеличение частоты при использовании немиелоаблативных режимов кондиционирования (30,8 %) по сравнению с миелоаблативными (15,3 %; $p = 0,002$; $\chi^2 = 12,8$) вне зависимости от степени совместимости по системе АВ0.

Ключевым аспектом ТГСК, от которого во многом зависит исход лечения, является факт и сроки приживления трансплантата. По результатам проведенной работы восстановление лейкоцитов $> 1,0 \times 10^9/\text{л}$ фиксировалось на $(20,0 \pm 10,4)$ -е сутки (медиана 18 сут) после ТГСК; нейтрофилов $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$ – на $(20,7 \pm 9,6)$ -е

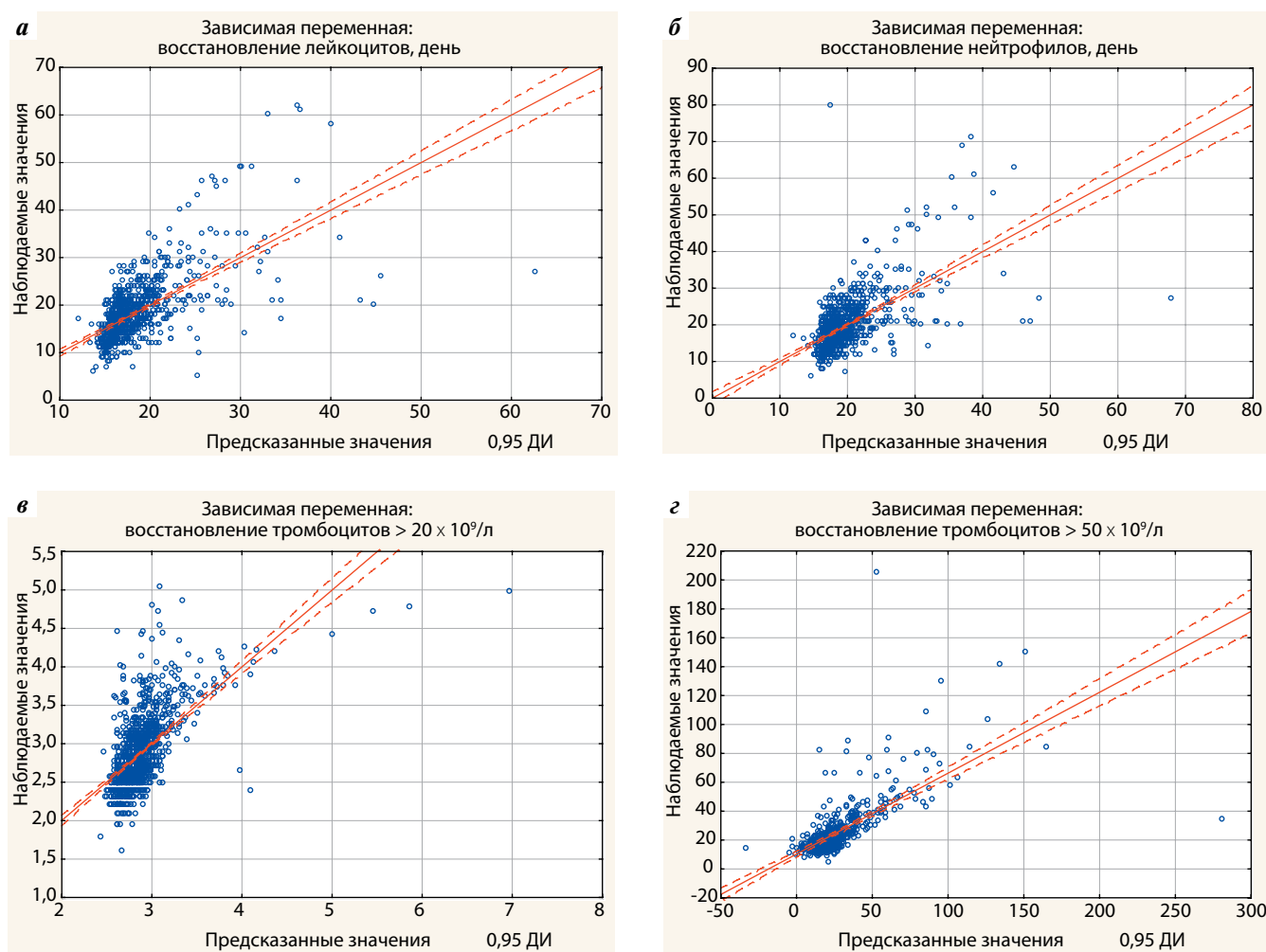


Рис. 3. Сроки приживления трансплантата при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (данные регрессионного анализа): а — восстановление лейкоцитов $> 1,0 \times 10^9/\text{л}$; б — восстановление нейтрофилов $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$; в — восстановление тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$; г — восстановление тромбоцитов $> 50 \times 10^9/\text{л}$. ДИ — доверительный интервал

сутки (медиана 19 сут); тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$ — на $(20,2 \pm 13,6)$ -е сутки (медиана 16 сут); тромбоцитов $> 50 \times 10^9/\text{л}$ — на $(24,0 \pm 17,1)$ -е сутки (медиана 19 сут) (рис. 3). Наиболее значимыми факторами, влияющими на сроки приживления трансплантата, по данным регрессионного анализа, были степень HLA-совместимости (log worth 15,10), источник трансплантата (7,05), вид ТГСК (6,40), режим кондиционирования (4,05). В свою очередь, АВ0-несовместимость не имела определяющего влияния (0,87) на сроки приживления нейтрофилов и мегакариоцитарного роста.

Однако на примере 240 реципиентов аллоТГСК отмечено удлинение сроков восстановления эритроидного роста (Д+50) в группе пациентов с АВ0-несовместимым источником донорского трансплантата по сравнению с совместимым: 23,8 и 10,0 % соответственно ($p = 0,01$). Влияние варианта АВ0-несовместимости на сроки приживления трансплантата, в частности эритроидного роста, находит отражение в увеличении объема и интенсивности гемотрансфузионной терапии в посттрансплантационном периоде ($p = 0,003$). Среднее число трансфузий компонентов крови составило 25,0

при большой АВ0-несовместимости ($p = 0,001$), 16,5 — при малой ($p = 0,006$), 13,6 — при комбинированной ($p = 0,005$), 15,1 — при совместимых ТГСК ($p = 0,001$).

Особое внимание ученые уделяют вопросам развития осложнений, связанных с АВ0-несовместимостью. Клинические проявления в данном случае могут быть обусловлены локализацией иммуноактивных антигенов системы АВ0, которые представлены не только на эритроцитах, но и на других клетках и тканях организма: тромбоцитах, лимфоцитах, эндотелии сосудов и органов (почек, печени, сердца); циркулируют в плазме [20]. Эта особенность определяет системность наблюдаемых реакций.

По нашим данным выявлена вероятность развития иммунных осложнений при наличии АВ0-несовместимости, таких как острый и отсроченный гемолиз, ПКА, иммунная тромбоцитопения ($p = 0,022$) (табл. 3). Невысокое число случаев и низкая летальность ($n = 3$) могут указывать на адекватную профилактику, своевременное и эффективное лечение. Однако стоит отметить, что из-за трудностей в разграничении симптомов и критериев в диагностике иммунных осложнений

Таблица 3. Развитие иммунных осложнений при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от родственного и неродственного доноров в зависимости от варианта АВ0-несовместимости

Осложнение	Число пациентов					p
	Всего (n = 1158)	AB0-несовместимость				
		совместимы (n = 510)	большая (n = 237)	малая (n = 294)	комбинированная (n = 117)	
Иммунные осложнения:						
иммунный гемолиз	19	4	7	6	2	0,022
парциальная красноклеточная аплазия	9	1	8	0	0	
иммунная тромбоцитопения	5	2	2	1	0	
Острая РТПХ	543 (47 %)	229 (45 %)	109 (46,2 %)	140 (47,6 %)	65 (55,6 %)	0,22
Хроническая РТПХ	260 (22,6 %)	114 (9,9 %)	46 (4,0 %)	62 (5,4 %)	38 (3,3 %)	0,037

Примечание. РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина».

некоторые лабораторные синдромокомплексы могли быть перекрестными, что затрудняло выявление вышеуказанных осложнений.

Заключение

Представленные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что наличие АВ0-несовместимости не является определяющим фактором при оценке общей выживаемости в случае аллотГСК, однако может приводить к развитию иммунных осложнений, таких как острый и отсроченный гемолиз,

ПККА, иммунная тромбоцитопения. Основанная на варианте АВ0-несовместимости заместительная гемотранфузионная терапия и методы модификации донорского трансплантата (седиментация с 6 % гидроксипропилакрахмалом, удаление плазмы или сочетание технологий) позволяют добиться низкой частоты и степени выраженности иммунных осложнений.

Для получения убедительных данных о влиянии АВ0-несовместимости на развитие острой РТПХ и других ассоциированных с ней осложнений требуется большее количество наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Моисеев И.С. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2015;2(2):28–42. [Afanas'ev B.V., Zubarovskaya L.S., Moiseev I.S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: now, problems and prospects. Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Children Hematology and Oncology 2015;2(2):28–42. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-2-2-28-42.
- Passweg J.R., Baldomero H., Bader P. et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. Bone Marrow Transplant 2015;50(4):476–82. DOI: 10.1038/bmt.2014.312. PMID: 25642761.
- Rowley S.D., Donato M.L., Bhattacharyya P. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2011;46(9):1167–85. DOI: 10.1038/bmt.2011.135. PMID: 21897398.
- Worel N. AB0-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transfus Med Hemother 2016;43(1):3–12. DOI: 10.1159/000441507. PMID: 27022317.
- Seebach J.D., Stussi G., Passweg J.R. et al. ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11(12):1006–13. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.07.015. PMID: 16338623.
- Worel N., Greinix H.T., Schneider B. et al. Regeneration of erythropoiesis after related- and unrelated-donor BMT or peripheral blood HPC transplantation: a major ABO mismatch means problems. Transfusion 2000;40(5):543–50. PMID: 10827256.
- Ahmed I., Teruya J., Murray-Krezan C., Krance R. The incidence of autoimmune hemolytic anemia in pediatric hematopoietic stem cell recipients post-first and post-second hematopoietic stem cell transplant. Pediatr Transplant 2015;19(4):391–8. DOI: 10.1111/petr.12455. PMID: 25809012.
- Kimura F., Sato K., Kobayashi S. et al. Impact of AB0-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. Haematologica 2008;93(11):1686–93. DOI: 10.3324/haematol.12933. PMID: 18835834.
- Remberger M., Watz E., Ringden O. et al. Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2007;13(6):675–82. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.01.084. PMID: 17531777.
- Jagasia M., Arora M., Flowers M.E. et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. Blood 2012;119(1):296–307. DOI: 10.1182/blood-2011-06-364265. PMID: 22010102.
- Inamoto Y., Storer B.E., Petersdorf E.W. et al. Incidence, risk factors, and outcomes of sclerosis in patients with chronic graft-versus-host disease. Blood 2013;121(25):5098–103. DOI: 10.1182/blood-2012-10-464198. PMID: 23547053.
- Atay D., Erbey F., Akcay A., Ozturk G. Is ABO mismatch another risk factor for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric thalassemic patients? Pediatr Transplant 2015;19(6):645–51. DOI: 10.1111/petr.12552. PMID: 26156679.

13. Gutiérrez-Aguirre C.H., Gómez-De-León A., Alatorre-Ricardo J. et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning in an outpatient setting in ABO-incompatible patients: are survival and graft-versus-host disease different? *Transfusion* 2014;54(5): 1269–77. DOI: 10.1111/trf.12466. PMID: 24898453.
14. Worel N., Kalhs P. ABO-incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2008;93(11):1605–7. DOI: 10.3324/haematol.2008.001057. PMID: 18978296.
15. Национальное гематологическое общество. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. II Конгресс гематологов России, 2014. [The National Society of Hematology. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia of adults. II Congress of Russian Hematologists, 2014. (In Russ.)].
16. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P. et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(6):825–8. PMID: 7581076.
17. Booth G.S., Gehrie E.A., Bolan C.D., Savani B.N. Clinical guide to ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(8):1152–8. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.03.018. PMID: 23571461.
18. Michallet M., Le Q.H., Mohty M. et al. Predictive factors for outcomes after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies: a 10-year retrospective analysis from the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Exp Hematol* 2008;36(5):535–44. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.01.017. PMID: 18346838.
19. Goldman J., Liesveld J., Nichols D. et al. ABO incompatibility between donor and recipient and clinical outcomes in allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2003;27(6):489–91. PMID: 12648507.
20. Gehrie E.A., Cates J.M., Nian H. et al. Blood group A antigen expression on cardiac endothelium is highly individualized: possible implications for transplantation. *Cardiovasc Pathol* 2013;22(4):251–6. DOI: 10.1016/j.carpath.2012.10.007. PMID: 23290353.

Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии

И.М. Бархатов¹, А.В. Предеус², А.Б. Чухловин¹

¹НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²Институт биоинформатики ФГБУ «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет Российской академии наук»; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, 2

Контакты: Ильдар Мунерович Бархатов i.barkhatov@gmail.com

Обзорная статья касается основных принципов и технологий генного секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), а также его приложений к оценке генных мутаций в лейкозных клетках. Обсуждается ряд современных работ, касающихся применения NGS в исследованиях генетической гетерогенности при миелопролиферативных заболеваниях, для выявления генов высокого клинического риска, в том числе мутаций, связанных с резистентностью к терапии, анализа эпигеномных нарушений при лейкозах, а также молекулярных аспектов эволюции злокачественных клонов. Отдельный раздел посвящен основным проблемам, связанным с биоинформатикой и корректным анализом больших компьютерных баз результатов NGS-исследований. Адекватный выбор программных продуктов очень важен для адекватной обработки и интерпретации данных NGS.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения, технологии, лейкозы, генные мутации, биоинформатика

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-56-63

Next-generation gene sequencing and its applications in oncohematology

I.M. Barkhatov¹, A.V. Predeus², A.B. Chukhlovin¹

¹R.M. Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

²Bioinformatics Institute, Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences; 2 Kantemirovskaya St., Saint Petersburg 194100, Russia

The review bears on basic principles and technologies of next-generation sequencing (NGS), as well as its applications for detection of gene mutations in leukemic cells. We discuss some novel data concerning NGS approach to studies of genetic heterogeneity in myeloproliferative disorders, detection of high-risk genes, including drug resistance mutations, epigenomic changes associated with leukemias, as well as molecular aspects of clonal evolution. A special section concerns basic problems with bioinformatics and adequate analysis of large digital data-bases obtained with NGS approach. Optimal choice of appropriate software is of utmost importance for adequate retrieval and interpretation of the NGS data.

Key words: next generation sequencing, technologies, leukemia, gene mutations, bioinformatics

Введение

Общеизвестно, что развитие злокачественных опухолевых заболеваний системы крови связано с возникновением ряда последовательных мутаций генов, ведущих к развитию злокачественного клеточного клона.

Известно также, что в процессе терапии первичная популяция злокачественных клеток может приобретать вторичные мутации, изменяясь под влиянием различных факторов отбора в организме больного (иммунологическая селекция, действие цитостатических препаратов и др.). Эти злокачественные субклоны с сочетаниями генных мутаций могут впоследствии приводить к рецидивам заболевания. Разнообразие генной патологии в организме больного существенно влияет на прогноз и исходы лечения больных с лейкозами и лимфомами. Для оценки клинического риска в каждом конкретном случае требуется детальная характеристика генетических

аббераций, а для этого необходимо определение последовательности нуклеотидов целевого гена в злокачественных клетках.

Современная молекулярная диагностика при лейкозах основана на выявлении конкретных генных мутаций, характерных для того или иного вида лейкоза. Основным методом является молекулярно-генетическая диагностика на базе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом целевых участков генов, которая проводится в лабораториях крупных онкогематологических клиник. Кроме того, с начала 1990-х годов для задач дешифровки генов, в первую очередь смысловых последовательностей (сиквенсов) молекул матричной РНК (мРНК), применяли главным образом классическое секвенирование по Сэнгеру. Проект «Геном человека», основной задачей которого была сборка референсной последовательности человеческого

генома, потребовал участия 23 лабораторий, 13 лет работы и общих затрат в 3 млрд долларов. Однако этот проект послужил мощным стимулом для развития методов секвенирования. В ходе его выполнения были разработаны новые технологии расшифровки генома — секвенирование следующего поколения, или высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS).

Настоящий обзор имеет целью ознакомить гематологов с основными принципами методов NGS, показать его эффективность на ряде клинических примеров и обозначить важность адекватного применения современных методов биоинформатики при анализе данных NGS. Первичные результаты применения NGS в онкогематологии уже обсуждались ранее [1].

Принципы осуществления высокопроизводительного секвенирования

NGS представляет собой процесс определения последовательности нуклеотидов в геномной ДНК или в совокупности информационных РНК (транскриптом) путем амплификации множества коротких участков генов. Это разнообразие генных фрагментов в итоге покрывает всю совокупность целевых генов или, при необходимости, весь геном (или транскриптом как совокупность молекул РНК). На следующем этапе осуществляется одновременное многократное прочтение (секвенирование) этого множества участков генов. Далее проводится компьютерная обработка полученного массива данных и сравнение с «образцовыми» (референсными) последовательностями генов. Это позволяет установить присутствие сотен и тысяч генных мутаций или вариантов в исследуемых клетках за относительно короткий период времени (от нескольких часов до нескольких суток).

Использование подходящего метода NGS, в принципе, позволяет выявлять все известные типы соматических мутаций раковых клеток, в том числе замены нуклеотидов, делеции, инсерции оснований, изменения копийности генов, транслокации генетического материала и т. д. Это особенно важно для анализа мутаций в так называемых горячих точках генома, особо подверженных мутационным изменениям [2].

