

# ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Н о р м а л ь н ы е  
и л е й к е м и ч е с к и е  
с т в о л о в ы е к л е т к и**

**М и к р о ч и п ы**

**О с т р ы е л е й к о з ы у д е т е й**

**Т р а н с п л а н т а ц и я  
г е м о п о з т и ч е с к и х  
с т в о л о в ы х к л е т о к  
п р и о с т р ы х л е й к о з а х  
и л и м ф о м а х**

**А с п е р г и л л е з**

№ 1-2

# ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

## ONCOHEMATOLOGY

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

*докт. мед. наук проф.*

**М.А. Волкова**

### Ответственный секретарь

*канд. мед. наук А.Д. Ширин*

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

*Докт. мед. наук проф. Д.Ш. Османов*

*Докт. мед. наук Е.А. Демина*

*Докт. мед. наук Г.С. Тумян*

*Докт. мед. наук проф. М.А. Френкель*

*Докт. мед. наук А.В. Попа*

*Докт. мед. наук А.И. Павловская*

*Докт. мед. наук проф. Б.П. Копнин*

*Докт. мед. наук проф. Е.В. Домрачева*

*Канд. мед. наук Е.В. Чигринова*

### EDITOR-IN-CHIEF

*Prof. M.A. Volkova,  
MD*

### Executive Secretary

*A.D. Shirin, PhD*

### EDITORIAL BOARD

*Prof. D.Sh. Osmanov, MD*

*E.A. Demina, MD*

*G.S. Tumyan, MD*

*Prof. M.A. Frenkel, MD*

*A.V. Popa, MD*

*A.I. Pavlovskaya, MD*

*Prof. B.P. Kopnin, MD*

*Prof. E.V. Domracheva, MD*

*E.V. Chigrinova, PhD*

О С Н О В А Н В 2 0 0 5 Г .

### Адрес редакции:

125009, Москва,

ул. Б. Дмитровка, д. 9, стр. 7.

тел./факс: 8(495) 252-96-19

629-78-25

e-mail: abv@abvpress.ru

www.netoncology.ru

Заведующая редакцией **Е.В. Колесникова**

Редактор **Т.Е. Дубинина**

Корректор **Т.А. Афанасьева**

Дизайн и верстка **А.В. Амаспюр**

Журнал зарегистрирован в Федеральной

службе по надзору за соблюдением

законодательства в сфере массовых

коммуникаций и охране культурного

наследия 9 июня 2005 г.

ПИ № ФС77-21308

При перепечатке материалов ссылка  
на журнал «Онкогематология»  
обязательна

ISSN 1818-8346.

Онкогематология. 2006. № 1—2. 1—132

© ООО «АБВ-пресс», 2006

Отпечатано в типографии

ЗАО «Д-графикс»

Тираж 1500 экз.

№ 1-2  
2006

# СОДЕРЖАНИЕ

---

## БИОЛОГИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

*Н.И. Дризе*

**Различия между лейкозными и нормальными кроветворными стволовыми клетками** 5

*О.Д. Захаров, Е.Ю. Рыбалкина, М.А. Волкова, А.А. Ставровская*

**Маркеры множественной лекарственной устойчивости при острых миелоидных лейкозах** 9

*А.С. Бавыкин, М.А. Волкова*

**FLT3-тирозинкиназа при острых нелимфобластных лейкозах** 15

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ

*Т.В. Наседкина*

**Использование биологических микрочипов в онкогематологии** 25

*Е.В. Чигринова, А.И. Павловская*

**Современные возможности диагностики поражения костного мозга при неходжкинских лимфомах на материале трепанобиоптата** 38

## ТЕРАПИЯ

### Химиотерапия

*М.А. Масчан, Н.В. Мякова*

**Острый лимфобластный лейкоз у детей** 50

*А.В. Попа, С.А. Маякова*

**Лечение острого миелоидного лейкоза у детей** 63

### Трансплантация

*Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская*

**Роль трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в терапии взрослых больных острыми лейкозами** 70

*В.В. Птушкин, Н.В. Жуков, С.В. Миненко,  
А.Ю. Попов, Д.М. Мхеидзе, Л.Ю. Андреева*

**Роль высокодозной химиотерапии с трансплантацией стволовых кроветворных клеток у больных с неходжкинскими лимфомами** 86