Особенности различных технологий высокопроизводительного секвенирования

Существует целый ряд технологических платформ для проведения NGS, которые различаются по способу осуществления секвенирования. Основные этапы NGS в целом сходны, а именно:

- 1) получение множества коротких фрагментов ДНК или молекул мРНК;
- 2) амплификация этих коротких последовательностей посредством большого числа специфических ДНК-зондов и с применением мультиплексной ПЦР;
- 3) получение так называемой библиотеки генов (т. е. набора фрагментов ДНК из данного образца) для последующего секвенирования;

4) высокопроизводительное прочтение нуклеотидных последовательностей в этом множестве генных фрагментов.

Прочтение сиквенсов, т. е. определение последовательности нуклеотидов в коротких фрагментах ДНК, может проводиться разными способами: с помощью пиросеквенирования (сейчас применяется редко), гибридизации на микрочастицах, микро-рН-метрии, масс-спектрометрии и т. д.

Ныне применяемые технологии секвенирования формально делят на NGS II и III поколения. Ко II поколению относятся секвенаторы, позволяющие получить большое количество коротких прочтений (25–800 пар оснований), в частности 454 Life Sciences, Illumina, Ion Torrent. К III поколению NGS относятся секвенаторы Pacific Biosciences и Oxford Nanopore, позволяющие прочитывать более длинные участки генов (2000–200 000 пар нуклеотидов). Сейчас наиболее широко используются секвенаторы Illumina. Так, по состоянию на 2014 г. эти модели занимали 70 % рынка секвенаторов и произвели более 90 % всех задокументированных данных. Сильными сторонами Illumina является высокая точность секвенирования (не более 0,1 % ошибок), высочайшая производительность, высокое соотношение производительность/цена, а также возможность получения парных прочтений с 2 концов фрагмента длиной до 750 пар оснований. Последнее позволяет увеличить точность выравнивания фрагментов на референсный геном, а также сильно улучшает точность в сборке геномов и транскриптомов *de novo*.

По мере развития NGS-технологий и конкуренции между разными методическими подходами стоимость NGS в расчете на 1 изучаемый образец неуклонно снижается. Так, в настоящее время силами одной лаборатории можно секвенировать весь геном человека за несколько дней и всего за ~ 1000 долларов, что сделало эту процедуру доступной для многих западных университетов и крупных медицинских учреждений [3].

Варианты применения NGS в медицинских исследованиях многообразны. Условно их можно разделить на следующие группы:

- 1) определение последовательности всей ДНК (полногеномное секвенирование — whole-genome sequencing, WGS);
- 2) определение последовательности белоккодирующих участков генома (полноэкзомное секвенирование — whole-exome sequencing, WES);
- 3) определение последовательности интересующих генов (сюда относятся многие коммерческие решения — от «клинических экзомов» CES, включающих около 5000 медицински значимых генов, до малых таргетных панелей, анализирующих 1–3 гена);
- 4) секвенирование транскриптома (РНК-секвенирование, RNA-seq), которое часто используется в онкологии для классификации опухолей, нахождения неоантигенов, поиска новых химерных генов и т. д.

Секвенирование экзонов и таргетных панелей уже заняло прочное место в диагностике редких наследственных заболеваний и постепенно набирает популярность и в онкологии. Следует отметить: несмотря на то, что секвенирование полного или клинического экзона значительно дешевле и проще в обработке, с его помощью практически невозможно находить крупные вставки и делеции (инделлы), большие геномные перестройки и другие структурные варианты. Для этого используются стратегии полногеномного секвенирования, а также более старые методы, в частности сравнительная геномная гибридизация (array-CGH) и, конечно, изучение кариотипа данных клеток.

Именно знание референсной последовательности ДНК генома человека позволяет отбирать для NGS-анализа комплексы генов со значимыми мутациями и сравнивать их «образцовые» последовательности генома с результатами NGS. К таргетным методам относятся и такие распространенные подходы, как 16S-секвенирование, секвенирование генов, кодирующих молекулы иммунного ответа, в частности HLA-типирование, и многие другие приложения. Сверхглубокое таргетное секвенирование также позволяет анализировать замены и небольшие вставки/делеции в клеточных клонах (при частоте до 1 % в популяции клеток).

Выявление множественных нуклеотидных замен, делеций и иных aberrаций в стволовых клетках у пациентов онкогематологического профиля становится все более распространенным. В последние 5–6 лет, с появлением технологических платформ и приборов для NGS, задачи одновременного анализа множества генов стали не только выполнимыми, но и достаточно экономичными.

Области использования секвенирования нового поколения в онкогематологии

Молекулярные варианты лейкозов

В настоящее время выявлено большое число генных и хромосомных мутаций, наблюдаемых при острых лейкозах. Так, на основании этих данных уже возможна детальная молекулярная классификация острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) [4]. В ходе мультицентрового исследования авторы изучали последовательность 111 генов у 1540 пациентов после индукционной химиотерапии. С помощью цитогенетического анализа и глубокого секвенирования ДНК выявлены так называемые драйверные мутации, т. е. генные аномалии, связанные с развитием ОМЛ. К ним относили слитные гены (fusion genes), другие онкогенные мутации, а также нарушения ploидности хромосом. Всего обнаружены 5234 различные мутации в 76 генах. У 86 % пациентов найдены как минимум по 2 мутации. Наиболее часто выявлялись aberrации генов *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *NRAS*. Мутации *NPM1* обычно возникали позже, что отражает их роль в дальнейшей эволюции лейкозной трансформации.

При этом сравнительно часто отмечались совместные мутации, например *NPM1* и *NRASG12/13*, а также комбинированные мутации гена *FLT3*. Выделены 11 подгрупп, или классов, ОМЛ по функциональным параметрам вовлеченных генов. Наиболее часто встречались случаи ОМЛ с мутациями *NPM1* (27 %). Вторая по частоте подгруппа включала клинические случаи с мутациями генов, кодирующих сплайсинг (структурные перестройки) молекул РНК, состояние хроматина или транскрипцию РНК. У 13 % пациентов выявлены мутации *TP53* со сложными хромосомными aberrациями, что позволило выделить их в особую патогенетическую группу.

Хотя возможности клонального анализа мутаций были ограниченными, наиболее рано обнаруживали мутации в генах, кодирующих белки эпигенеза (*DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *TET2*). Все эти разнородные молекулярно-генетические данные сопоставляли с клинической картиной и исходами заболевания. Выяснилось, например, что неблагоприятный исход чаще наблюдался в группах с мутациями генов, регулирующих функции ядерного хроматина и транскрипцию РНК. Другой группой повышенного риска были пациенты с мутациями гена *TP53* и сложными нарушениями кариотипа. Эти молекулярные критерии, безусловно, подтверждают положения действующей классификации ОМЛ и позволят лучше прогнозировать индивидуальный риск для больных.

С учетом различий в спектре генных мутаций при различных лейкозах за последние годы предложено несколько «типовых» генно-диагностических панелей для индивидуальной оценки отдельных типов лейкозов. Так, одно из исследований касалось миелоидных неоплазий [5]. Наблюдали группу из 46 пациентов среднего возраста. Совокупность их мРНК (экзом) подвергали частичному секвенированию по 54 конкретным генам. За основу брали данные, полученные при анализе 568 ампликонов (всего 141 000 пар оснований). Для работы применялась методика компании Illumina, а секвенирование проводили с помощью системы MiSeq. Всего выявлено 77 мутаций в 24 исследуемых генах. В каждом позитивном образце выявляли в среднем 2 мутации. Кроме того, авторы показали совпадение между результатами, полученными с помощью NGS и стандартных молекулярно-биологических тестов.

Выявление генов риска неблагоприятного исхода

В ближайшие годы методики «глубинного» секвенирования генома, или NGS, обещают стать вполне конкурентными с ныне принятыми методическими подходами к генодиагностике мутаций. Одно из ранних исследований подобного рода было проведено V. Grossmann и соавт. [6] с применением пиросеквенирования. В работе использовали материал от 22 пациентов с острыми лейкозами и миелоидными новообразованиями. Серийное изучение ДНК методом

пиросеквенирования множественных участков сочетали с гибридизацией на биочипах для анализа длинных последовательностей генов. В целом этот методический подход позволил выявить разнообразные замены, делеции и вставки наряду со сбалансированными хромосомными aberrациями, включая транслокации и инверсии. В частности, авторы обнаружили случаи ОМЛ с аномалиями гена *RUNX1* и ранее неизвестными «слитными генами» с участием этого гена, который кодирует важный фактор транскрипции РНК. Интересно, что мутации *RUNX1* связаны с конкретными хромосомными поломками и имеют большое значение для течения ОМЛ и его исхода [7].

Особый интерес представляют возможные прогностические генные мутации при хронических миело-пролиферативных заболеваниях (МПЗ). Так, S. Delic и соавт. [8] с помощью диагностических панелей NGS проводили оценку мутационного спектра и валидацию метода диагностики по 28 генам, потенциально значимым для развития и эволюции МПЗ. Обследованы 100 пациентов с первичным миелофиброзом, истинной полицитемией и эссенциальной тромбоцитопенией. У 53 пациентов обнаружены 2 и более мутации. Показана относительная специфичность определенных мутаций (гены сплайсинга РНК *SF3B1*, *SRSF2* и *U2AF1*, гены *ASXL1* и *EZH2*, влияющие на хроматин) для случаев первичного миелофиброза.

Нарушения эпигенетической регуляции генома

При анализе первичных причин возникновения лейкозов некоторые авторы изучали роль эпигенетической регуляции, а именно метилирования, модификации гистонов и других факторов подавления экспрессии ключевых генов в патогенезе лейкозов, например при HTLV-I-ассоциированном Т-клеточном лейкозе. В работе [9], проведенной на 31 образце от больных с острым Т-лимфобластным лейкозом, осуществляли NGS-анализ для поиска мутаций в генах *SUZ12*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*,

MLL, *MLL2*, *MLL3* и *MLL4*, контролирующих репрессию антионкогенов. Для секвенирования применяли систему Illumina HiSeq 2000. Мутации *MLL3* и *TET2* отмечались наиболее часто (32 % всех образцов), причем они выявлялись только в клетках этих пациентов. Авторы предполагают, что инактивация этих генов особо важна в патогенезе острого Т-лимфобластного лейкоза.

Поиск маркеров минимальной остаточной болезни

Оценка наличия и уровней минимальной остаточной болезни (МОБ) при лейкозах важна для определения тактики дальнейшего лечения. Однако при стандартном поиске онкогенов такие маркеры часто не выявляются. В этом плане представляет интерес статья Н. Debarri и соавт. [10]. Авторы проводили мониторинг МОБ по мутациям *IDH1/2* и *DNMT3A* у пациентов с ОМЛ и ранее доказанной мутацией *NPM1*. Осуществлен детальный анализ мутаций гена *NPM1* и более редких генетических аномалий у больных с ОМЛ. Так, мутации *DNMT3A* оказались полезными для количественной оценки с помощью NGS на платформе Ion Torrent (2 млн прочтений на образец). В то же время мутации данного гена отражали наличие предлейкозных клонов в состоянии ремиссии, а не текущую стадию заболевания. Мутации *IDH1/2* и *NPM1* оказались более надежными маркерами МОБ, так как позволяли предсказывать рецидив ОМЛ или злокачественную трансформацию при миелодиспластическом синдроме. Таким образом, правильный выбор маркеров крайне важен для адекватного мониторинга МОБ при ОМЛ.

Анализ клональной эволюции злокачественных клеток

Большинство NGS-исследований клональной эволюции на фоне цитостатической терапии проводили при хроническом лимфолейкозе, что отражено в отечественном обзоре [11]. Данные о ряде оригинальных работ суммированы нами в таблице. В частности,

Применение NGS для анализа клональности при ХЛЛ

Цель работы	Гены, число маркеров	Система генотипирования	Размер выборки	Результат	Страна, ссылка
Выявление значимых мутаций при ХЛЛ	15 генов	MiSeq	136 случаев	Найдены 102 мутации в 8 генах (<i>TP53</i> , <i>SF3B1</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>ATM</i> , <i>XPO1</i> , <i>MYD88</i> , <i>DDX3X</i> , <i>PTPN6</i>)	Германия [12]
Выявление малых клонов лимфоцитов с мутациями	<i>TP53</i>	Система 454	309 «свежих» случаев ХЛЛ	Худший прогноз у больных с мутациями <i>TP53</i> до терапии	Италия [13]
Анализ <i>de novo</i> мутаций после цитостатической терапии	<i>TP53</i>	MiSeq	60 случаев	Терапия ведет к отбору в пользу клональных мутаций <i>TP53</i>	Чехия [14]
Эффекты метилирования генов	<i>DAPK1</i> , 4 генных варианта	iPLEX Gold (Sequenom), MassARRAY	303 случая	Варианты <i>DAPK1</i> связаны с уровнями его метилирования	Германия [15]

Примечание. ХЛЛ – хронический лимфолейкоз.

показан менее благоприятный прогноз заболевания при выявлении мутаций *TP53*.

Особенности мутационного процесса при хронических МПЗ изучали P. Lundberg и соавт. [16]. Авторы использовали целевое NGS 104 генов для выявления соматических мутаций в группе из 197 больных с хроническими МПЗ. ДНК для анализа получали из гранулоцитов. Полученные библиотеки генных фрагментов исследовали с помощью систем Illumina и подтверждали мутации на платформе Ion Torrent PGM. Для выявления максимального числа мутаций исследовали ДНК из наиболее поздних образцов материала. При этом оценивали индивидуальные мутационные профили для последующего анализа клональной эволюции в серийно взятых пробах. Для оценки копийности генов проводили РНК-секвенирование, а мутации гена *CALR* определяли с помощью ПЦР. В результате у 90 % больных наблюдались определенные соматические мутации, причем в 37 % случаев отмечены более редкие мутации, нежели *JAK2V617F* и *CALR*. Наличие более 2 мутаций коррелировало со снижением общей выживаемости пациентов и повышенным риском развития ОМЛ, особенно *TP53* с утратой гетерозиготности. Наиболее интересные данные связаны с опытами по исследованию генных мутаций в единичных колониях длительных культур лейкозных клеток. Опорным маркером служила частая мутация *JAK2V617F*. Было обнаружено, что мутации *TET2* и *DNMT3A* появлялись главным образом до появления *JAK2V617F* или выявлялись в отдельных клонах, что говорило о биклональном состоянии. Мутации генов *ASXL1* и *EZH2* возникали как до *JAK2V617F*, так и после нее, а у 3 больных отмечено появление мутации *IDH1* после возникновения мутации *JAK2V617F*. Авторы выделяют 2 возможные модели развития клональных мутаций: линейный характер приобретения мутаций внутри клона и возможная биклональная структура возникающих злокачественных популяций. В то же время число выявленных мутаций было сходным в ранние и поздние сроки заболевания, что говорит о низкой частоте мутаций у больных с хроническими МПЗ.

Поиск мутаций, связанных с резистентностью к терапии

На протяжении ряда лет при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) и некоторых других формах лейкозов применяется терапия ингибиторами тирозинкиназы (ИТК). На фоне такого лечения часто происходит отбор мутированной (резистентной) формы *BCR/ABL*, что определяет необходимость секвенирования этого гена. Даже небольшие клоны со свежими мутациями *BCR/ABL* при ХМЛ могут быть обнаружены с помощью методик NGS. Так, S. Soverini и соавт. [17] попытались выявить тех больных, которые сохраняли исходные мутации резистентности после терапии ИТК II поколения (ИТК2), и выяснить, могут ли минорные

клоны с такими мутациями размножиться в ходе данного лечения. Авторы провели оценку иматиниб-резистентных пациентов (ХМЛ, Ph⁺). Мутационные профили и их изменения сравнивали между больными, ответившими и не ответившими на терапию ИТК2. Результаты NGS указывают на предсуществование невысоких уровней клинически актуальных мутаций (повышающих риск рецидива) у 43 % пациентов, не ответивших на лечение. Напротив, у больных, успешно леченных ИТК2, не было исходно найдено мутаций, ведущих к резистентности. Таким образом, NGS-мониторинг иматиниб-резистентных больных может эффективно выявлять ряд ранних прогностически важных мутаций.

Проблемы биоинформатики при анализе больших баз данных секвенирования нового поколения

В настоящее время силами одной лаборатории можно секвенировать весь геном человека за несколько дней и за несколько тысяч долларов, что делает эту процедуру доступной для многих университетов и крупных медицинских учреждений. В обзоре R.R. Gullapalli и соавт. [3] описан этот круг методик, а также обсуждаются ограничения в их практическом использовании. На текущий момент наиболее важной задачей является создание структурированных баз данных о геноме исследованных клеток, адекватных способов их компьютерной обработки и выдачи результатов, касающихся изменений в геноме данного индивида. Следует обратить внимание на то, что биоинформационная обработка данных NGS часто не только представляет собой практическую сложность, но и может радикально повлиять на диагноз.

Эволюция программных продуктов для анализа результатов геномного секвенирования детально изложена в статье G.A. Van der Auwera и соавт. [18]. Типичная последовательность обработки данных зависит от природы эксперимента (WGS, WES, target panel, RNA-seq). Важнейшей первой стадией обработки любого NGS-эксперимента является контроль качества «сырых» прочтений, который осуществляется с помощью программы FastQC. Первичный анализ позволяет оценить проблемы, которые имели место в подготовке библиотеки или при выделении материала, и скорректировать их. Геномные эксперименты подразумевают «выравнивание» данных на референсный геном. Наиболее популярной программой для этой цели является BWA. Так, для экспериментов RNA-seq необходимо выравнивание с учетом сплайсинга («перекройки» молекул РНК после их считывания в клетке). На текущий момент самой быстрой и точной программой для такого выравнивания является STAR.

После выравнивания геномного эксперимента (WGS, WES, таргетная панель) порядок действий следующий:

1) определение вариантов (variant calling) — стадия, в которой программа определяет варианты, отличающиеся от референсной последовательности;

2) аннотация вариантов (variant annotation) — стадия, в которой для хорошо охарактеризованных замен описывается их патогенность (на основании баз Clin-Var, OMIM и др.), а для малоизвестных замен предсказывается эффект с помощью одной из программ — предикторов эффекта (PROVEAN, SIFT, Polyphen, MutPred и др.);

3) ранжирование вариантов — стадия, в которой найденные и аннотированные варианты сортируются по ряду критериев, таких как частота аллели в публичных базах данных, патогенность, гомо-/гетерозиготность замены и др.

Наиболее чувствительной и неоднозначной является 1-я стадия (определение вариантов), для которой существует ряд хорошо разработанных и поддерживаемых решений. Самым популярным и точным является комплекс программ Genome Analysis Toolkit (GATK). Особенности этого пакета — запрет на использование коммерческими структурами и необходимость наличия значительной когорты (30 и более образцов) для надежного определения вариантов. Хорошо разработанными альтернативами также могут служить пайплайны на основе samtools/VCFTools и freebayes.

Большой интерес вызывают результаты сравнения эффективности различных систем обработки сигналов NGS и точности выявления соответствующих генных вариантов [19]. Совокупность данных о генотипах, полученных на базе Illumina Infinium Human Exome v1.1 Beadchip, обрабатывали с помощью 4 программных систем: SAMtools, GATK, glfTools и Atlas2, изучая варианты анализа одного или нескольких образцов ДНК. Для выравнивания прочтений использовали общую программу (BWA), и далее на этой основе были созданы 7 потоков информации, которые позволили проанализировать данные экзомного секвенирования 20 человек. В качестве «золотого стандарта» были взяты данные классического секвенирования по Сэнгеру, с которым и сравнивались результаты NGS-генотипирования. В целом анализ отдельно взятых образцов продемонстрировал высокое сходство по перекрытию целевых генов (порядка 0,9). При этом пакет программ GATK показал наибольшую специфичность ($> 0,9999$). Введение параллельных образцов существенно повышало чувствительность. По результатам симуляционных экспериментов GATK превосходила SAMtools и glfSingle по чувствительности, особенно при невысоких уровнях перекрытия фрагментов.

Таким образом, помимо правильного выбора технологической платформы для проведения NGS важным является также подбор оптимального программного обеспечения для обработки большого объема полученной генетической информации и ее сопоставления со стандартными (референсными) последовательностями генома человека. За последние годы разработано множество специализированных пакетов программ для обработки данных NGS. В частности, S. Pabinger и соавт. [20] изучили возможности 205 про-

грамм для анализа материала при полногеномном и полноэкзомном секвенировании. Авторы выделяют 5 аспектов NGS-исследования, каждый из которых подлежит отдельной оценке: контроль качества, сопоставление с известными генными последовательностями, идентификация генных вариантов, их аннотация и визуальное представление. Были выбраны 32 программы для точного определения генных вариантов. Особое внимание было уделено функциональным свойствам и специальным условиям применения отдельных программных продуктов, что особенно интересно для специалистов по клинической генетике, использующих различные платформы для выявления специфических мутаций.

Проблемы, связанные с интерпретацией данных секвенирования, также рассматривались в работе E.L. Crowgey и соавт. [21]. Авторы предложили интегрированный подход к анализу этого потока данных от начала до конца процесса — от выявления генных вариантов до их функциональной оценки на основе принципа фильтрации биоинформации. Результаты считывания множества генных фрагментов переводили из bam-файлов в формат fastq с помощью bam2fastq. Параметры и число покрытий на 1 экзон (vertical) и среднее покрытие экзона (horizontal) вычисляли на каждый образец с помощью GATK DiagnoseTarget (v. 2.5–2). Специализированные потоки сведений создавали для аннотирования и фильтрации однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) и вставок/делеций. Соответствующие схемы обработки данных секвенирования, полученных в системе Illumina, были успешно применены в плане сопоставлений генных последовательностей, детекции ОНП, мелких делеций/вставок и изменений числа копий генных фрагментов. При этом идет аннотирование вариантов с учетом типа заболевания и вкладом данного генного варианта. В ходе работы с ранее валидированными объектами разработаны специальные алгоритмы для фильтрации вариантов, основанные на качестве варианта, его типе наследования и влиянии на функцию кодируемого белка. Соответствующие клинические ассоциации привязаны к информационному ресурсу iProXpress (данные о редких заболеваниях). Таким образом, эта система позволяет проводить следующие операции: аннотирование; ранжирование (приоритизацию); фильтрацию по характеру наследования, функциональной оценке и т. д., что дает возможность клинической оценки геномных изменений при редких генетических заболеваниях.

Применение различных методик биоинформатики при анализе результатов экзомного секвенирования отдельно рассматриваются в статье М. D'Antonio и соавт. [22]. Целью такого анализа является поиск информативных аллельных вариантов и их связь с фенотипом обследуемого человека. Авторы предлагают свой веб-ресурс WEP (Whole-Exome sequencing Pipeline), который включает несколько этапов обработки потока геномной информации:

- 1) проверка целостности и качества данных на входе, фильтрация информации;
- 2) правильное сопоставление фрагментов генов;
- 3) конверсия в системе BAM, сортировка и индексация;
- 4) дублирование удаленных данных;
- 5) оптимизация сопоставлений вокруг точек вставок/делеций;
- 6) повторная калибровка по качеству;
- 7) детекция генных вариантов — ОНП и вставок/делеций;
- 8) аннотация вариантных генов;
- 9) сохранение результатов в специализированных базах данных для обеспечения возможности последующих сравнений, статистической обработки и др.

Авторы отмечают, однако, что для управления этим процессом нужен IT-персонал с соответствующими навыками.

Происходит дальнейшее совершенствование анализа массивов данных по результатам NGS, в частности для идентификации ОНП обычно используют различные версии аннотаций данных NGS. Проблема, однако, состоит в должной интеграции и сопоставлении массивов данных, полученных разными методами секвенирования, а также с историческими контролями. Иногда бывает трудно полностью совместить отдельные массивы информации. Так, при анализе отдельных генетических вариантов в исследовании [23] использовали стандартную номенклатуру клинического секвенирования (CSN). Однако некоторые проблемные генные варианты, например инсерции/делеции нуклеотидов (инделы), с трудом выявлялись в этом массиве. Поэтому авторы предложили новый программный продукт CAVA (Clinical Annotation of Variants), соответствующий современным принципам анализа генного полиморфизма и приему результатов NGS. Это относительно простая система для введения и анализа потоков данных NGS, позволяющая уточнить свойства транскрипта, местоположение гена в цепи ДНК и провести сопоставление со сходными генными вариантами. Ускорение этого процесса позволяет облегчить клиническую оценку обнаруженного генного варианта в сравнении с другими базами данных. Все это дает возможность обеспечить стандартное, клинически значимое аннотирование данных NGS в соответствии с действующими клиническими стандартами.

Возможности секвенирования нового поколения в подборе пар донор–реципиент для трансплантации

Отдельную проблему составляет обработка результатов NGS в практике трансплантации гемопоэтиче-

ских стволовых клеток, что требует тщательного подбора доноров гемопоэтических клеток по антигенам системы HLA, которые кодируются на хромосоме 6. Классические методы типирования HLA, основанные на ПЦР-диагностике, отработаны в совершенстве, однако не оценивают всего разнообразия клинически актуальных антигенов совместимости. Ранее упомянутые биоинформационные подходы, основанные на сравнении с референс-генами, тут неприменимы ввиду выраженной гетерогенности (полиморфизма) генов системы HLA.

Поэтому сейчас глубинное HLA-типирование и анализ сочетаний различных антигенных вариантов являются одним из ведущих направлений NGS — это направление иногда называется иммуноинформатикой. В частности, на его основе можно предсказывать взаимодействия В- и Т-клеточных эпитопов (иммуноактивных участков белков) в организме больного после трансплантации. Для этих целей разработан целый ряд программных средств, которые совершенствуются с учетом внедрения методов NGS [24]. В данной работе содержится обзор большого числа средств иммуноинформатики с акцентом на предсказание эпитопов В- и Т-клеток. Стало возможным оценивать с высокой точностью аллотипы (при возможности выбора оптимального донора) и вероятные влияния генных вариантов HLA на риск развития иммунных конфликтов между клетками пациента и трансплантата, а также развивать методы иммунотерапии для персонализированного лечения раковых заболеваний.

Заключение

Революционные технологии NGS за последние годы привели к повышению надежности и снижению стоимости процедур глубинного секвенирования геномных последовательностей, ускорению генодиагностики и расширению приложений геномного секвенирования. В дальнейшем можно ожидать и применения методов NGS для анализа минимальных образцов ДНК, например в единичных клетках или внеклеточной ДНК в плазме крови.

Однако широкое применение методов NGS в условиях клинической практики требует совершенствования компьютерных технологий для полноценной обработки больших баз данных, получаемых в разных лабораториях, разработки стандартизированных и воспроизводимых методов биоинформатики, пригодных для дифференциальной диагностики лейкозов и типирования антигенов гистосовместимости.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Смирнихина С.А., Лавров А.В., Адильгереева Э.П. и др. Клиническое значение полноэкзомных исследований миелоидных опухолей методом секвенирования следующего поколения. Клиническая онкогематология 2013;6(1):11–9. [Smirnikhina S.A., Lavrov A.V., Adil'gireeva E.P. et al. Clinical significance of whole-exome studies using next generation sequencing in myeloid neoplasia. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2013;6(1):11–9 (In Russ.)].
2. Ross J.S., Cronin M. Whole cancer genome sequencing by next-generation methods. Am J Clin Pathol 2011;136(4):527–39. DOI: 10.1309/AJCPRI1SVT1VHUGXW. PMID: 21917674.
3. Gullapalli R.R., Desai K.V., Santana-Santos L. et al. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. J Pathol Inform 2012;3:40. DOI: 10.4103/2153-3539.103013. PMID: 23248761.
4. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2016;374(23):2209–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192. PMID: 27276561.
5. Au C.H., Wa A., Ho D.N. et al. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. Diagn Pathol 2016;11:11. DOI: 10.1186/s13000-016-0456-8. PMID: 26796102.
6. Grossmann V., Kohlmann A., Klein H.U. et al. Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. Leukemia 2011;25(4):671–80. DOI: 10.1038/leu.2010.309. PMID: 21252984.
7. Gaidzik V.I., Bullinger L., Schlenk R.F. et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. J Clin Oncol 2011;29(10):1364–72. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7926. PMID: 21343560.
8. Delic S., Rose D., Kern W. et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. Br J Haematol 2016;175(3):419–26. DOI: 10.1111/bjh.14269. PMID: 27447873.
9. Yeh C.H., Bai X.T., Moles R. et al. Mutation of epigenetic regulators TET2 and MLL3 in patients with HTLV-I-induced acute adult T-cell leukemia. Mol Cancer 2016;15(1):15. DOI: 10.1186/s12943-016-0500-z. PMID: 26880370.
10. Debarri H., Lebon D., Roumier C. et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. Oncotarget 2015;6(39):42345–53. DOI: 10.18632/oncotarget.5645. PMID: 26486081.
11. Северина Н.А., Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Судариков А.Б. Мутации генов при хроническом лимфолейкозе: новые аспекты патогенеза, открытые с помощью технологий полногеномного секвенирования. Гематология и трансфузиология 2014;59(3):41–8. [Severina N.A., Biderman B.V., Nikitin E.A., Sudarikov A.B. Gene mutations in chronic lymphocytic leukemia: new aspects of pathogenesis discovered by next generation sequencing. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2014;59(3):41–8. (In Russ.)].
12. Vollbrecht C., Mairinger F.D., Koitzsch U. et al. Comprehensive analysis of disease-related genes in chronic lymphocytic leukemia by multiplex PCR-based next generation sequencing. PLoS One 2015;10(6):e0129544. DOI: 10.1371/journal.pone.0129544. PMID: 26053404.
13. Rossi D., Khiabani H., Spina V. et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2014;123(14):2139–47. DOI: 10.1182/blood-2013-11-539726. PMID: 24501221.
14. Malcikova J., Stano-Kozubik K., Tichy B. et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2015;29(4):877–85. DOI: 10.1038/leu.2014.297. PMID: 25287991.
15. Landau D.A., Tausch E., Taylor-Weiner A.N. et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. Nature 2015;526(7574):525–30. DOI: 10.1038/nature15395. PMID: 26466571.
16. Lundberg P., Karow A., Nienhold R. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood 2014;123(14):2220–8. DOI: 10.1182/blood-2013-11-537167. PMID: 24478400.
17. Soverini S., De Benedittis C., Polakova K.M. et al. Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. Oncotarget 2016;7(16):21982–90. DOI: 10.18632/oncotarget.8010. PMID: 26980736.
18. Van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C. et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. Curr Protoc Bioinformatics 2013;43:11.10.1–33. DOI: 10.1002/0471250953.bi1110s43. PMID: 25431634.
19. Liu X., Han S., Wang Z. et al. Variant callers for next-generation sequencing data: a comparison study. PLoS One 2013;8(9):e75619. DOI: 10.1371/journal.pone.0075619. PMID: 24086590.
20. Pabinger S., Dander A., Fischer M. et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. Brief Bioinform 2014;15(2):256–78. DOI: 10.1093/bib/bbs086. PMID: 23341494.
21. Crowgey E.L., Stabley D.L., Chen C. et al. An integrated approach for analyzing clinical genomic variant data from next-generation sequencing. J Biomol Tech 2015;26(1):19–28. DOI: 10.7171/jbt.15-2601-002. PMID: 25649353.
22. D'Antonio M., D'Onorio De Meo P., Paoletti D. et al. WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data. BMC Bioinformatics 2013;14 Suppl 7:S11. DOI: 10.1186/1471-2105-14-S7-S11. PMID: 23815231.
23. Münz M., Ruark E., Renwick A. et al. CSN and CAVA: variant annotation tools for rapid, robust next-generation sequencing analysis in the clinical setting. Genome Med 2015;7:76. DOI: 10.1186/s13073-015-0195-6. PMID: 26315209.
24. Backert L., Kohlbacher O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. Genome Med 2015;7:119. DOI: 10.1186/s13073-015-0245-0. PMID: 26589500.

Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы

А.М. Попов¹, М.В. Белевцев², Е.В. Боякова^{1,3}, Т.Ю. Вержбицкая^{4,5}, Л.В. Мовчан², М.С. Фадеева¹,
А.Б. Пашенко¹, В.П. Савицкий², А.А. Левадный³, Г.А. Цаур^{4,5}, С.А. Кашпор¹, С.А. Плясунова¹,
Л.Г. Фечина⁴, О.В. Алейникова², А.И. Карачунский^{1,6}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; Республика Беларусь, 223053 Минский район, дер. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43;

³ГБУЗ «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 115516 Москва, ул. Бакинская, 31;

⁴ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

⁵ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

⁶ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей диктует необходимость разработки собственных алгоритмов мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ). Целью работы является разработка оптимального стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики МОБ у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) во временных точках исследования костного мозга, предусмотренных протоколами группы «Москва—Берлин». Был разработан и успешно внедрен стандартизованный протокол определения МОБ методом проточной цитометрии при ВП-ОЛЛ на разных этапах терапии. Применение таких подходов позволило достичь очень высокой сопоставимости данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий еще одной лаборатории показала высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов определения МОБ. Это позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию для определения МОБ при лечении ОЛЛ по протоколам группы «Москва—Берлин».

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, стандартизация

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-64-73

Standardization of flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Russia—Belarus multicenter group experience

A. M. Popov¹, M. V. Belevtsev², E. V. Boyakova^{1,3}, T. Yu. Verzhbitskaya^{4,5}, L. V. Movchan², M. S. Fadeeva¹, A. B. Pashchenko¹,
V. P. Savitskiy², A. A. Levadnyy³, G. A. Tsaur^{4,5}, S. A. Kashpor¹, S. A. Plyasunova¹, L. G. Fechina⁴, O. V. Aleynikova², A. I. Karachunskiy^{1,6}

¹Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Republican Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; 43 Frunzenskaya St., Borovlyany village,
Minsk region 223053, Republic of Belarus;

³The Blood Transfusion Station of the Moscow Healthcare Department; 31 Bakinskaya St., Moscow 115516, Russia;

⁴Regional Children Clinical Hospital No 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

⁵Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

⁶N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianova St., Moscow 117997, Russia

We developed and implemented in multicenter setting the standardized approach for flow cytometric minimal residual disease (MRD) monitoring in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Participation of multicenter group reference laboratories in several ring trial studies demonstrated high concordance rate between participants. Successful integration of one additional laboratory in the multicenter group has shown good level of our approach reproducibility. These results will allow implementing MRD detection in stratification system of pediatric ALL treatment protocols of Russia-Belarus multicenter group.

Key words: minimal residual disease, flow cytometry, standardization

Введение

Снижение в результате терапии количества опухолевых клеток в костном мозге (КМ) традиционно считается важным прогностическим фактором при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей [1, 2]. Но даже в случае, если количество опухолевых клеток ниже чувствительности обычных цитологических методов (менее 1 %), они могут вносить существенный вклад в неблагоприятный исход заболевания [3–7]. Совокупность этих клеток, не выявляемых цитологически, но обнаруживаемых другими, более чувствительными методами диагностики, получила название минимальной остаточной болезни (МОБ).