## ОСЛОЖНЕНИЯ И ИХ ТЕРАПИЯ

*Н.Н. Климко*

**Инвазивный аспергиллез у гематологических и онкологических больных** 97

*М.Д. Тер-Ованесов, О.Д. Захаров,  
Б.Е. Полоцкий, М.А. Волкова, И.Е. Тюрин*

**Современная тактика хирургического лечения при инвазивном бронхолегочном аспергиллезе** 108

*И.В. Пылова, Е.А. Демина, Р.Г. Шмаков, Е.Е. Перилова*

**Репродуктивная функция у пациентов с лимфомой Ходжкина и возможности ее сохранения** 113

## СЪЕЗДЫ, КОНФЕРЕНЦИИ

**XI конгресс Европейской гематологической ассоциации** 121

## НОВЫЕ КНИГИ

132

---

# C O N T E N T S

---

## BIOLOGY OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

*N.I. Drize*

**Differences between the leukemic and normal hemopoietic stem cells** 5

*O.D. Zakharov, Ye.Yu. Rybalkina,*

*M.A. Volkova, A.A. Stavrovskaya*

**Multidrug resistance markers in acute myeloid leukemias** 9

*A.S. Bavykin, M.A. Volkova*

**FLT3 tyrosine kinase in acute non-lymphoblastic leukemias** 15

## NEW APPROACHES TO DIAGNOSIS

*T.V. Nasedkina*

**Use of biological microarrays in oncohematology** 25

*Ye.V. Chigrinova, A.I. Pavlovskaya*

**Current possibilities of bone marrow lesion diagnosis  
in non-Hodgkin's lymphomas by trepanobiopsy** 38

## THERAPY

### Chemotherapy

*M.A. Maschan, N.V. Myakova*

**Acute lymphoblastic leukemia in children** 50

*A.V. Popa, S.A. Mayakova*

**Treatment of acute myeloid leukemia in children** 63

### Transplantation

*B.V. Afanasyev, L.S. Zubarovskaya*

**Role of hemopoietic stem cell transplantation  
in therapy of adult patients with acute leukemias** 70

*V.V. Ptushkin, N.V. Zhukov, S.V. Minenko,*

*A.Y. Popov, D.M. Mheidze, L.Y. Andreeva*

**Role of high-dose chemotherapy with hemopoietic stem cell  
transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphomas** 86

## COMPLICATIONS AND THEIR THERAPY

*N.N. Klimko*

**Invasive aspergillosis in hematological and cancer patients** 97

*M.D. Ter-Ovanesov, O.D. Zakharov,*

*B. Ye. Polotsky, M.A. Volkova, I. Ye. Tyurin*

**Current surgical treatment policy in invasive bronchopulmonary aspergillosis** 108

*I.V. Pylova, Ye.A. Demina, R.G. Shmakov, Ye. Ye. Perilova*

**Reproductive function in female patients with Hodgkin's  
lymphoma and possibilities of its preservation** 113

## CONGRESSES, CONFERENCES

**The XI Congress of the European Hematology Association** 121

**NEW BOOKS** 132

---

# ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ



## *Глубокоуважаемые коллеги!*

Новый журнал «Онкогематология» будет выходить 4 раза в год. Он адресован всем, кто интересуется гемобластозами у взрослых и детей. В журнале планируется публиковать оригинальные клинические работы, а также обзоры, посвященные результатам современных исследований в области молекулярной биологии, цитогенетики, иммунологии и их использованию в клинике. Постараемся построить работу так, чтобы в каждом номере журнала читатель нашел для себя что-то интересное. Особое внимание предполагается уделить описанию редких клинических наблюдений и их разбору на основании имеющихся литературных сообщений. Мы будем также регулярно информировать читателей о наиболее важных проблемах, обсуждавшихся на российских и зарубежных конференциях и съездах.

Редакция приглашает всех читателей участвовать в работе журнала – присылать для публикации свои работы, а также письма с критической оценкой опубликованных материалов и деятельности журнала в целом. Активное участие читателей позволит проводить дискуссии по самым разнообразным вопросам, затронутым на страницах издания. Надеемся на вашу помощь и сотрудничество. Давайте будем работать вместе и создадим современный, интересный, нужный журнал.

Главный редактор,  
доктор медицинских наук профессор М.А. Волкова

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Волкова'.

# РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ЛЕЙКОЗНЫМИ И НОРМАЛЬНЫМИ КРОВЕТВОРНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Н.И. Дризе

Гематологический научный центр РАМН, Москва

**Н**еоплазии любой этиологии обусловлены существованием редкой популяции клеток, способных к неограниченному самоподдержанию; эти клетки необходимы для инициации и поддержания опухоли. В случае последующего возникновения лейкоза такие клетки называют лейкозными стволовыми клетками (ЛСК). Для острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) показано, что ЛСК способны переносить и инициировать развитие опухоли у иммунодефицитных мышей [1, 2]. Исследования последних лет выявили очень большое фенотипическое и функциональное сходство между нормальными кроветворными стволовыми клетками (СКК) и ЛСК [3, 4]. Особенно важно, что обе популяции клеток используют одинаковые механизмы, обеспечивающие их самоподдержание [5, 6]. Такие гены, как *HEDGEHOG*, *WNT*, *NOTCH*, *RAR* $\pm$  и *BMI1*, стимулирующие пролиферацию опухолевых клеток, используются также нормальными СКК для самоподдержания [7–11]. Гены, супрессирующие пролиферацию опухолевых клеток, такие как *TP53*, *p16<sup>INK4a</sup>* и *p19<sup>ARF</sup>*, ингибируют также самоподдержание СКК [12, 13]. Возникают ли ЛСК из СКК или же образуются из каких-то других клеток, неизвестно, однако они либо наследуют, либо приобретают свойства нормальных СКК, обеспечивающие их самоподдержание.