Одним из основных методов оценки МОБ является проточная цитометрия [7, 8]. Прогностическая значимость уровня МОБ, определяемого данным методом, показана в рамках различных протоколов терапии [9–13]. Наиболее важные для прогнозирования исхода заболевания точки исследования — середина и окончание индукции ремиссии [9–13]. Существенными недостатками мониторинга МОБ методом проточной цитометрии по сравнению с количественной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) являются субъективность и сложность стандартизации в рамках многоцентровых исследований [8, 14]. В то время как технология молекулярно-генетического исследования МОБ хорошо отработана и стандартизована [8, 14, 15], опубликовано лишь несколько работ по начальным этапам стандартизации цитометрического мониторинга ОЛЛ в рамках отдельных исследовательских групп [16–18].

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей [19–22] диктует необходимость разработки собственных алгоритмов мониторинга МОБ.

Целью работы является разработка оптимального стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики МОБ у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) во временных точках исследования КМ, предусмотренных протоколами группы «Москва—Берлин».

Материалы и методы

В разработке и стандартизации подходов к цитометрическому определению МОБ приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва—Берлин»: ОДКБ № 1 (Екатеринбург), РНПЦ ДОГИ (Минск) и ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева (Москва). В 2 лабораториях определение МОБ производилось на цитометре FACS-CantoII (Becton Dickinson, США) (2 лазера, 6 цветов, затем 3 лазера, 8 цветов в обоих случаях), в 1 — на FC 500 и Navios (оба — Beckman Coulter, США) (2 лазера, 5 цветов).

Данная работа включала следующие этапы:

- обсуждение принятых в каждой лаборатории подходов к иммунофенотипированию ОЛЛ;

- выработка общих рекомендаций по пробоподготовке, подбору антител и флуорохромов, настройке проточных цитометров;
- разработка алгоритма анализа цитометрических данных и выявления остаточных опухолевых клеток на разных этапах терапии по протоколу ALL-MB 2008;
- участие в различных системах внешнего контроля качества;
- разработка стандартного операционного протокола (СОП) для цитометрического мониторинга МОБ в рамках протокола ALL-MB 2008;
- проведение кругового исследования с рассылкой цитометрических данных с последующим анализом отдельно в каждой лаборатории.

Обсуждение технологических аспектов, разработка общих подходов и оценка результатов работы проводились на встречах специально для этого созданной кооперативной группы в рамках группы «Москва—Берлин» (руководитель — проф. А.И. Карачунский). Всего с февраля 2007 г. (начало работы) по ноябрь 2014 г. (окончание включения пациентов в протокол ALL-MB 2008) было проведено 7 таких встреч. Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами, выбор реагентов для лизиса эритроцитов и отмывки клеток, подбор клонов антител и приемлемых для каждого маркера сочетаний антитело—флуорохром, алгоритмы настройки проточных цитометров.

Данные проточной цитометрии анализировали в программном обеспечении FACSDiva 6.1 (Becton Dickinson), а также CXP и Kaluza 1.5 (обе — Beckman Coulter). Вырабатывали рекомендации для последовательного выделения на точечных графиках опухолевых клеток при определении МОБ в зависимости от их иммунофенотипа [23, 24] и с учетом изменений антигенного профиля под действием терапии по протоколу ALL-MB 2008 [25, 26].

Все 3 лаборатории принимали участие во внешнем контрольном исследовании по определению МОБ, которое проводилось в декабре 2007 г. группой AIEOP-BFM и представляло собой рассылку fcs-файлов 23 пациентов, лечившихся по протоколу ALL-BFM 2000. Оценивали результаты определения МОБ на 15-й день терапии. Показатели каждой лаборатории сравнивали с референсным значением, представляющим собой медиану данных 4 наиболее опытных лабораторий группы AIEOP-BFM [16].

Ретроспективно оценивали распределение по величине полученных в каждой лаборатории результатов определения МОБ у пациентов, получавших терапию по протоколу ALL-MB 2008. Данный протокол является дальнейшим развитием отечественных протоколов по лечению ОЛЛ у детей ALL-MB 91 и ALL-MB 2002 и использовался в рамках многоцентровой кооперативной группы «Москва—Берлин» [19–21, 27].

Круговое исследование для оценки сопоставимости результатов, получаемых в 3 лабораториях, проводили посредством рассылки цитометрических данных в виде fcs-файлов с проточных цитометров. Так как основной задачей этой части работы была оценка возможности проспективного многоцентрового мониторинга МОБ в следующей версии протокола, данные были получены при определении МОБ у 10 пациентов на 15-й и 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB 2015. Каждое значение, полученное в отдельной лаборатории, сравнивали с медианой результатов всех 3 лабораторий (референсная величина), по аналогии с исследованием, ранее проводившимся группой AIEOP-BFM [16]. Кроме того, к исследованию была подключена еще 1 лаборатория, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках протокола ALL-MB 2015. Ее данные также сравнивали с референсными.

Результаты

Были разработаны следующие рекомендации по проведению иммунофенотипирования КМ в целях определения МОБ на 15-й и 36-й дни терапии по протоколам группы «Москва—Берлин».

Забор и транспортировка материала

- Цельный КМ в объеме не менее 2 мл забирается в пробирку с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта. Предпочтительно направлять на иммунофенотипирование материал, полученный в самом начале пункции, так как это позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может исказить результаты исследования.
- В направлении на определение МОБ, кроме стандартной информации, должны быть указаны тип материала, протокол терапии и этап лечения.
- Образец КМ должен быть доставлен для исследования в течение 48 ч при температуре транспортировки 4 °С. При получении материала в лаборатории должна проверяться его сохранность. При наличии видимых сгустков, гемолиза или при факте длительного хранения запрашивается повторный образец.
- Фильтрация КМ может проводиться при наличии хлопьев жира и мелких сгустков. Если КМ вязкий, возможно его пропорциональное разведение фосфатно-солевым буфером.

Подбор моноклональных антител

Несмотря на четкие отличия между опухолевыми и нормальными клетками в экспрессии различных антигенов, в настоящее время не существует единственного маркера, который был бы применим для мониторинга МОБ во всех случаях ВП-ОЛЛ. Поэтому для адекватного определения остаточных опухолевых клеток предпочтительно использовать многоцветные

комбинации антител, включающие кроме CD19 такие маркеры, как CD10, CD20, CD34, CD45, CD58 и CD38. Попытки упростить подходы к определению МОБ путем сокращения панелей моноклональных антител могут снизить число пациентов, у которых возможно определение МОБ методом проточной цитометрии.

Подбор флуорохрома для каждого конкретного антитела также является критически важным. Ключевые антитела, по которым происходит первичное выделение клеток, среди которых далее производится поиск МОБ (CD19, CD10), должны быть мечены яркими флуорохромами с хорошим разделением позитивного и негативного сигналов (APC, PE). В то же время антитела к антигенам, экспрессируемым с разной интенсивностью различными клетками КМ (CD45, CD38), должны быть мечены флуорохромами с промежуточной интенсивностью свечения (PerCP, APC-Cy7, APC-Alexa750, BV510 и др.), чтобы было возможно получить хорошее разделение популяций среди всех позитивных клеток. Появление на рынке антител, меченных новыми яркими флуорохромами (PE-CF594, BV515 и др.), существенно расширяет возможности формирования панелей для определения МОБ.

Методика окрашивания

- В промаркированные пробирки для проточной цитометрии вносятся первично-меченые антитела в соответствии с используемыми комбинациями маркеров. Вносимый объем раствора антител определяется титрованием и зависит от количества окрашиваемых клеток.
- Добавляется необходимый объем цельного КМ, который рассчитывается исходя из клеточности исследуемого образца, определенной на гемоанализаторе. Необходимо окрасить примерно в 3—4 раза больше клеток, чем планируется проанализировать.
- Образец тщательно перемешивается и инкубируется не менее 15 мин при комнатной температуре в темноте.
- Добавляется соответствующее объему материала количество лизирующего раствора. Предпочтительно использование лизирующего реагента с содержанием фиксирующего компонента для дополнительной стабилизации клеток, подвергающихся химиотерапии.
- Образец тщательно перемешивается и инкубируется согласно инструкции фирмы — производителя лизирующего реагента.
- Образец отмывается 2 раза в 3 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,0; удаляется супернатант.
- Добавляется 0,5—1,0 мл фосфатно-солевого буфера.
- Готовый образец должен быть проанализирован на проточном цитометре в течение 2 ч с момента окрашивания.

Если предусмотрено окрашивание ДНК-тропным красителем SYTO16 или SYTO41, необходимо добавить 2–3 мкл раствора (1:200 в 20 мМ Трис-буфере с pH 7,5) красителя после окрашивания и инкубировать 10 мин при комнатной температуре в темноте.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используемого прибора. Основными параметрами, влияющими на результат исследования, являются стабильность работы лазеров и жидкостной системы, чувствительность фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) детекторов флуоресценции и цифровая компенсация данных флуоресценции.

Стабильность работы лазеров на большинстве приборов определяется по попаданию показателей работы лазеров в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лабораторий обязан ежедневно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к компенсации данных, поэтому ее настройка производится одновременно с настройкой компенсации. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра, имеющегося в конкретной лаборатории. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для совершенно конкретных комбинаций используемых антител.

Анализ и интерпретация данных

Существуют значительные различия в иммунофенотипе опухолевых бластов при ВП-ОЛЛ и нормальных В-линейных предшественников (ВП) [28–31]. Именно на этих особенностях ассоциированного с лейкозом иммунофенотипа и строится поиск остаточных лейкоэмических клеток. Важно знать, что во время

индукционной терапии нормальные ВП в КМ отсутствуют, поэтому все обнаруживаемые ВП чаще всего являются опухолевыми [10, 32]. Однако нужно помнить, что В-линейная регенерация может начинаться в самом конце индукционной терапии (особенно у детей раннего возраста), поэтому нормальные ВП могут в крайне небольших количествах присутствовать в образце при определении МОБ на момент окончания индукционной терапии [33].

Есть существенные различия в экспрессии маркеров между опухолевыми клетками при CD10⁺ и CD10[–] вариантах ВП-ОЛЛ [23, 34]. Кроме количественных отличий экспрессии существуют также различия в доле пациентов, бласты которых экспрессируют тот или иной антиген. Так, при CD10[–] ВП-ОЛЛ число CD20⁺ пациентов ниже, чем при CD10⁺ варианте. В то же время доля пациентов с гомогенной экспрессией CD45 достоверно выше при CD10[–] варианте. Несмотря на то, что при CD10⁺ и CD10[–] вариантах ВП-ОЛЛ применяются сходные панели антигенов, отдельные маркеры используются в различных целях (см. таблицу) [34].

Описанные различия в экспрессии маркеров приводят к тому, что для CD10⁺ и CD10[–] вариантов ВП-ОЛЛ при мониторинге МОБ необходимо применять различные алгоритмы анализа данных (рис. 1) [34, 35]. В любом случае поиск МОБ начинается с выделения CD19⁺ клеток, среди которых проводится дальнейший анализ. Для CD10⁺ ВП-ОЛЛ анализ точечных графиков основывается на определении экспрессии CD10 и маркеров, по которым можно отличить опухолевые клетки от нормальных ВП (например, CD45 при CD45[–] ВП-ОЛЛ или CD58) (рис. 2). В случае гетерогенной экспрессии CD10 необходимо оценивать также экспрессию всех остальных используемых маркеров, прежде всего CD34. Для CD10[–] ВП-ОЛЛ при анализе данных наиболее значимым является определение экспрессии CD10 и CD20. При этом из анализа исключаются CD10⁺ и CD20⁺ клетки. Среди оставшихся CD19⁺CD10[–]CD20[–] клеток необходимо отличать МОБ от плазмочитов и продуктов неспецифического связывания антител.

Задачи применения различных антигенов для определения минимальной остаточной болезни при CD10⁺ и CD10[–] ВП-ОЛЛ

Маркер	CD10 ⁺ ВП-ОЛЛ	CD10 [–] ВП-ОЛЛ
CD19	Выделение всех клеток В-линии	Выделение всех клеток В-линии
CD10	Выделение опухолевых клеток	Исключение из анализа нормальных ВП
CD20	Выделение опухолевых клеток, исключение из анализа В-лимфоцитов	Исключение из анализа нормальных ВП и В-лимфоцитов
CD34	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD58	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD38	Дифференцирование опухолевых клеток от нормальных ВП	Дифференцирование опухолевых клеток от прогениторных
CD45	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток

Примечание. ВП – В-линейные предшественники; ВП-ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз из ВП.

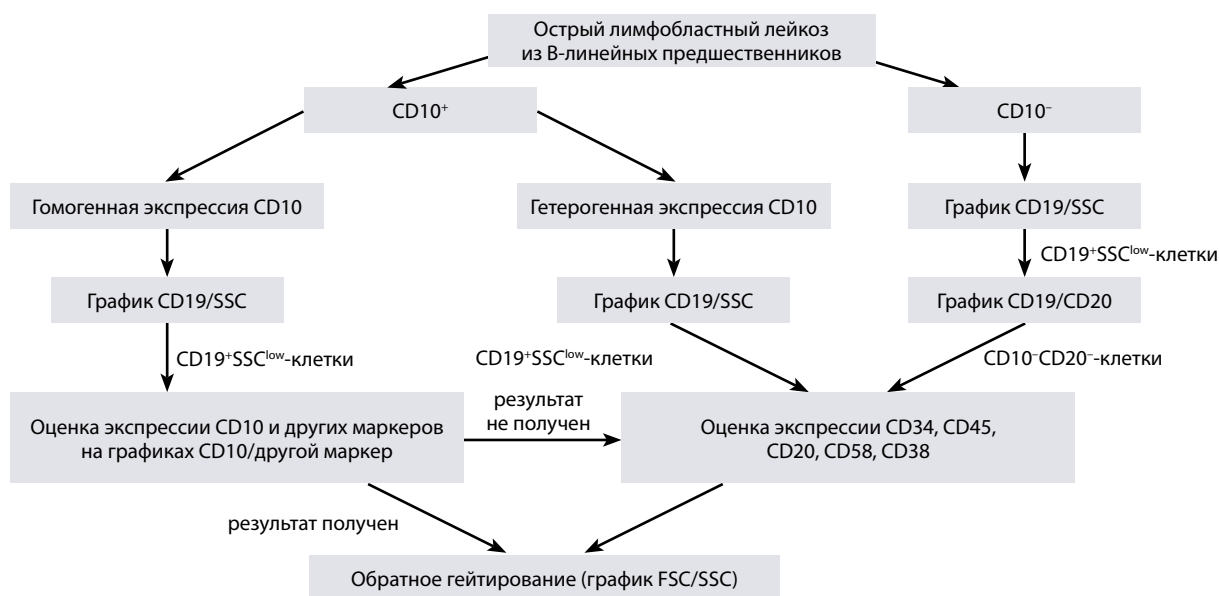


Рис. 1. Алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при $CD10^+$ и $CD10^-$ вариантах острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников

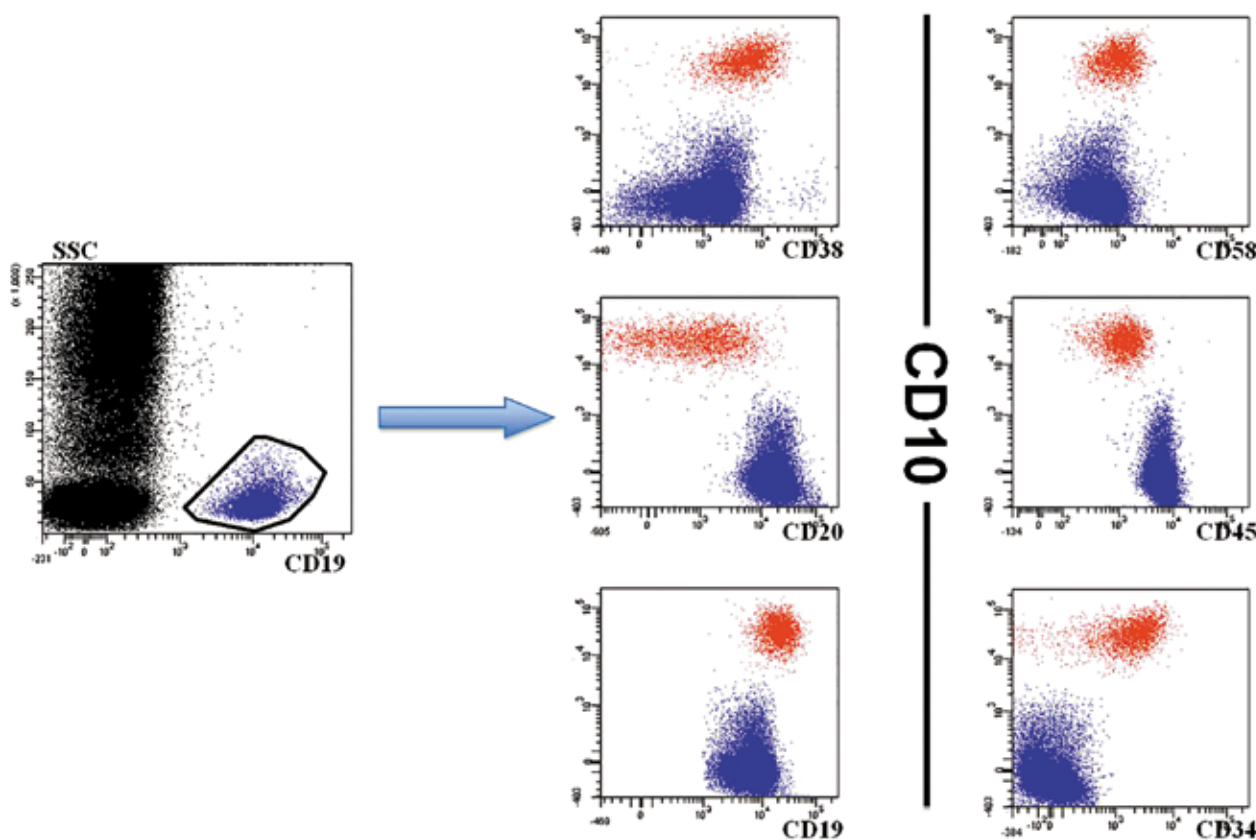


Рис. 2. Пример расположения остаточных опухолевых клеток на точечных графиках на 15-й день терапии $CD10^+$ острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников. Опухолевые клетки показаны красным цветом, зрелые В-лимфоциты — синим, остальные клетки — черным

Для этого необходимо использовать CD38, CD34, CD45. После выделения опухолевых клеток они должны быть отображены на графике FSC/SSC для исключения из анализа мертвых клеток (рис. 3) [34, 35].