Эрадикация ЛСК — решающий момент любой успешной антиопухолевой терапии. Наличие ЛСК объясняет, почему терапия, успешно удаляющая опухолевый клон, очень редко полностью излечивает заболевание. Рецидив является одной из главных причин гибели больных, особенно при ОМЛ. Постоянно разрабатывающиеся методы количественного выявления минимальной остаточной болезни основаны на предположении, что удаление практически всех опухолевых клеток может привести к излечению болезни. Все современные протоколы тестирования, включая самый надежный количественный метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, не обладают достаточной чувствительностью для гарантированного выявления небольшого числа опухолевых клеток. Например, были отмечены рецидивы у больных с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), успешно лечавшихся Иматинибом [14] и находящихся не только в цитогенетической, но и в молекулярной ремиссии. Возникает вопрос: возможна ли терапия, убивающая избирательно ЛСК, но не затрагивающая нормальных стволовых клеток этой же ткани.

Для разработки терапии, элиминирующей исключительно ЛСК и не влияющей на здоровые СКК, прежде всего необходимо найти принципиальные различия между этими клетками. Для этого используются различные методы. Изучение иммунофенотипических характеристик СКК и ЛСК показало, что очень часто они имеют сходный фенотип. И те и другие экспрессируют на своей поверхности маркеры CD34, но не CD71 и HLA-DR. С другой стороны, СКК экспрессируют Thy1 (CD70) и c-Kit (CD117), не выявленные на ЛСК, кото-

рые, в свою очередь, несут на поверхности CD123 и рецептор к интерлейкину 3 $\alpha$ , которых нет на СКК [15–17]. У некоторых больных ОМЛ на поверхности цитогенетически aberrантных ЛСК экспрессируются CD34 и CD90, в других случаях ЛСК бывают CD34-негативными [18–20]. У больных острым промиелоцитарным лейкозом ЛСК с транслокацией t(15;17) также обнаруживаются среди CD34-CD38+, но не CD34+CD38-клеток [2, 18]. Таким образом, не существует единого фенотипа для ЛСК и, возможно, различия между больными являются правилом, а не исключением. Это может быть связано с использованием нескольких протоколов для выделения клеточных популяций и различиями в методах тестирования. Необходимо помнить, что любая «чистая» популяция сортированных клеток, как правило, гетерогенна как функционально, так и по некоторым маркерам. Аналогично при выделении популяций нормальных СКК выявляются различия в специфических свойствах СКК, таких как самоподдержание, способность находиться в состоянии покоя и пролиферации. На сегодняшний день есть скорее характеристики «состояния СКК», чем их характеризованный «портрет» [21]. При изучении профиля экспрессии генов у нормальных СКК выявляются такие же несоответствия, как и при изучении фенотипа, что, скорее всего, пока связано с несопадением методов получения чистых популяций клеток. Так, сравнение «портрета генной экспрессии СКК» тремя независимыми лабораториями выявило всего 3 общих гена среди не менее 20 000 изученных [22]. Тем не менее, метод сравнения уровня экспрессии сразу нескольких тысяч генов с помощью специализированных чипов в настоящее время является наиболее продуктивным. При этом с помощью клеточного сортера выделяются относительно фенотипически чистые популяции клеток, несущих специфические маркеры стволовых, затем из них выделяют РНК и проводят анализ уровня экспрессии генов, сравнивая опухолевые и нормальные клетки. Благодаря этим анализам и было показано, что популяция CD34+CD38-клеток больных ОМЛ очень часто клональна и содержит клетки, инициирующие лейкоз у иммунодефицитных мышей. Клетки из популяции CD34+CD38+ не способны вызывать заболевание у таких мышей. В популяции клеток нормальных доноров, несущих те же маркеры, также находится большинство стволовых клеток [23–25]. Обе анализируемые популяции используют одни и те же гены для самоподдержания. С помощью методов увеличения экспрессии или, наоборот, выключения генов в клеточных линиях были идентифицированы гены факторов транскрипции, регуляции клеточного цикла, самоподдержания и дифференцировки СКК [26, 27].

Такие гены, как *SCL*, *LMO-2*, *GATA-2* и *AML-1* (также называемый *CBFA2*, или *RUNX1*), отвечающие за ранние этапы кроветворения, могут неправильно регулироваться под воздействием транслокаций, возникающих при различных гемопоэтических заболеваниях. Напри-

мер, ген *SCL*, кодирующий транскрипционный фактор *SCL-TAL1*, — наиболее частая мишень хромосомных аберраций при детских Т-клеточных острых лимфобластных лейкозах [28]. *SCL* в норме экспрессируется в СКК и ранних кроветворных предшественниках, его уровень снижается по мере дифференцировки [29]. Повышенная экспрессия этого гена в сочетании с другими онкогенами приводит к опухолевой трансформации [30]. Аналогично транскрипционный фактор *AML-1*, необходимый для нормального кроветворения, в результате транслокации t(8;21) образует сливной ген *AML-ETO*, являющийся одной из наиболее часто встречающихся аберраций при ОМЛ [31]. Конститутивная экспрессия этого гена повышает частоту встречаемости самоподдерживающихся клеток [32] и при наличии дополнительной мутации создает опухолевый фенотип [33].

Другие транскрипционные факторы, к которым относятся гены гомеобокса (*Hox*), включая *HoxB4* и гены семейства *Wnt*, играют важную роль в регуляции самоподдержания и дифференцировки СКК [19, 34]. *HoxB4* участвует в пролиферации СКК без потери их свойств и в то же время поддерживает их способность дифференцироваться в лимфоидном и миелоидном направлениях. По мере дифференцировки экспрессия этого гена исчезает [35, 36]. Неправильная регуляция экспрессии *HoxB4* и *HoxA9* очень часто наблюдается при ОМЛ [37].

Одним из важнейших сигнальных путей, участвующих в самоподдержании СКК, является *Notch/Jagged*. У некоторых больных острым Т-клеточным лейкозом была выявлена транслокация, приводящая к реаранжировке гена *Notch* [38]. Другие факторы транскрипции, к которым относятся *Vmi1* и *Shh*, играют важную роль в регуляции пролиферации и поддержании состояния покоя и СКК, и ЛСК [8, 39]. Было показано, что *Vmi1* участвует в поддержании пролиферативного потенциала ЛСК [6]. Еще один транскрипционный фактор *JunB* регулирует количество СКК, его повышенная экспрессия уменьшает количество длительно репопулирующих СКК, тогда как инактивация приводит к опухолевой трансформации [40]. На экспериментальной модели было показано, что ЛСК могут образовываться на стадии длительно репопулирующих СКК при инактивации этого транскрипционного фактора. Инактивация на модельной системе еще одного важного транскрипционного фактора *PU.1* приводит к развитию миелоидного лейкоза [41]. В то же время при ОМЛ мутации этого гена выявляются очень редко [42]. Возможно, для развития лейкоза достаточно хотя бы снижения уровня экспрессии *PU.1* [43]. Однако необходимо помнить, что для опухолевой прогрессии очень часто необходима вторая мутация, которая усиливает пролиферацию стволовой клетки и ингибирует ее дифференцировку. К таким конститутивно активирующим мутациям относятся нарушения в генах рецепторов ростовых факторов *FLT3* и *C-KIT*, генах *K-* и *N-RAS*, изменения в гене *STAT5A* [44].

Помимо описанных общих свойств ЛСК и СКК популяции этих клеток обладают очень важной для стволовых клеток способностью минимизировать все возможные внешние воздействия. ЛСК, подобно СКК, могут находиться в состоянии покоя [45], обладают высокой лекарственной устойчивостью за счет экспрессии АТФ-зависимых белков-транспортёров [46] и системой антиапоптотической защиты [47]. К сожалению, показано,

что обладание ЛСК всеми этими свойствами успешно позволяет им избегать действия интенсивной химиотерапии [3, 46]. ЛСК либо наследуют, либо приобретают за счет мутаций высокую лекарственную устойчивость. Поэтому ЛСК, к которым относятся инициирующие длительную культуру клетки и ОМЛ колониеобразующие единицы, активно пролиферируют [48, 49], тогда как сами ЛСК находятся вне клеточного цикла.

Для разработки специфических препаратов, элиминирующих ЛСК, но не СКК, пытались ингибировать в ЛСК лекарственную устойчивость. Некоторые агенты, эффективные для ингибирования АТФ-связанных транспортёров, были тщательно протестированы, но оказались мало пригодными для лечения больных [50, 51] в связи с аналогичным действием на здоровые СКК. Изучение специфических для ЛСК путей выживания выявило некоторые различия в механизмах активации апоптоза [52–54]. После того как было выяснено, что транскрипционный фактор NFκB конститутивно активирован в ЛСК, но не в СКК [55], ингибирующие его экспрессию лекарства, такие как идарубин, стали вводить в основные схемы лечения [52]. Недавно было обнаружено, что партенолид (потенциальный ингибитор NFκB) индуцирует апоптоз в ЛСК при ОМЛ и ХМЛ, не затрагивая нормальных СКК [53]. Конститутивная активация фосфатидилинозитид-3-киназы также необходима для жизнедеятельности ЛСК, и ее фармакологическое ингибирование с помощью LY294002 ведет к дозозависимому снижению выживаемости ЛСК [56]. Для эрадикации ЛСК можно, с одной стороны, рекрутировать их из фазы G0 в клеточный цикл и затем попытаться «убить» циклоспецифическими цитостатиками; с другой стороны, может быть более выгодно заставить эти клетки как можно дольше находиться в состоянии покоя, что продлит безрецидивное выживание пациентов. Наличие такой возможности подтверждается существованием клинически различных «вялотекущих» и «пролиферирующих» форм ОМЛ и, соответственно, различной продолжительностью ремиссии у больных.