Для успешного определения МОБ нужно также учитывать, что фенотип опухолевых клеток может

существенно меняться во время терапии. Наиболее распространенными тенденциями изменений являются снижение экспрессии CD10, CD34 и CD58, а также повышение экспрессии CD20, CD45 и CD19 [25, 26]. При наличии перестроек гена *MLL* изменения иммунофенотипа могут быть очень существенными [36, 37].

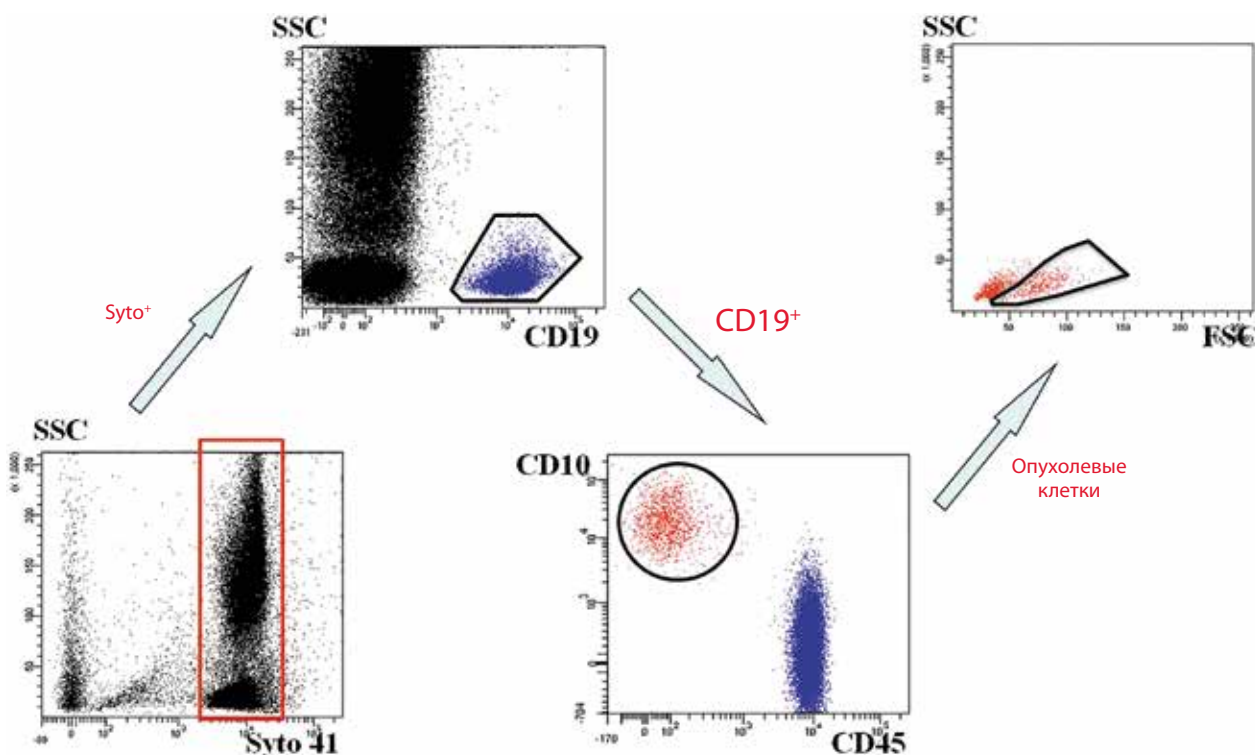


Рис. 3. Пример последовательного выделения опухолевых клеток при определении минимальной остаточной болезни. Опухолевые клетки показаны красным цветом, зрелые В-лимфоциты — синим

Величина МОБ при определении методом проточной цитометрии рассчитывается как процентное содержание опухолевых клеток среди всех ядродержащих клеток КМ. При этом для идентификации опухолевых клеток используются различные варианты комбинаций антител, а итоговым уровнем МОБ считается максимальное количество, полученное в одной из пробирок. Ядродержащие клетки в образце могут быть определены 2 разными способами. Возможно выделение региона лейкоцитов на графике FSC/SSC, однако при анализе большого числа клеток обычно достаточно сложно на скатерограмме четко отделить клетки от дробиса. Рекомендуется применение ДНК-тропного красителя, окрашивание которым позволяет четко отделить ядродержащие клетки от всех случайно зафиксированных цитометром событий. Чаще всего для этих целей используются красители SYTO16 (канал FITC проточного цитометра) или SYTO41 (канал PacificBlue). Предпочтительным является добавление ДНК-тропного красителя прямо в пробирку, в которой проводится определение МОБ. В этом случае выделение CD19⁺ клеток производится только среди SYTO⁺ (см. рис. 3). Если же такой возможности нет, рекомендуется провести дополнительное окрашивание SYTO/CD19/CD45.

При определении МОБ методом проточной цитометрии позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 и более клеток, имеющих лейкозассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лимфобластам. Макси-

мальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток) составляет 0,001 %, т. е. возможно выявить 1 опухолевую клетку среди 100 000 нормальных. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной чувствительностью обычно принято считать 0,01 %, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удастся собрать достаточное количество клеток, а опухолевые клетки не выявляются, исследование считается невозможным.

В заключении, выдаваемом лабораторией по результатам определения МОБ, кроме базовой информации о пациенте должны также указываться название протокола терапии и этап лечения.

Апробация применения выработанных подходов для определения минимальной остаточной болезни в рамках многоцентрового исследования

Результаты участия лабораторий группы «Москва—Берлин» во внешнем контрольном исследовании по определению МОБ, которое проводилось в декабре 2007 г. группой AIEOP-BFM, представлены на рис. 4. Результаты, полученные в каждой из лабораторий, показали очень высокую сопоставимость с референсными значениями.

Рассылка цитометрических данных внутри группы также показала хорошую сходимость результатов, получаемых в разных лабораториях, как на 15-й, так и на 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB 2015 (рис. 5а–в). При этом результаты определения МОБ

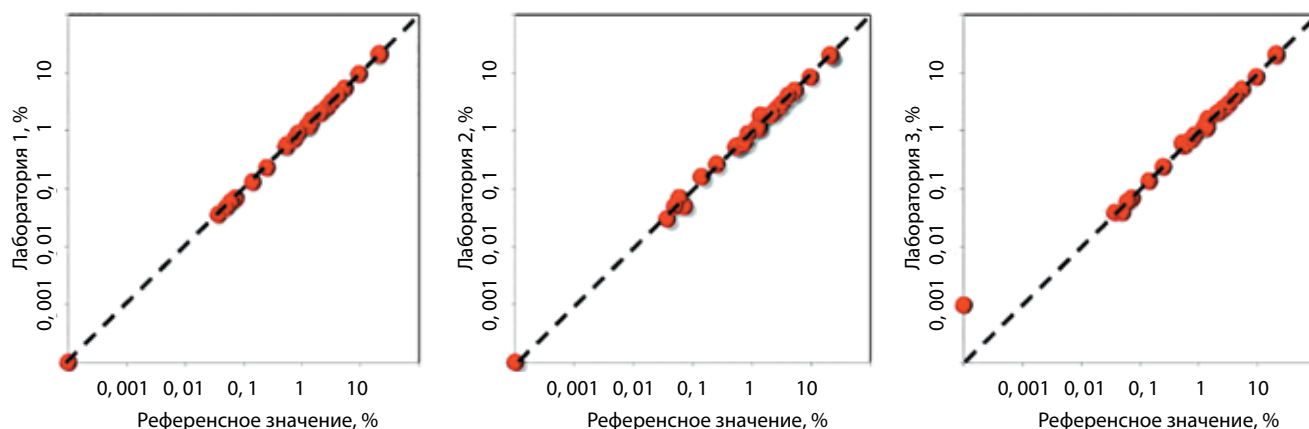


Рис. 4. Результаты участия лабораторий рабочей группы в круговом исследовании, проводившемся группой AIEOP-BFM (данные предоставлены M.N. Dworzak). Результаты определения минимальной остаточной болезни на 15-й день терапии, полученные в каждой лаборатории, сравнивались с референсными значениями, представляющими собой медиану результатов 4 наиболее опытных лабораторий группы AIEOP-BFM

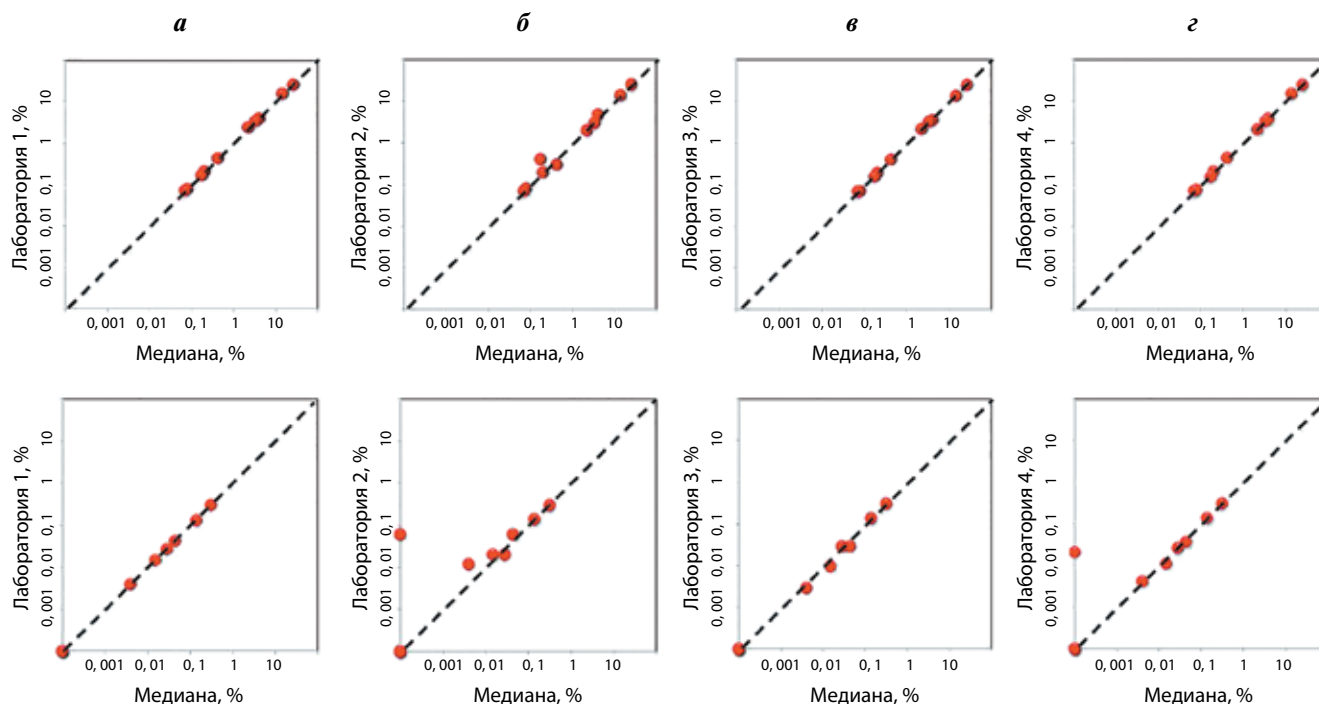


Рис. 5. Результаты участия лабораторий рабочей группы (а–в) в круговом исследовании в рамках протокола ALL–MB 2015. Результаты определения минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й (верхний ряд) и 36-й (нижний ряд) дни терапии, полученные в каждой лаборатории, сравнивались с референсными значениями, представляющими собой медиану результатов всех 3 лабораторий. В исследовании приняла участие еще 1 лаборатория, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках ALL–MB 2015 (г)

на момент окончания индукционной терапии оказались несколько менее сопоставимыми, поскольку на данном этапе лечения величины МОБ обычно ближе к предельным значениям аналитической чувствительности проточной цитометрии, чем на 15-й день. Данные еще одной лаборатории, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках протокола ALL–MB 2015, не отличались существенно от результатов, полученных в референсных лабораториях протокола ALL–MB 2008 (рис. 5г).

Распределение пациентов, у которых МОБ определялась в референсных лабораториях, по количеству

остаточных опухолевых клеток представлено на рис. 6. Существенных различий также не обнаружено, хотя, как и ожидалось, одинаковых результатов получено не было.

Обсуждение

Несмотря на то, что проточная цитометрия относительно давно признается одним из основных методов мониторинга МОБ при ОЛЛ у детей, попытки стандартизации ее применения немногочисленны. Отсутствие должного уровня стандартизации является одним из основных недостатков данной технологии

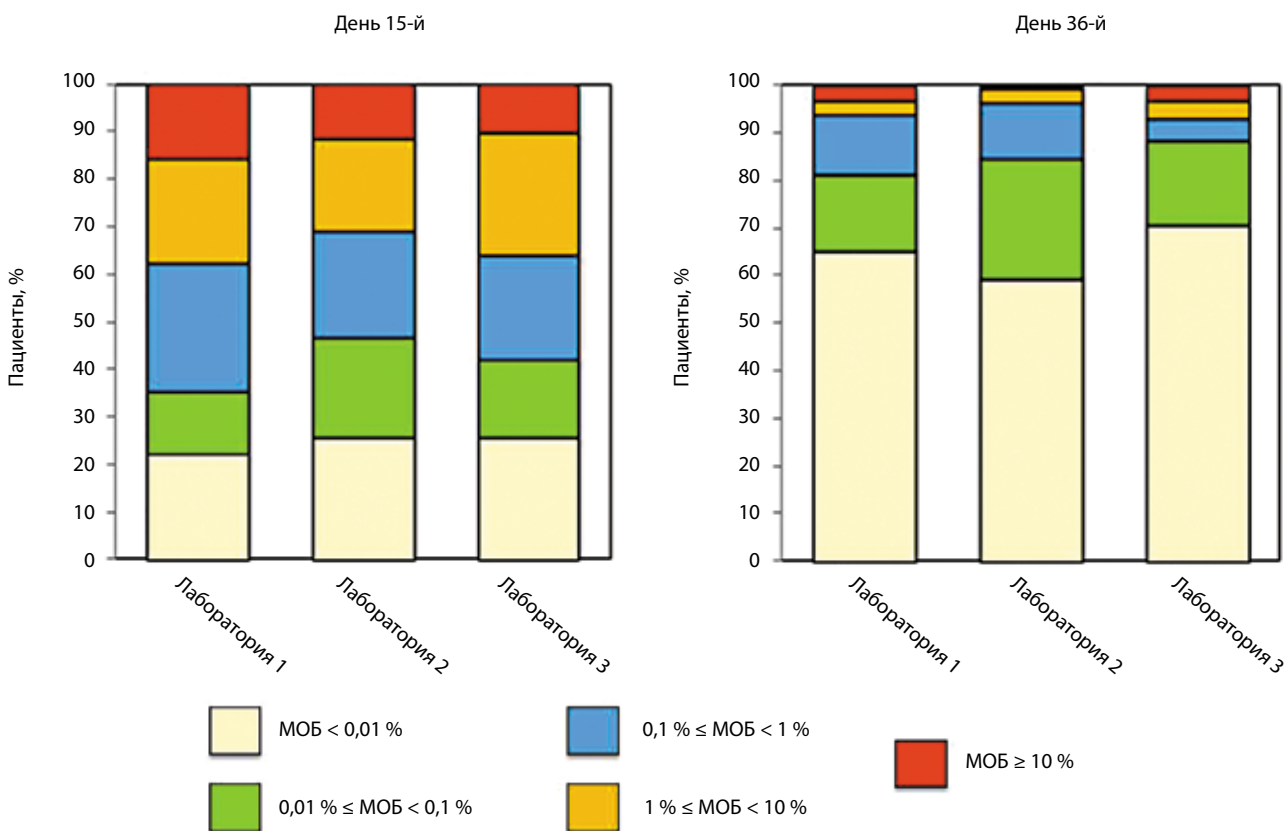


Рис. 6. Распределение по величинам минимальной остаточной болезни (МОБ) результатов, полученных в лабораториях рабочей группы при мониторинге МОБ в исследовании ALL-MB 2008

по сравнению с ее основным «соперником» — определением пациент-специфических перестроек генов тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Однако сложности применения данного варианта ПЦР определяют необходимость разработки стандартизованных протоколов определения МОБ проточной цитометрией в рамках различных терапевтических протоколов. На данный момент такие попытки проводятся группами AIEOP-BFM [16], UKALL [17], NOPHO [18]. Кроме того, высокий уровень стандартизации определения МОБ при ОЛЛ предлагает не связанная с определенными терапевтическими протоколами группа EuroFlow [14]. В российских группах по исследованию ОЛЛ применение ПЦР в реальном времени практически невозможно ввиду высокой стоимости и крайней технологической сложности данного метода [7, 8]. Поэтому стандартизация определения МОБ методом проточной цитометрии является крайне необходимой для последующего его применения в рамках многоцентровых исследований, тем более что для результатов, полученных как на 15-й,

так и на 36-й дни терапии по протоколам ALL-MB 2002 и ALL-MB 2008, показано существенное прогностическое значение [38–41]. Нами был разработан и успешно внедрен стандартизованный протокол определения МОБ методом проточной цитометрии при ВП-ОЛЛ на разных этапах терапии. Применение таких подходов позволило достичь очень высокой сопоставимости данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий еще одной лаборатории показала высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов определения МОБ.