Совсем недавно было показано, что ЛСК и СКК различаются по экспрессии гена *Pten*, супрессирующего рост опухолей [57]. Выключение *Pten* в гемопоэтических клетках взрослых животных приводит к развитию миело-пролиферативного заболевания в течение нескольких дней и перевиваемого лейкоза в течение нескольких недель. Одновременно утрата *Pten* стимулирует пролиферацию СКК. В такой экспериментальной модели СКК, в отличие от ЛСК, обладают способностью к самоподдержанию в отсутствие *Pten*. Этот эффект регулируется активностью mTOR-киназы, которая ингибируется рапамицином. Обработка рапамицином избирательно элиминирует ЛСК, но не затрагивает СКК. Более того, *Pten*-дефицитные СКК приобретают способность к длительному восстановлению кроветворения у летально облученных реципиентов. Механизм этого явления требует дальнейшего изучения. Возможно, утрата экспрессии *Pten* может индуцировать старение СКК. Например, показано, что делеция *Pten* в клетках простаты ведет к их TP53-зависимому старению [58]. Делеция гена, кодирующего циклинзависимый ингибитор киназ *p21<sup>Cip1</sup>*, также стимулирует пролиферацию СКК с последующим медленным снижением их количества [59]. Так же как и *Pten*, *p21<sup>Cip1</sup>* участвует в поддержании состояния покоя у СКК. Совокупность этих данных говорит о том, что СКК

и ЛСК возможно различать по уровню экспрессии генов, регулирующих состояние покоя. Сравнивая механизмы такой регуляции, можно найти новые схемы для лечения лейкозов и улучшить уже существующие.

Понимание механизмов опухолевой трансформации позволит найти успешные пути ее преодоления. Принято считать, что лейкоз возникает из одной клетки и поддерживается небольшой популяцией ЛСК [60–62]. Работы по ОМЛ показали, что только от 0,1 до 1% опухолевых клеток инициируют лейкоз у иммунодефицитных мышей [1, 2]. Было предложено 2 модели лейкозогенеза. Согласно стохастической модели, масса опухоли состоит из гомогенной популяции незрелых клеток, небольшая часть из которых способна к самоподдержанию или пролиферации, причем выбор происходит случайно [3, 63, 64]. Иерархическая модель подразумевает наличие гетерогенной опухолевой популяции, в которой очень небольшой процент клеток поддерживает заболевание. Для миелоидного лейкоза эти клетки уже коммитированы, но еще не утратили способности к самоподдержанию [10]. В связи с этим возникла гипотеза, что стволовые клетки, детерминированные к миелоидной дифференцировке, могут изменяться таким образом, что начинают использовать гены, уже не экспрессирующиеся на этой стадии дифференцировки, т.е. гены стволовых клеток [10]. Недавно появилась третья модель, согласно которой опухоль может возникать не в отделе СКК, а из коммитированных клеток, приобретающих свойства стволовых, т.е. способность к самоподдержанию [65–67].

Данные в пользу этой модели были получены в работе А.В. Кривцова и соавт. [68]. Авторы выделили ЛСК в популяции мышинных коммитированных гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (ГМП) после трансдукции их геном сливного белка MLL-AF9. Этот белок начинает экспрессироваться у больных с транслокацией t(9;11)(p22;q23). Известно, что некоторые сливные белки, образующиеся после транслокаций в клетках человеческих лейкозов, определяют свойства ЛСК в коммитированных предшественниках [66, 69, 70]. Такой сливной белок MLL-AF9 был экспрессирован в высокоочищенных мышинных ГМП с фенотипом IL-7R-Lin-c-Kit+CD34+FcγRII/IIIhi. После введения трансдуцированных по MLL-AF9 ГМП сублетально облученным сингенным реципиентам у них развился олигоклональный ОМЛ. Авторы подсчитали частоту ЛСК с помощью метода лимитирующих разведений. Сублетально облученным мышам-реципиентам вводили от 20 до 10 000 клеток костного мозга от мышей, заболевших лейкозом. Все мыши, которым ввели больше 500 клеток, умерли от лейкоза. Половина мышей, получивших 100 клеток, и ни одна из получивших 20 клеток, не заболели ОМЛ. Таким образом, частота ЛСК составила 1 на 150 клеток костного мозга больных животных. Авторы сделали вывод, что MLL-AF9 индуцирует самоподдержание и лейкозную трансформацию в коммитированных ГМП. Чтобы охарактеризовать ЛСК при этом лейкозе, была выделена клеточная популяция IL-7R-Lin-Sca 1+c-Kit+CD34+FcγRII/III+ ГМП-подобных опухолевых предшественников. Эти клетки способны дифференцироваться в культуре с ростовыми факторами, однако и после индукции дифференцировки в популяции сохраняются ЛСК. После индукции дифференцировки необходимо не 150, а 5000 клеток для развития ОМЛ у мышей. Получен-

ные данные продемонстрировали, что иммунофенотип опухолевых клеток очень близок к таковому нормальных, что их популяция гораздо в большей степени обогащена ЛСК, чем популяция нормальных клеток здоровыми СКК, и что они могут дифференцироваться в клетки, не способные переносить болезнь. Для изучения профиля экспрессии генов в ЛСК были выделены 4 контрольные клеточные популяции из костного мозга нормальных сингенных мышей. Сравнивали популяцию СКК с фенотипом (IL7R-Lin-Sca1+c-kit+), общих миелоидных предшественников (IL-7R-Lin-Sca 1-c-Kit+CD34+FcγRII/IIIo), мегакариоцитарных эритроидных предшественников (IL-7R-Lin-Sca 1-c-Kit+CD34-FcγRII/III-) и ГМП (IL-7R-Lin-c-Kit+CD34+FcγRII/IIIhi) с популяцией, обогащенной ЛСК [68] из костного мозга мышей через 60 дней после трансплантации опухолевых клеток и с клиническими признаками лейкоза. РНК из этих клеточных популяций амплифицировали и гибридизовали с Affymetrix мышинными 430A 2,0 микрочипами. Первичный анализ показал, что программа генной экспрессии ЛСК очень стабильна и отличается от профиля экспрессии всех нормальных популяций предшественников, в наибольшей степени приближаясь к ГМП, из которых и произошли эти клетки. Была выделена группа генов, высоко экспрессированных в СКК, гораздо слабее – в коммитированных предшественниках и реактивированных (снова активированных) в ЛСК. Таких генов, отвечающих за самоподдержание, оказалось 363, однако в СКК выделяют еще 1137 генов, которые отличаются от экспрессированных в ЛСК. Анализ показал, что самоподдержание коммитированных предшественников ассоциировано с активацией части генов, экспрессированных на высоком уровне в нормальных СКК. К ним относятся факторы транскрипции и гены гомеобокса, экспрессирующиеся в раннем онтогенезе. Авторы провели сравнение экспрессии генов в человеческих клетках при ОМЛ, связанных с MLL-реаранжировкой и активированных в данном мышинном лейкозе. Оказалось, что 91 из 363 выявленных генов совпадают; это говорит о значимости полученных результатов. Необходимо провести дальнейшее исследование для установления того, являются ли эти гены универсальными для самоподдержания всех форм ОМЛ. В работе также был проведен поиск генов, экспрессированных в первую очередь в ЛСК. Эти гены совпали с генами, экспрессированными при MLL-реаранжировке. К ним относятся *HoxA5*, *HoxA9*, *HoxA10*, *Meis1*. Кроме того, были выявлены и новые, неизвестные ранее гены, участвующие в самоподдержании ЛСК при ОМЛ, такие как *Mef2c*, *Runx2* и ассоциированный с Wnt сигнальным путем ген *Ifi-2*. Выявление повышенной экспрессии ранних генов говорит об иерархии и запрограммированной последовательности работы генов, отвечающих за самоподдержание. При проверке способности выявленных генов влиять на самоподдержание нормальных ГМП оказалось, что *HoxA6*, *HoxA7*, *HoxA9* и *HoxA10*, но не *HoxA5*, стимулируют ГМП к серийному повторному клонированию. Ген *Mef2c* регулирует размер клона ГМП, но не участвует в их самоподдержании и, видимо, важен для увеличения количества опухолевых клеток. Полученные в работе данные доказывают возможность репрограммирования системы самоподдержания в опухолевых клетках, происходящих из коммитированных предшественников с ограниченным пролиферативным потенциалом.

Существует и четвертая гипотеза опухолевой трансформации при лейкозах, предложенная В.Г. Савченко. Согласно этой гипотезе, в организме существуют уже «претрансформированные» СКК, которые когда-то в онтогенезе вступают на путь пролиферации и дифференцировки. Если все СКК, заложенные в раннем онтогенезе, имеют высокий, но ограниченный пролиферативный потенциал и расходуются постепенно, обеспечивая смену кроветворных клонов в течение жизни, то когда-то наступает черед такой «претрансформированной» клетки. Скорее всего, должно произойти как минимум еще одно событие для образования настоящего опухолевого клона или возникновения

ЛСК. Такая гипотеза может быть проверена и априори не должна быть отвергнута.

На сегодняшний день понятно, что необходимо дальнейшее детальное изучение молекулярных и биологических характеристик клеток, которые инициируют и поддерживают лейкоз, и это очень важный этап поиска эффективной борьбы с этим заболеванием. Скорее всего, комплексное изучение «фенотипа», «статуса» и, главное, функционирования ЛСК позволит найти молекулярные агенты, способные ингибировать или специфически элиминировать эти клетки из организма больного и таким образом найти способы успешного лечения этой группы гематологических заболеваний.