Заключение

Таким образом, разработанные и представленные в данной работе стандартизованные подходы к мониторингу МОБ методом проточной цитометрии во время и по окончании индукционной терапии по протоколам группы «Москва–Берлин» позволят в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в системе референсных лабораторий в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по терапии ОЛЛ у детей.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Mörike A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257. PMID: 20010625.
2. Pui C.H., Pei D., Sandlund D.T. et al. Long-term results of St. Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):371–82. DOI: 10.1038/leu.2009.252. PMID: 20010620.
3. Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551–65. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7405. PMID: 21220611.
4. Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E., Relling M.V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120(6):1165–74. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943. PMID: 22730540.
5. Moppett J., Burke G.A.A., Steward C.G. et al. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003;56(4):249–53. PMID: 12663634.
6. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:7–12. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.7. PMID: 21239764.
7. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:137–42. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.137. PMID: 23233572.
8. Brüggemann M., Schrauder A., Raff T. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521–35. DOI: 10.1038/leu.2009.268. PMID: 20033054.
9. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691–6. PMID: 11023499.
10. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8. PMID: 11877265.
11. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002;100(1):52–8. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0006. PMID: 12070008.
12. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477–85. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837. PMID: 18388178.
13. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168–74. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934. PMID: 19805690.
14. van Dongen J.J.M., van der Velden V.J.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;125(26):3996–4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027. PMID: 25999452.
15. van der Velden V.J.H., Panzer-Grümayer E.R., Cazzaniga G. et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21(4):706–13. DOI: 10.1038/sj.leu.2404535. PMID: 17287857.
16. Dworzak M.N., Gaipa G., Ratei R. et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(6):331–40. DOI: 10.1002/cyto.b.20430. PMID: 18548617.
17. Irwing J., Jesson J., Virgo P. et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870–4. DOI: 10.3324/haematol.2008.000414. PMID: 19377076.
18. Björklund E., Matinlauri I., Tierens A. et al. Quality control of flow cytometry data analysis for evaluation of minimal residual disease in bone marrow from acute leukemia patients during treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(6):406–15. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181a1c0e8. PMID: 19648789.
19. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;(4):19–27. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Rumyantsev A.G. Optimizing of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in Russia. *Pediatrya = Pediatrics* 2009;(4):19–27. (In Russ.)].
20. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Алейникова О.В. и др. Эффективность протокола ALL-MB-2002 у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Терапевтический архив* 2010;(7):11–20. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Aleynikova O.V. et al. The efficacy of ALL-MB-2002 treatment protocol in children with acute lymphoblastic leukemia. *Tera-pevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives* 2010;(7):11–20. (In Russ.)].
21. Литвинов Д.В., Карелин А.Ф., Романова К.И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор.Ру* 2015;(10):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A.F., Romanova K.I. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia treatment: current options and unresolved problems. *Doctor.Ru* 2015;(10):30–7. (In Russ.)].
22. Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A. Abstr 2828.
23. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010;(6):299–304. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Immunophenotype aberrations useful for minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-positive B-predecessors acute lymphoblastic leukemia. *Immunologiya = Immunology* 2010;(6):299–304. (In Russ.)].
24. Мовчан Л.В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов. *Онкогематология* 2012;(1):22–8. [Movchan L.V. Leukemia-associated immunophenotype in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2012;(1):22–8. (In Russ.)].
25. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. *Иммунология* 2010;(2):60–4. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Changes

- in tumor immunophenotype by day 15 of induction therapy according ALL-MB-2008 protocol in children with CD10-positive acute lymphoblastic leukemia. *Immunologiya = Immunology* 2010;(2):60–4. (In Russ.).
26. Мовчан Л.В., Шман Т.В., Белевцев М.В. и др. Изменение иммунофенотипа лейкоэмических клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2011;(1):21–6. [Movchan L.V., Shman T.V., Belevtsev M.V. et al. Changing of leukemic cells immunophenotype during induction therapy in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics* 2011;(1):21–6. (In Russ.).]
27. Karachunskiy A., Herold R., von Stackelberg A. et al. Results of the first randomized multicentre trial on childhood acute lymphoblastic leukaemia in Russia. *Leukemia* 2008;22(6):1144–53. DOI: 10.1038/leu.2008.63. PMID: 18368070.
28. McKenna R. W., Washington L. T., Aquino D. B. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001;98(8):2498–507. PMID: 11588048.
29. van Lochem E. G., van der Velden V. H., Wind H. K. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60(1):1–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008. PMID: 15221864.
30. Sędek Ł., Balsa J., Sonsala A. et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? *Cytometry B Clin Cytom* 2014;86(5):329–39. DOI: 10.1002/cyto.b.21176. PMID: 24845957.
31. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухлевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология* 2016;(3):302–13. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G. et al. Acute leukemia: differences in immunophenotype of blast cells and their non-neoplastic counterparts in the bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2016;(3):302–13. (In Russ.).]
32. Coustan-Smith E., Ribeiro R. C., Stow P. et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97–102. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0066. PMID: 16537802.
33. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Ограниченная возможность применения упрощенного подхода для определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. *Клиническая лабораторная диагностика* 2011;(3):25–9. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Limited possibility of simplified approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in children with B-predecessors acute lymphoblastic leukemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2011;(3):25–9. (In Russ.).]
34. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(5):31–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Algorithm of minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-negative B-predecessors acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics* 2012;(5):31–5. (In Russ.).]
35. Цаур Г.А., Попов А.М., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2016;(1):62–74. [Tsaur G.A., Popov A.M., Fechina L.G., Rumyantsev S.A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;(1):62–74. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-62-74.
36. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Особенности мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. *Детская онкология* 2008;(2):32–5. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu. et al. Monitoring of minimal residual disease by flow cytometry in infants with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Detskaya onkologiya = Pediatric Oncology* 2008;(2):32–5. (In Russ.).]
37. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Возможности применения NG2 для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей 1-го года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, ассоциированным с реаранжировками гена MLL. *Гематология и трансфузиология* 2009;(6):19–22. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Use of NG2 for minimum residual disease monitoring by flow cytometry in infants with MLL rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2009;(6):19–22. (In Russ.).]
38. Савва Н.Н., Красько О.В., Белевцев М.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-MB-2002 (однофакторный и многофакторный анализ). *Онкогематология* 2009;(2):17–21. [Savva N.N., Kras'ko O. V., Belevtsev M.V. et al. The prognostic value of minimal residual disease for relapse-free survival in children with acute lymphoblastic leukemia treating according to ALL-MB-2002 protocol (univariate and multivariate analysis). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2009;(2):17–21. (In Russ.).]
39. Meleshko A. N., Savva N. N., Fedasenko U. U. et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk Res* 2011;35(10):1312–20. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.04.013. PMID: 21596436.
40. Мигаль Н.В., Белевцев М.В., Мовчан Л.В. и др. Прогностическое значение минимальной резидуальной болезни у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;(1):50–7. [Migal' N.V., Belevtsev M.V., Movchan L.V. et al. The prognostic value of minimal residual disease in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics* 2015;(1):50–7. (In Russ.).]
41. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью. *Онкогематология* 2015;10(4):44–55. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu. et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(4):44–55. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-44-55.

Исследование морфологии и распределения α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нормальных предшественниках лейкоцитов миелоидного ростка с помощью клеточного биочипа

О.С. Федянина^{1,2}, А.О. Закирова^{1,2}, А.Е. Задорожная³, Н.М. Капранов^{2,4}, А.Н. Хвастунова^{1,2},
П.А. Ядгарова³, А.В. Филатов⁵, О.С. Бурова⁶, Ф.И. Атауллаханов¹⁻³, С.А. Кузнецова^{1,2}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 38А, корп. 1;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1;

⁴ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а;

⁵ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России»; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁶ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Софья Алексеевна Кузнецова kuznetsova.sonya@gmail.com

В данной работе описано и количественно охарактеризовано распределение моноклеаров, выделенных из аспирата костного мозга здоровых доноров и рассортированных по их поверхностным CD-антигенам на клеточном биочипе, по морфологии (для 11 доноров), а также по наличию или отсутствию в клетках активности α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы (для 9 доноров). Эти данные могут быть использованы в качестве референсных значений при диагностике острых миелоидных лейкозов с помощью клеточного биочипа.

Ключевые слова: клеточный биочип, нормальный костный мозг, миелоидные предшественники, α -нафтилбутиратэстераза, нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-74-79

Morphology and distribution of α -naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase in normal myelomonocytic precursors studied by the cell microarray

O.S. Fedyanina^{1,2}, A.O. Zakirova^{1,2}, A.E. Zadorozhnaya³, N.M. Kapranov^{2,4}, A.N. Khvastunova^{1,2}, P.A. Yadgarova³,
A.V. Filatov⁵, O.S. Burova⁶, F.I. Ataulakhonov¹⁻³, S.A. Kuznetsova^{1,2}

¹Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Center of Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences;
Build. 1, 38A Leninskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

⁴Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

⁵National Research Center "Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia";
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

⁶N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Here we describe and qualitatively characterize the distribution of mononuclear cells isolated from bone marrow aspirate of healthy donors and sorted by their surface CD antigens on a cell microarray by morphology (for 11 donors) and by absence or presence of α -naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase (for 9 donors). These data can be used as a reference for the diagnosis of acute myeloid leukemia using the cell microarray.

Key words: cell microarray, normal bone marrow, myeloid lineages, α -naphthyl butyrate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase

Введение

Диагностика острых лейкозов основывается на обнаружении в костном мозге (КМ) патологических незрелых (бластных) клеток и определении их линей-

ной принадлежности. Анализ бластной популяции в пунктате КМ проводится параллельно с помощью оценки морфологии в мазках и иммунофенотипирования, т. е. определения на поверхности бластных

клеток маркеров дифференцировки (CD-антигенов) методом проточной цитометрии. При диагностике острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) проводится также исследование цитохимической активности в лейкоцитах КМ в мазке, причем для уточнения варианта ОМЛ используются данные о цитохимической активности как опухолевых клеток, так и нормальных лейкоцитов гранулоцитарного и моноцитарного ростков КМ. Одним из перспективных цитохимических методов, применяемых при дифференциальной диагностике ОМЛ, является исследование активности лейкоцитарных эстераз. С. Y. Li и соавт. [1] при разделении экстрактов нормальных и патологических лейкоцитов человека в полиакриламидном геле идентифицировали 9 изоформ эстераз, которые делятся на 2 основные группы: полосы 1, 2, 7, 8 и 9 соответствуют нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе (так называемой специфической эстеразе), а полосы 3, 4, 5 и 6 — неспецифической, способной расщеплять как α -нафтилбутират, так и α -нафтилацетат. При этом α -нафтилбутират лучше выявляет активность эстераз полосы 4, а α -нафтилацетат — полосы 5 [1]. В той же работе было показано, что в зрелых и созревающих гранулоцитах наиболее активны эстеразы полос 7 и 9, а в зрелых моноцитах — полос 4 и 5, что позволяет использовать анализ на специфическую и неспецифическую эстеразы для разделения гранулоцитарного и моноцитарного ростка при диагностике ОМЛ [1]. Были также предложены протоколы одновременного (параллельного [2, 3] и последовательного [4]) окрашивания на специфическую и неспецифическую эстеразы. Основным достоинством такого окрашивания по сравнению с традиционно используемыми реакциями на миелопероксидазу для определения миелоидных клеток и неспецифическую эстеразу для выявления клеток моноцитарной природы является возможность визуализировать отдельно гранулоцитарный и отдельно моноцитарный компонент одновременно на одном и том же образце.

До недавнего времени не существовало метода, позволяющего совместить определение поверхностных CD-антигенов лейкоцитов с полноценным исследованием морфологии или активности линиеспецифичных ферментов. Нашей группой разработан клеточный биочип, позволяющий рассортировать лейкоциты по их поверхностным CD-антигенам и затем провести на рассортированных клетках морфологическое или цитохимическое исследование [5, 6]. Клеточный биочип представляет собой прозрачную подложку с областями иммобилизованных моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным CD-антигенам лейкоцитов [5]. При инкубации биочипа с суспензией лейкоцитов человека клетки, несущие определенный поверхностный антиген, связываются только с соответствующими антителами. После отмывки несвязавшихся клеток на подложке остаются области, заполненные лейкоцитами, несущими разные поверхностные

антигены. Связавшиеся с антителами клетки затем фиксируют и окрашивают для дальнейшего морфологического или цитохимического исследования. Таким образом, клетки оказываются рассортированы в зависимости от присутствующих на их поверхности CD-антигенов, что позволяет определить степень их зрелости и принадлежность к той или иной линии не только по морфологии, но и по иммунофенотипу [5].

В ряде работ качественно описаны результаты окрашивания на двойную эстеразу мазков КМ пациентов с различными вариантами ОМЛ [2–4, 7]. Показано, что в норме специфическая эстераза активна в части миелобластов, присутствует во всех созревающих нейтрофилах начиная со стадии промиелоцита и практически отсутствует в других лейкоцитах КМ [4]. Неспецифическая эстераза, напротив, активна в мегакариocyтах и моноцитах, но зависимость активности ферментов данного типа от зрелости клеток не исследовалась [4]. Однако количественного анализа распределения активности специфической и неспецифической эстераз среди лейкоцитов нормального КМ не проводилось.

Целью данной работы было исследование морфологических особенностей и цитохимической активности специфической и неспецифической эстераз для нормальных лейкоцитов КМ, несущих тот или иной CD-антиген, с помощью клеточного биочипа.

Материалы и методы

Изготовление биочипов

Биочипы изготавливали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [5, 6]. В панель биочипа входили антитела к CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD10, CD16, CD19, CD38, CD45, HLA-DR (ООО «Сорбент», Россия) и CD4, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41a, CD61, CD45RA, CD45RO, CD64, CD117, CD123 (eBioscience, США).

Выделение лейкоцитов и их анализ

Выделение лейкоцитов из пунктата КМ и их последующий анализ с помощью клеточного биочипа были выполнены, как описано в [5], с использованием окраски по Паппенгейму.

Цитохимическое окрашивание лейкоцитов на биочипе

В работе использовали протокол последовательного окрашивания на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу [8] с небольшими модификациями. Чип фиксировали 30 с в охлажденном до 4 °C формол-ацетоновом фиксаторе (20 мг Na_2HPO_4 (Sigma), 100 мг KH_2PO_4 (Serva), 45 мл ацетона, 25 мл 40 % формалина, 30 мл воды), отмывали в проточной воде и высушивали. В 20 мл фосфатного буфера (100 мМ, pH 8,0) растворяли 18 мг соли прочного синего BB (Sigma). Далее добавляли 0,4 мл α -нафтилбутирата (4 мг/мл) в ацетоне. Чип инкубировали в полученном растворе

в течение 45 мин в темноте при комнатной температуре, отмывали в проточной воде и высушивали на воздухе. Для определения активности нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы 10 мг соли прочного синего ВВ растворяли в 19 мл фосфатного буфера (66 мМ, рН 7,4), добавляли 1 мл раствора нафтол-AS-D-хлорацетата (Sigma) в N-диметилформамиде (2,5 мг/мл). Этим раствором заливали тот же чип и инкубировали 30 мин в темноте, отмывали в проточной воде, высушивали на воздухе и анализировали.

При использовании прочного синего ВВ в качестве визуализирующего агента продукт реакции неспецифических эстераз с α -нафтилбутиратом выпадает в виде бурого осадка, продукт реакции специфических

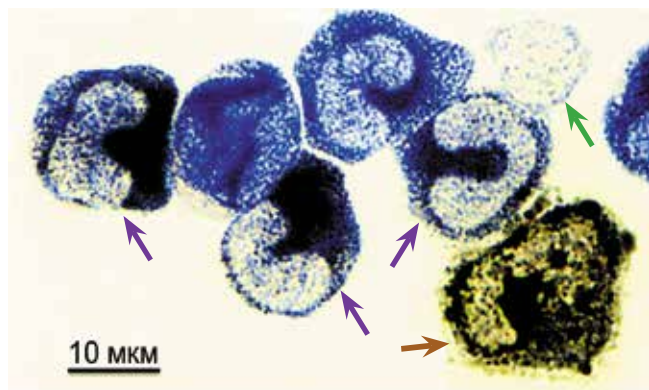


Рис. 1. Мононуклеары нормального костного мозга, связавшиеся с иммобилизованным антителом к CD11b, окрашенные по последовательному протоколу на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу. Клетка с бурой окраской, несущая α -нафтилбутиратэстеразу, указана коричневой стрелкой; неокрашенная клетка — зеленой стрелкой; клетки с двойной окраской, содержащие обе эстеразы, — фиолетовыми стрелками; клетки с синей или фиолетовой окраской, несущие нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, не отмечены. $\times 1000$

эстераз с нафтол-AS-D-хлорацетатом — в виде синего или фиолетового осадка [8] (рис. 1).

Анализ данных

Морфологию и цитохимическую активность лейкоцитов на биочипе анализировали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ni в светлом поле и камеры Nikon DS-Ri1. Для каждого пятна анти-CD было выполнено не менее 3 фотографий при увеличении $\times 400$ или 1 фотография при увеличении $\times 200$. Для анализа морфологии рассчитывали относительную плотность связывания лейкоцитов с пятнами антител, при этом за 100 % принимали количество клеток, связавшихся с пятном анти-CD45RA. Затем в пятнах антител к миеломоноцитарным маркерам CD11b, CD13, CD15, CD33, CD64, а также к HLA-DR, CD45, CD45RA при увеличении $\times 1000$ было проанализировано 100 клеток, среди которых морфологически определялось количество миело-/монобластов, промиелоцитов и промоноцитов. Для анализа цитохимической активности в данном исследовании определяли

относительные плотности связывания клеток, положительных только по специфической или только по неспецифической эстеразе, положительных или отрицательных по обоим эстеразам, принимая за 100 % плотность заполнения пятна с анти-CD45RA.