## Л и т е р а т у р а

- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645—8.
- Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730—37.
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105—11.
- Pardal R., Clarke M.F., Morrison S.J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895—902.
- Park I.K., Qian D., Kiel M. et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:302—5.
- Lessard J., Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003;423:255—60.
- Molofsky A.V., Pardal R., Morrison S.J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:700—7.
- Taipale J., Beachy P.A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001;411:349—54.
- Purton L.E., Dworkin S., Olsen G.H. et al. RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J Exp Med* 2006;203:1283—93.
- Satoh C., Ogata K. Hypothesis: Myeloid-restricted hematopoietic stem cells with self-renewal capacity may be the transformation site in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2006;30:491—5.
- Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843—50.
- Molofsky A.V., He S., Bydon M. et al. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 2005;19:1432—7.
- Lowe S.W., Sherr C.J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:77—83.
- Cortes J., O'Brien S., Kantarjian H. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood* 2004;104:2204—5.
- Blair A., Hogge D.E., Ailles L.E. et al. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997;89:3104—12.
- Blair A., Sutherland H.J. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol* 2000;28:660—71.
- Jordan C.T., Upchurch D., Szilvassy S.J. et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000;14:1777—84.
- Brendel C., Mohr B., Schimmelpfennig C. et al. Detection of cytogenetic aberrations both in CD90 (Thy-1)-positive and (Thy-1)-negative stem cell (CD34) subfractions of patients with acute and chronic myeloid leukemias. *Leukemia* 1999;13:1770—75.
- Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409—14.
- Terpstra W., Prins A., Ploemacher R.E. et al. Long-term leukemia-initiating capacity of a CD34-subpopulation of acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:2187—94.
- Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 2004;5:873—8.
- Fortunel N.O., Otu H.H., Ng H.H. et al. Comment on "Stemness: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science* 2003;302:393.
- Civin C.I., Almeida-Porada G., Lee M.J. et al. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 1996;88:4102—9.
- Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I. et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1—13.
- Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B. et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038—45.
- Zhu J., Emerson S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002;21:3295—313.
- Stein M.I., Zhu J., Emerson S.G. Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2004;32:1129—36.
- Begley C.G., Green A.R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 1999;93:2760—70.
- Reynaud D., Ravet E., Titeux M. et al. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* 2005;106:2318—28.
- Lecuyer E., Hoang T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 2004;32:11—24.
- Licht J.D. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 2001;20:5660—79.
- Mulloy J.C., Cammenga J., MacKenzie K.L. et al. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2002;99:15—23.
- de Guzman C.G., Warren A.J., Zhang Z. et al. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol* 2002;22:5506—17.
- Zhu J., Giannola D.M., Zhang Y. et al. NF-Y cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4. *Blood* 2003;102:2420—7.
- Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C.J. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 1995;9:1753—65.
- Krosil J., Beslu N., Mayotte N. et al. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 2003;18:561—71.
- Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531—7.
- Ellisen L.W., Bird J., West D.C. et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66:649—61.
- van der Lugt N.M., Alkema M., Berns A. et al. The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech Dev* 1996;58:153—64.
- Passegue E., Wagner E.F., Weissman I.L. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 2004;119:431—43.
- Metcalfe D., Dakic A., Mifsud S. et al. Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1486—91.
- Mueller B.U., Pabst T., Osato M. et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:998—1007.
- Rosenbauer F., Koschmieder S., Steidl U. et al. Effect of transcription-factor con-

centrations on leukemic stem cells. *Blood* 2005;106:1519—24.

44. Moore M.A. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol* 2005;33:719—37.

45. Guan Y., Gerhard B., Hogge D.E. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:3142—9.

46. Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275—84.

47. Konopleva M., Zhao S., Hu W. et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol* 2002;118:521—34.

48. Guan Y., Hogge D.E. Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia* 2000;14:2135—41.

49. Ailles L.E., Humphries R.K., Thomas T.E. et al. Retroviral marking of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate long-term culture and growth in immunodeficient mice. *Exp Hematol* 1999;27:1609—20.

50. List A.F., Kopecny K.J., Willman C.L. et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001;98:3212—20.

51. Baer M.R., George S.L., Dodge R.K. et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002;100:1224—32.

52. Guzman M.L., Swiderski C.F., Howard D.S. et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16220—5.

53. Guzman M.L., Rossi R.M., Karnischky L. et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* 2005;105:4163—9.

54. Guzman M.L., Upchurch D., Grimes B. et al. Expression of tumor-suppressor genes interferon regulatory factor 1 and death-associated protein kinase in primitive acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;97:2177—9.