Пациенты

Для исследования морфологии были использованы пунктаты КМ 11 добровольных здоровых доноров (7 — мужского пола, 4 — женского) в возрасте от 4 до 16 лет (медиана 8 лет), а для исследования распределения цитохимической активности 2 эстераз — пунктаты КМ 9 добровольных здоровых доноров (4 — мужского пола, 5 — женского) в возрасте от 5 до 46 лет (медиана 25,5 года), взятые в процессе подготовки к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Согласие на забор КМ и будущие биомедицинские исследования было получено.

Результаты и обсуждение

Морфологическая оценка клеточного состава лейкоцитов костного мозга, связавшихся с антителами на клеточном биочипе

В работе исследовано относительное содержание миеломоноцитарных предшественников (миело-/монобластов, промиелоцитов и промоноцитов) среди клеток, связавшихся на биочипе с антителами к CD11b, CD13, CD15, CD33, CD64, HLA-DR и CD45, CD45RA. Миело-/монобласты (рис. 2а) отличались крупным размером (до 18 мкм), большим ядром, занимающим практически все пространство клетки, узкой полоской цитоплазмы голубого цвета, нежным тонким хроматином, четко различимыми одной или несколькими нуклеолами. Промоноциты (рис. 2б) имели более грубый рисунок хроматина, чем миело-/монобласты, менее различимые 1–2 нуклеолы, цитоплазму сероголубого цвета. В некоторых клетках выявлялась пылевидная азурофильная зернистость. Промиеоциты (рис. 2в) представляли собой крупные (до 20 мкм) клетки с большим, чем у миелобластов, количеством базофильной цитоплазмы, содержащей крупные хорошо различимые азурофильные гранулы. Ядро промиелоцита чаще располагалось эксцентрично, хроматин был чуть более конденсирован, чем у миелобласта, но все еще разреженный, ядрышко — менее различимо или отсутствовало.

На диаграмме (рис. 2г) представлена плотность связывания этих морфологических типов клеток с антителами на биочипе, нормированная на плотность связывания клеток с анти-CD45RA.

Поскольку маркер CD11b начинает экспрессироваться на поверхности созревающих гранулоцитов лишь на стадии миелоцитов, а его экспрессия на промоноцитах невысока [9, 10], на биочипе предшественники миелоидного ряда не связывались с антителами к CD11b. Поэтому наличие на биочипе миеломоноцитарных предшественников, положительных по CD11b,

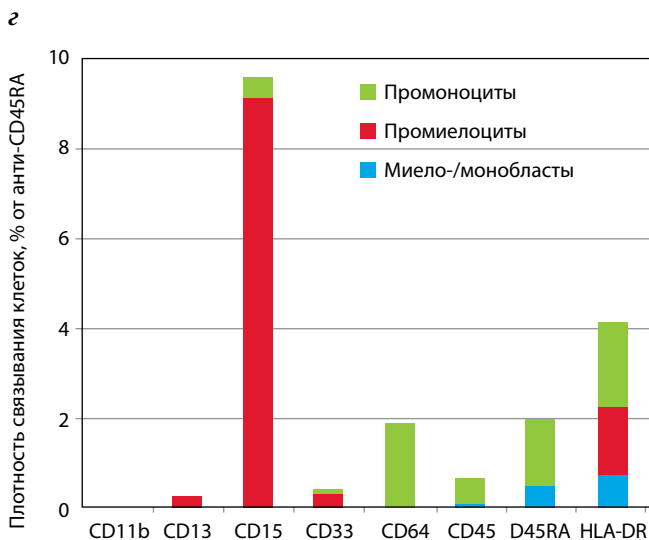
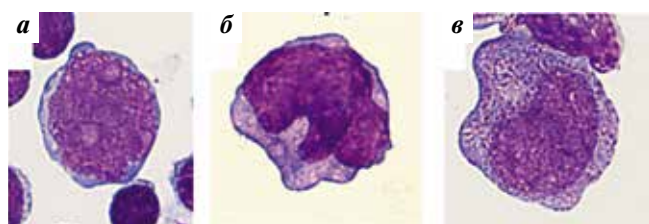


Рис. 2. Морфология нормальных миеломоноцитарных предшественников на клеточном биочипе: а – миело-/монобласт; б – промоноцит; в – промиелоцит; г – диаграмма плотностей связывания миеломоноцитарных предшественников с различными антителами на биочипе, нормированная на плотность связывания лейкоцитов с анти-CD45RA

может служить указанием на нарушение гемопоэза. Наибольшее количество промиелоцитов связывается с анти-CD15 (9 % промиелоцитов от CD45RA), поскольку из всех исследованных миелоидных маркеров плотность экспрессии именно CD15 на них максимальна [9]. Также в небольшом количестве промиелоциты были найдены на пятнах анти-CD33 и анти-HLA-DR (0,5 и 1,0 % соответственно). Промоноциты связывались с антителами к CD64, CD45, CD45RA, HLA-DR с плотностью до 2 % от максимального заполнения, что соответствует данным о наличии этих маркеров на поверхности клеток моноцитарного ряда [8]. В группу миело-/монобластов были включены морфологически неразличимые ранние предшественники обоих ростков лейкоцитарного гемопоэза. Хотя опухолевые миело-/монобласты активно экспрессируют CD13 и CD33 на своей поверхности, в КМ здоровых доноров на биочипе эти клетки были найдены только на пятне анти-HLA-DR в количестве 0,7 %. Отсутствие связывания нормальных миело-/монобластов с анти-CD13 и анти-CD33 на биочипе может быть объяснено низкой экспрессией данных маркеров на их поверхности (менее 100 на 1 клетку) [9–11].

Полученные данные о морфологическом составе миелоидных предшественников, несущих определенный антиген, могут быть использованы при постанов-

ке диагноза ОМЛ по FAB-классификации с помощью биочипа.

Распределение предшественников лейкоцитов на биочипе по содержанию α -нафтилбутират-эстеразы и/или нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нормальном костном мозге

На рис. 1 представлены характерные результаты последовательной окраски на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу нормальных мононуклеаров КМ, связавшихся на биочипе с антителами к CD11b. Диаграмма распределения лейкоцитов в пятнах биочипа по наличию в них α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы показана на рис. 3. Мононуклеары нормального КМ, положительные по CD3, CD5, CD7 и CD19, отрицательны по обоим эстеразам; среди клеток, положительных по CD2 и CD4, 7 ± 5 и 27 ± 11 % соответственно положительны по α -нафтилбутиратэстеразе, что соответствует субпопуляции зрелых моноцитов, экспрессирующих данные маркеры [12]. Небольшое варибельное количество (7 ± 6 % от плотности заполнения анти-CD45RA) CD10⁺ клеток, положительных по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе, соответствует сегментоядерным нейтрофилам, оставшимся после их удаления из суспензии центрифугированием в градиенте плотности [12]. Среди всех CD38⁺ нормальных мононуклеаров КМ 12 ± 8 % положительны по α -нафтилбутиратэстеразе и 12 ± 11 % – по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе, что согласуется с данными литературы по экспрессии данного маркера на подгруппе моноцитов и части зрелых и незрелых миелоидных клеток [12]. Клетки, положительные по CD123, отрицательны по обоим эстеразам в соответствии с данными литературы [11], и небольшое количество CD123⁺ клеток, положительных по неспецифической эстеразе (до 2 % от максимального заполнения), отражает неспецифическое связывание моноцитов с анти-CD123 на биочипе. Поскольку в 79 % случаев бластные клетки при ОМЛ экспрессируют CD123 с уровнем экспрессии, в десятки раз превышающим экспрессию данного маркера на нормальных миелоидных предшественниках [11], появление значительного количества CD123⁺ клеток, положительных по специфической или неспецифической эстеразе, является указанием на нарушения гемопоэза. Среди HLA-DR⁺ клеток встречается небольшая подгруппа α -нафтилбутиратсодержащих клеток (9 ± 6 % от плотности заполнения анти-CD45RA), соответствующая моноцитам с высоким уровнем экспрессии HLA-DR [12]. По данным литературы, CD13 и CD33 присутствуют с постоянной, но невысокой плотностью с самых ранних этапов дифференцировки как моноцитов, так и гранулоцитов, но их экспрессия невысока [11]. Поэтому CD13⁺ и CD33⁺ клетки содержат как α -нафтилбутиратэстеразу, так и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, но плотность их связывания с антителами к этим маркерам

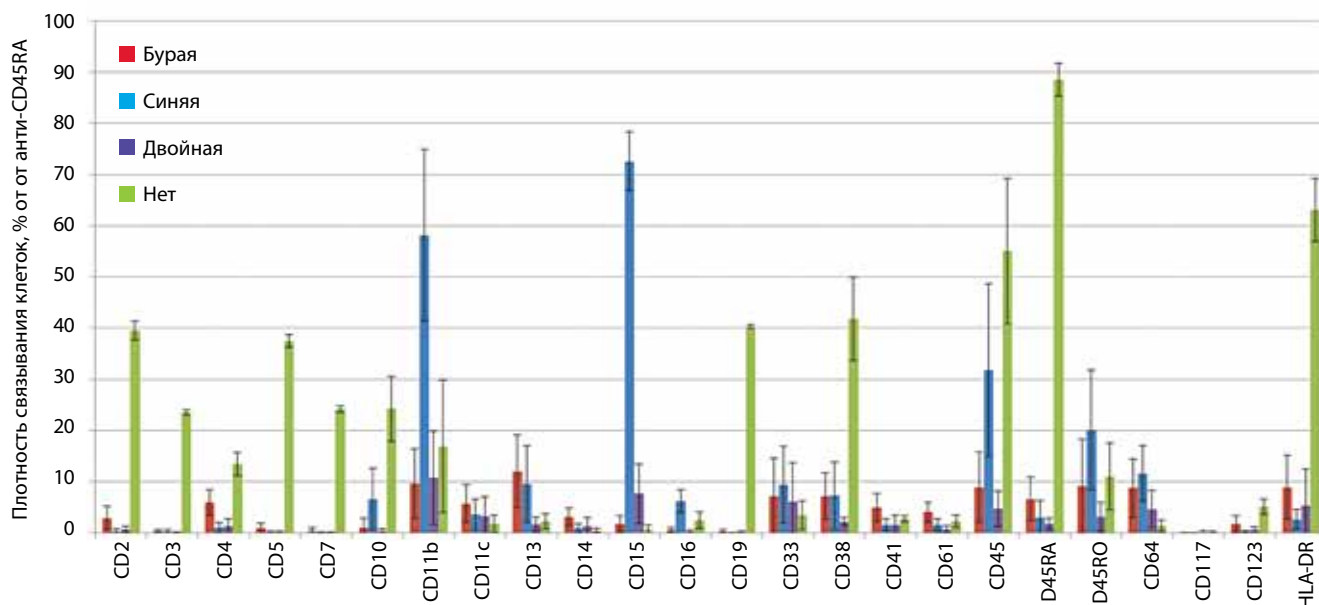


Рис. 3. Диаграмма распределения предшественников лейкоцитов в пятнах биочипа по наличию в них α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы. Представлены усредненные значения по 9 донорам, в качестве ошибки взято стандартное отклонение. Подсчет и окрашивание выполнены как описано в разделе «Материалы и методы»

на биочипе невелика. Поверхностный CD11c характерен для клеток моноцитарной природы. Пренебрежимо малое количество CD11c-клеток, положительных по специфической эстеразе (4 ± 3 % от плотности заполнения положительного контроля), может отражать небольшое количество CD11c⁺ созревающих гранулоцитов, начиная со стадии миелоцита [12]. CD11b и CD15 появляются на созревающих гранулоцитах на уровне миелоцитов с высокой плотностью, а CD16 — при переходе от палочкоядерных к сегментоядерным нейтрофилам [9, 10]. Поэтому с антителами к данным маркерам связываются с высокой плотностью клетки, положительные по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе. Небольшое количество CD15⁺ клеток, положительных по α -нафтилбутиратэстеразе, объясняется промежуточной экспрессией CD15 на промиелоцитах до стадии, экспрессирующей CD14, что хорошо согласуется с представленными выше морфологическими данными о связывании промиелоцитов с анти-CD15 на биочипе (см. рис. 2). Плотность клеток, содержащих неспецифическую эстеразу, примерно одинакова (6–12 % от максимальной плотности связывания) на антителах ко всем антигенам, характерным для моноцитов (CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD64), и положительном контроле анти-CD45 и соответствует примерно 1–8 % нормы моноцитов в здоровом КМ [10].

Причина появления клеток, окрашивающихся в использованном нами протоколе как на нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, так и на α -нафтилбутиратэсте-

разу (двойная окраска), до конца не известна. Часть этих клеток может представлять собой незрелые моноцитарные предшественники (монобласты и промиелоциты), содержащие оба типа эстераз. Однако по представленным в работе морфологическим данным количество этих клеток недостаточно велико, чтобы полностью объяснить наличие клеток с двойной окраской. По данным С.У. Ли и соавт., эстеразы полосы 2, имеющие активность как в отношении α -нафтилбутирата, так и нафтол-AS-D-хлорацетата, присутствуют в части моноцитов и гранулоцитов, вызывая неспецифическую «перекрестную» окраску [1], что также может объяснять присутствие небольшого (до 10 % от максимальной плотности связывания) количества клеток с двойной окраской.

Заключение

В целом полученное в работе распределение на биочипе клеток, несущих одну или обе эстеразы, хорошо согласуется с данными проточной цитометрии об экспрессии различных CD-антигенов на разных стадиях созревания клеток миелоидного и моноцитарного ряда и может быть использовано в качестве референсных значений при диагностике ОМЛ с помощью клеточного биочипа.

Финансирование. Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-34-01030 и № 16-04-00282). А.Н. Хвастунова поддержана стипендией президента СП-1929. 2016.4.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Li C.Y., Lam K.W., Yam L.T. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973;21(1):1–12. PMID: 4694536.
2. Swirsky D.M. Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. *J Clin Pathol* 1984;37(10):1187–90. PMID: 6593326.
3. Ainoon O., Jabamoney A.J., Cheong S.K. Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. *Malays J Pathol* 1991;13(1):47–9. PMID: 1724544.
4. Yam L.T., Li C.Y., Crosby W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 1971;55(3):283–90. PMID: 5549896.
5. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al'-Radi L.S. et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep* 2015;5:12573. DOI: 10.1038/srep12573. PMID: 26212756.
6. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология* 2015;10(1):58–66. [Khvastunova A.N., Al'-Radi L.S., Kapranov N.M. Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(1):58–66. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.
7. Rozenszajn L., Leibovich M., Shoham D., Epstein J. The esterase activity in megaloblasts, leukemic and normal hematopoietic cells. *Br J Hematol* 1968;14(6):605–10. PMID: 5241511.
8. Bain B.J., Bates I., Laffan M.A. *Dacie and Lewis practical haematology*. Elsevier Health Sciences, 2016.
9. Terstappen L.W., Gandour D., Huang S. et al. Assessment of hematopoietic cell differentiation by multidimensional flow cytometry. *J Hematother* 1993;2(3):431–47. DOI: 10.1089/scd.1.1993.2.431. PMID: 7522894.
10. van Lochem E.G., van der Velden V.H., Wind H.K. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60 (1):1–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008. PMID: 15221864.
11. Ehninger A., Kramer M., Röhlig C. et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2014;4: e218. DOI: 10.1038/bcj.2014.39. PMID: 24927407.
12. Ortolani C. *Flow cytometry of hematological malignancies*. John Wiley & Sons, 2011.

ПРЕСС - КОНФЕРЕНЦИЯ



Москва, 14 ноября 2016 г.

Новейшее исследование: клиническое питание способствует успешному преодолению онкологических заболеваний

14 ноября 2016 г. в пресс-центре МИА «Россия сегодня» состоялась пресс-конференция по теме «Нутритивная поддержка пациентов с онкологическими заболеваниями», на которой были представлены новейшие данные по клиническому питанию детей со злокачественными новообразованиями. Мероприятие прошло при участии представителей Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга и Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии (ФНКЦ ДГОИ) им. Дмитрия Рогачева, на базе которого реализуется проект Центра нутритивной поддержки компании Nutricia Advanced Medical Nutrition и фонда Danone Ecosystem.

Нередко тяжелобольные пациенты лишаются возможности естественного (перорального) приема пищи, из-за чего могут терять 5–10 % исходной массы тела за неделю, что снижает способность организма к восстановлению. Именно поэтому проблема нутритивной поддержки с момента постановки диагноза в современной онкологии, особенно в педиатрической практике, вышла на первый план: сегодня в России насчитывается порядка 30 000 детей с различными онкологическими заболеваниями.

По данным зарубежных исследований, нутритивная поддержка может сыграть значимую положительную роль для детей со злокачественными опухолями в ходе проведения противоопухолевой терапии. В рандомизированном исследовании J. Bakish и соавт. (2003) было обследовано 112 детей с опухолями центральной нервной системы, план лечения которых также включал лечебную диету, энтеральное и парентеральное питание. Наиболее высокие результаты (увеличение массы тела на 10 % и более за 3 мес) отмечались в группе детей, получавших дополнительно к лечебному рациону энтеральное питание¹.

Аналогичное исследование проводилось в России на базе ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Оно показало, что почти 100 % пациентов потребляют лишь 50 % и менее от предложенной еды, а 70–100 % детей имеют исходную нутритивную недостаточность или риск ее развития, что может привести к ряду тяжелых осложнений. В то же время применение клинического питания позволяет улучшить состояние пациентов. Так, при анализе антропометрических показателей

в ходе исследования было выявлено, что у детей, получавших дополнительную нутритивную поддержку, отмечалась положительная динамика нутритивного статуса или же нутритивный статус был без динамики, но оставался при этом в пределах нормы. Так, в 2 группах пациентов, получавших смеси для энтерального питания, положительная динамика была выявлена у 75 и 50 % детей; у остальных пациентов из этой группы антропометрические показатели существенно не изменялись. В группе детей, которые не получали клинического питания, больных с положительной динамикой нутритивного статуса не было, а у большинства (60 %) антропометрические показатели в ходе наблюдения снижались².

Нутритивная энтеральная поддержка позволяет сократить длительность пребывания пациентов с онкологическими заболеваниями в стационаре и палате интенсивной терапии. Об этом сообщил участник пресс-конференции — главный врач Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга д.м.н. **Георгий Моисеевич Манихас**: «Оптимально подобранное энтеральное питание обеспечивает поддержание энергетических потребностей организма, а зачастую служит самостоятельным весомым лечебным фактором. К сожалению, пока в России уровень распространенности энтерального питания недостаточен. Также оставляет желать лучшего уровень информированности докторов в данной области».

Для формирования модели эффективной нутритивной поддержки тяжелобольных пациентов в 2014 г. начал работу проект «Центр нутритивной поддержки», который направлен на актуализацию необходимости

¹Bakish J., Hargrave D., Tariq N. et al. Evaluation of dietetic intervention in children with medulloblastoma or supratentorial primitive neuroectodermal tumors. Cancer 2003;98(5):1014–20. DOI: 10.1002/cncr.11598. PMID: 12942570.

²https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKewjKmLnD3J3QAhXC1hoKHx9KA2wQFggdMAA&url=ht tp%3A%2F%2Fnodgo.abvpress.ru%2Fjour%2Farticle%2Fdownload%2F190%2F186&usg=AFQjCNHr5JwKp6VYzOI_36fyCMEnQtYBIg&sig2=SY TPXomojT5bZRZxswzEHQ&cad=rjt

нутритивной поддержки пациентов с онкологическими заболеваниями и улучшение качества их жизни. За время его работы в Санкт-Петербурге организована первая в России программа обеспечения энтеральным лечебным питанием пациентов с онкологическими заболеваниями в амбулаторных условиях — система Home Care, позволяющая совместить домашний уход на этапе восстановления и реабилитации с энтеральным питанием. В подобной модели питания появляется возможность улучшить жизненные показатели пациентов, ускорить выздоровление, снизить количество осложнений после перенесенного лечения, повысить качество жизни в целом.

Для дальнейшего формирования службы нутритивной поддержки в России необходимо развитие образовательных программ в области лечебного клинического питания, проведение тематических круглых столов и др. Данный комплекс мер позволит избежать инвалидизации пациентов, повысить качество их жизни и в конечном итоге снизить расходы системы здравоохранения на лечение онкологических заболеваний.

Генеральный директор ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, главный внештатный специалист по детской

гематологии Минздрава России, академик РАН, д.м.н., проф. **Александр Григорьевич Румянцев** сообщил, что в настоящее время ведется активная работа по внедрению опыта ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и Санкт-Петербурга в российские регионы: *«Сегодня необходимо максимально широкое распространение данных о клиническом питании среди врачей и пациентов. Планируется, что в различных регионах страны будут созданы группы нутритивной поддержки. Для врачей, работающих с тяжелобольными пациентами, будет организован специальный обучающий проект. Также необходимо проводить обучающие мероприятия для родственников таких больных, где они смогут получить достоверную информацию о роли питания в процессе лечения и реабилитации пациентов, в том числе детей с онкологическими заболеваниями»*.

Инициатором проекта «Центр нутритивной поддержки» стал ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева совместно с Региональным благотворительным общественным фондом помощи детям с тяжелыми заболеваниями крови, фондом Danone Ecosystem и компанией Nutricia Advanced Medical Nutrition.

ИНТЕРВЬЮ



«Процесс лечения и реабилитации неотделим от питания» – интервью с главным врачом Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга д.м.н. Георгием Моисеевичем Манихасом

— Георгий Моисеевич, в Санкт-Петербурге впервые в нашей стране разработана и реализована государственная программа обеспечения онкологических пациентов лечебным энтеральным питанием в амбулаторных условиях. Расскажите, пожалуйста, как вы пришли к такому решению и как вы этого добились?

— Новое — это, как правило, хорошо забытое старое. Если мы вспомним Аристотеля или Гиппократов, то они лечили питанием, а именно вином и теми продуктами, которые в то время употреблял в пищу человек. Процесс лечения и реабилитации всегда был неотделим от питания. Сегодня ему уделяется большое внимание, особенно в онкологии. Именно эти пациенты, как никто другой, нуждаются в реабилитации, в том числе в правильном питании во время и после лечения. Три года назад мы начали работу над программой по предупреждению и лечению онкологических заболеваний у жителей Санкт-Петербурга, и уже тогда мы уделили особое внимание питанию.

Пациенты, особенно с опухолями головы и шеи, глотки и гортани, наиболее уязвимы, так как они не могут сами перерабатывать пищу физиологическим путем, говоря проще, они не могут пережевывать и глотать. Основная масса наших пациентов — это больные со II, III, а иногда и IV стадиями заболевания. К сожалению, на этом этапе они, как правило, уже не могут питаться самостоятельно.

Именно поэтому им необходимы специализированные продукты питания в жидкой форме, которые легко усваиваются, а значит, быстрее идет набор веса, восстановление всех функций организма, выздоровление, и наконец, возвращение к обычному образу жизни. Можно с уверенностью сказать, что лечебные энтеральные смеси являются основным компонентом реабилитации таких пациентов.

В нашем учреждении есть отдел реабилитации стомированных пациентов, у которых мы увидели необходимость в энтеральном питании не только в стаци-

онаре, но и амбулаторно. Нашей целью было сохранить преемственность между госпитальным и амбулаторным этапами лечения и сделать реабилитацию наших пациентов более эффективной.

— Говорят, что дома и стены помогают. Именно поэтому многие пациенты стремятся быстрее выписаться из больницы. Если говорить про питание, то каждый знает: домашняя пища и вкуснее, и роднее. Зачем же, вернувшись из больницы домой, надо вместо аппетитного куска мяса получать маленькую бутылочку с лечебной смесью?

— Во-первых, я повторюсь: многие пациенты просто не могут принимать обычную пищу, тем более в необходимом объеме. Во-вторых, обычные продукты часто плохо усваиваются из-за поражения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта во время агрессивного лечения. Ну и в-третьих, в домашних условиях приготовить смеси, которые будут восстанавливать белковый и жировой баланс, невозможно. Так же, кстати, как и невозможно провести до конца весь процесс реабилитации в стационаре.

Процесс восстановления онкологических больных очень сложный и очень длительный. Иногда наши пациенты вынуждены принимать определенные препараты на протяжении всей жизни. Мы же говорим о том, что специализированное питание является неотъемлемой частью лечебного процесса. Именно поэтому мы инициировали программу по обеспечению пациентов с онкологическими заболеваниями головы и шеи, глотки и гортани продуктами специализированного питания во время лечения и реабилитации. Правительство Санкт-Петербурга поддержало нашу инициативу и выделило средства для обеспечения энтеральным питанием пациентов с онкологическими заболеваниями в амбулаторных условиях, что отражено в пятилетней региональной программе «Развитие здравоохранения в Санкт-Петербурге» на 2015–2020 гг.

Энтеральное питание закупается нашим отделом реабилитации, и его доставка осуществляется пациентам

на дом. Мы, в свою очередь, строго контролируем процесс закупок, доставки и, что самое главное, правильный прием пациентами питания.

— **Можете ли вы сказать, что пациенты, принимающие энтеральное питание, восстанавливаются быстрее, чем те, кто его не принимает?**

— Да, это действительно так. Быстрее идет набор веса, улучшается физическое и даже психологическое состояние, восстановление трудовых навыков, работоспособности. Я хотел бы обратить внимание еще на один очень важный момент. Благодаря нашей программе у пациентов появляется ощущение, что о них заботятся и они не одиноки. Во время лечения в стационаре каждый пациент чувствует к себе повышенное внимание врача, медсестры, даже санитарки, особенно это касается детей. Когда наступает момент выписки, он вдруг оказывается один на один со своим недугом и порой чувствует себя абсолютно беспомощным и никому не нужным. В рамках нашей программы медицинская сестра, приезжая к пациенту на дом, не просто доставляет лечебное питание, но проверяет его состояние, отвечает на вопросы, помогает адаптироваться и пациенту, и его семье к изменившимся обстоятельствам, поддерживает их психологически.

Я глубоко убежден, что лечение онкологических больных должно проводиться в специализированных учреждениях. Там, где выстроена вся система оказания

помощи пациентам. Начиная с диагностики, далее — лечение и восстановление.

Успех любого лечения зависит от многих факторов. Зачастую операция, лучевая или химиотерапия — это всего лишь определенный этап в жизни пациента, и надеяться на успех проведенного лечения можно только в том случае, когда восстановительный период будет находиться под врачебным контролем. Именно эта мысль легла в основу нашей программы по обеспечению пациентов специализированным питанием. Мы добились того, чтобы пациент получал адекватную нутритивную поддержку не только во время лечения в стационаре, но и на протяжении всего восстановительного периода.

Несомненно, то, что онкологические пациенты в Санкт-Петербурге теперь бесплатно обеспечиваются лечебным питанием на дому, очень важно и должно быть внедрено в других регионах нашей страны, где пациенты точно так же нуждаются в заботе и поддержке не только в больнице, но и амбулаторно. Я не считаю то, что мы сделали, новаторством или чем-то необыкновенным. Это нормальный процесс, который должен присутствовать во всех специализированных онкологических учреждениях.

— **Спасибо, Георгий Моисеевич, за интересный рассказ и, главное, за ваше неравнодушие и заботу о пациентах. Хочется верить, что ваш опыт в области лечебного питания будет перенят вашими коллегами и чиновниками от здравоохранения во всех уголках нашей страны.**

ПРЕСС - РЕЛИЗ

Миссия Nutricia Advanced Medical Nutrition: «Улучшать результаты лечения и качество жизни пациентов»

История бренда Nutricia насчитывает 120 лет. Основанная в Нидерландах, в городе Зутермеер, компания изначально специализировалась на производстве лабораторно синтезированных детских молочных смесей, являясь признанным экспертом в области питания для новорожденных. В 1905 г. Nutricia разработала такие продукты специализированного питания, как молоко с низким содержанием сахара для больных диабетом и обогащенное йодом для страдающих заболеванием щитовидной железы, что сделало ее новатором в сфере специализированного питания.

Впоследствии компания Nutricia все больше фокусировалась на производстве продуктов, эффективность которых доказана научными исследованиями. В 1946 г. в лабораториях компании был открыт первый запатентованный исследовательский отдел. А в 1950 г. в компанию были приглашены диетологи. С этого момента история компании Nutricia начинает стремительное развитие.

Научные успехи 1960-х годов привели к усовершенствованию продуктов клинического питания и выпуску NUTRI 2000 — полноценного сбалансированного продукта для людей с хроническими заболеваниями и серьезными нарушениями питания.

В 1990-х годах Nutricia расширила производство благодаря покупке заводов SHS International (Великобритания) и Milupa (Германия), тем самым подняв свой профессиональный уровень в таких областях, как врожденные метаболические расстройства и аллергия к белкам коровьего молока. Совместно с британским брендом детского питания Cow & Gate эти направления бизнеса были объединены в концерн Numico. В 2007 г. группа Danone приобрела компанию Numico.

В Россию Nutricia пришла в 1994 г. Изначально компания специализировалась на производстве детских

молочных смесей. В дальнейшем, в 1998 г., Nutricia впервые представила на российском рынке специализированный продукт для энтерального питания — Nutrison® сухая смесь. В 2001 г. впервые в России появились готовые к употреблению жидкие продукты энтерального питания, как для зондового применения (Nutrison®), так и для перорального использования (Nutridrink®). Также состоялся запуск продукции, входящей в группу лечебного питания для пациентов с наследственными болезнями обмена и специализированного питания для детей, страдающих аллергиями к белкам коровьего молока, — Neocate®. В 2004 г. было создано самостоятельное подразделение клинического питания, которое стало заниматься продвижением энтеральных и метаболических продуктов.

С 2007 г. исследовательская команда Nutricia объединилась с исследовательским подразделением Danone, которое является одним из самых крупных в мире, насчитывая более 200 нутрициологов, молекулярных биологов и химиков. Задачей ученых Nutricia по всему миру является непрерывный поиск, разработка и внедрение инноваций для совершенствования продуктов специализированного питания. 28 декабря 2011 г. в России была создана отдельная компания ООО «Нутриция Эдванс», которая развивает новое направление — специализированное клиническое питание. На сегодняшний день Нутриция Эдванс является лидером в своей области и работает в нескольких ключевых направлениях медицины: фенилкетонурия и редкие метаболические болезни, интенсивная терапия, онкология, педиатрия, аллергология и др. ООО «Нутриция Эдванс» является аффилированным поставщиком группы компаний Nutricia в России и в данный момент ведет успешную деятельность на территории России, Казахстана, Белоруссии, Армении, Киргизии.

Памяти

Александра Эдуардовича Мациониса

Александр Эдуардович Мационис родился 1 января 1957 г. и умер 11 октября 2016 г., не дожив до 60 лет. Умер от страшной неизлечимой болезни, из тех, с которыми боролся последние десятилетия работы и с которой пришлось бороться самому. Боролся уверенно и смело, не допуская вовсе, что она его может победить. Он был непобедим, так жил, так поступал и умел передать эту уверенность тем, кто в этом нуждался. Казалось, и здесь победит. Не получилось.

Родился А.Э. Мационис в Узбекистане, школу окончил в Кисловодске и сразу же связал свою судьбу с медициной, причем пошел в нестандартном направлении. Прошел профессиональный путь патологоанатома с самого начала — от санитаря в морге, медбрата и лаборанта в лабораториях и хирургических отделениях. Уже на 4-м курсе учебы в Ростовском государственном медицинском университете пришел в студенческий кружок по патанатомии. Не отступал от этого пути — по окончании университета он врач-интерн патологоанатомического отделения, с 1982 г. — врач-патолог Ростовской областной клинической больницы, а с 1985 г. стал заведовать отделением. Реорганизовал службу в области, ездил по стране, учил и консультировал. В сложные 1990-е годы под его руководством Ростовское патологоанатомическое отделение было



Александр Эдуардович Мационис (1957–2016).

Ушел из жизни Александр Эдуардович Мационис... Ушел от друзей, коллег, любимых и любящих его людей. Ушел молодым, красивым и очень нужным всем вокруг — знакомым и незнакомым, близким и далеким. Нужны его знания и умение поддержать, помочь и научить, развеселить и заставить задуматься. Его больше нет. Это — горе и большая несправедливость судьбы.

реорганизовано в Ростовское областное патологоанатомическое бюро с 7 филиалами по области. С 1994 г. и до конца своих дней был заведующим лабораторией молекулярной генетики и иммуногистохимии отделения экспериментальной

патоморфологии «Патологоанатомическое бюро» Ростовской области. Это была одна из первых таких структур в стране, которые решали диагностические задачи практической медицины.

Кандидатскую диссертацию Александр Эдуардович защитил в 1993 г., докторскую — в 1998 г. Обе работы были посвящены исследованию патоморфологии и патофизиологии мозга, а точнее — его синаптического аппарата. После защиты докторской диссертации А.Э. Мационис заинтересовался онкодиагностикой и в основном занимался внедрением методов иммуногистохимии и молекулярной генетики в повседневную диагностическую практику врачей-патологоанатомов. Очень уважал онкогематологов, дружил с педиатрами. Другие направления его деятельности — онкоурология, фармакодиагностика при раке молочной железы. Много писал, опубликовал около 300 работ, в том числе несколько монографий, в основном по онкоурологии. С 1999 г. — член-корреспондент Российской академии естественных наук в области биомедицины.

Александра Эдуардовича Мациониса уважали, ценили и просто любили, он был в центре внимания в любых ситуациях. И всегда оставался высоким профессионалом.

Искренне соболезнуем близким, друзьям и коллегам.

Будем помнить...

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Онкогематология» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

1. Общие правила

- Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным разрешением на публикацию, заверенным печатью учреждения, в котором работает первый в списке автор. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- Название статьи.
- Инициалы и фамилии всех авторов.
- Ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов.
- Полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа.
- Адрес учреждения с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - Фамилия, имя, отчество полностью.
 - Занимаемая должность.
 - Ученая степень, ученое звание.
 - Персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>).
 - Персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp).
 - Контактный телефон.
 - Рабочий адрес с указанием индекса.
 - Адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, размер 14, междустрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- Введение.
- Цели.
- Материалы и методы.
- Результаты.
- Обсуждение.
- Заключение (выводы).
- Конфликт интересов.
- При наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.).
- Благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи.

Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, онкогематология (ОГ)).

9. Список литературы

На следующей странице после текста статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Литература приводится в порядке цитирования. Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на литературные источники в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20–25 источников, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты.

Ссылки на тезисы возможны исключительно на зарубежные издания, опубликованные на английском языке.

Ссылки на авторефераты диссертаций, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из Internet, не допускаются.

Ссылки на литературные источники должны быть оформлены следующим образом.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском тексте).

Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

10. Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»/ «Authors declare no conflict of interest».

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях, см. информацию на сайте.
- Материалы для публикации принимаются по электронному адресу j.roumiantseva@mail.ru** с пометкой «Ответственному секретарю. Публикация в ОГ».

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