55. Guzman M.L., Neering S.J., Upchurch D. et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;98:2301—7.

56. Xu Q., Simpson S.E., Scialla T.J. et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003;102:972—80.

57. Yilmaz O.H., Valdez R., Theisen B.K. et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006;441:475—82.

58. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005;436:725—30.

59. Cheng T., Rodrigues N., Shen H. et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000;287:1804—8.

60. Hope K.J., Jin L., Dick J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004;5:738—43.

61. McCulloch E.A., Howatson A.F., Buick R.N. et al. Acute myeloblastic leukemia considered as a clonal hemopathy. *Blood Cells* 1979;5:261—82.

62. Fialkow P.J., Singer J.W., Raskind W.H.

et al. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1987;317:468—73.

63. Till J.E., McCulloch E.A., Siminovitch L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:29—36.

64. Korn A.P., Henkelman R.M., Ottensmeyer F.P. et al. Investigations of a stochastic model of haemopoiesis. *Exp Hematol* 1973;1:362—75.

65. Jamieson C.H., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004;351:657—67.

66. Cozzio A., Passegue E., Ayton P.M. et al. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 2003;17:3029—35.

67. Passegue E., Jamieson C.H., Ailles L.E. et al. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100 (Suppl 1):11842—9.

68. Krivtsov A.V., Twomey D., Feng Z. et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006;442:818—22.

69. Huntly B.J., Shigematsu H., Deguchi K. et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 2004;6:587—96.

70. So C.W., Karsunky H., Passegue E. et al. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell* 2003;3:161—71.

## МАРКЕРЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

О.Д. Захаров, Е.Ю. Рыбалкина, М.А. Волкова, А.А. Ставровская

ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### MULTIDRUG RESISTANCE MARKERS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIAS

O.D. Zakharov, Ye. Yu. Rybalkina, M.A. Volkova, A.A. Stavrovskaya

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*Multidrug resistance (MDR) is the cell resistance to a number of drugs. Proteins from the ABC-transporter family are the most studied factors of the MDR phenomenon. According to the literature Pgp, MRP1, BCRP, and LRP are proteins involved in the development of the MDR. The authors detected the expression of these proteins in untreated patients with acute myeloid leukemia (other than M3). Expression of these proteins was observed in 64.3%, 46.4%, 64.3%, and 42.9% of patients, respectively. In all non-responders blast cells expressed more than one marker of MDR. Expression of 3 and 4 markers was found in 80% of non-responders while in responders 1—2 markers were expressed in 83%.*

**Key words:** acute myeloid leukemia, MDR, Pgp, MRP1, BCRP, LRP

**3**а последние годы достигнут несомненный прогресс в изучении острых миелоидных лейкозов (ОМЛ). Благодаря исследованиям патологов, клиницистов, генетиков раскрыты некоторые механизмы патогенеза, определены факторы прогноза. Все это привело к

тому, что заболевание, бывшее фатальным для 100% больных, в настоящее время расценивается как потенциально излечиваемое. При использовании современных схем ПХТ 5-летняя безрецидивная выживаемость составляет 45—50%, проведение аллогенной трансплантации гемо-

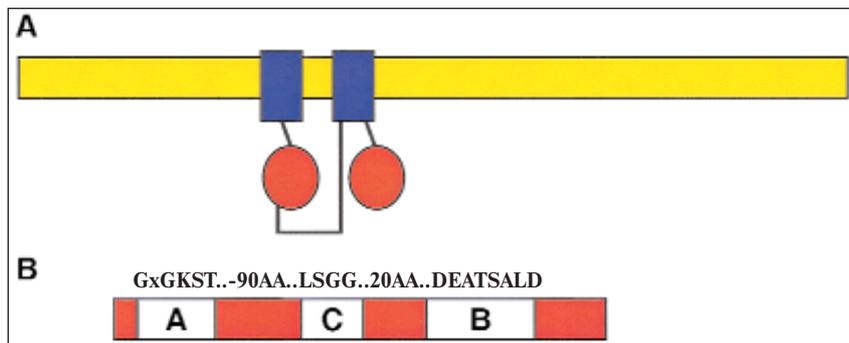


Рис. 1. Структура типичного ABC-транспортера. Желтым показана билипидная мембрана, синим — трансмембранный домен, красным — связывающая последовательность нуклеотидов

Таблица 1. Экспрессия Pgp и ее влияние на частоту достижения полной ремиссии (%)

Исследование	Экспрессия Pgp у всех больных, %	Полные ремиссии в группе Pgp+	в группе Pgp-
J.-P. Marie и соавт. [8] (n=82)	51	51	79
P. Wood и соавт., 1996 (n=80)	55	60	92
SWOG, 1999 (n=352)	28	47	55

поэтических стволовых клеток увеличивает этот показатель до 55–60%.

Основной задачей, стоящей перед клиницистом при лечении первичного больного с ОМЛ, является достижение полной клинико-гематологической ремиссии. Современная терапия ОМЛ позволяет получить полные ремиссии у 65–80% первичных больных. По данным отечественных исследователей (Российская группа по изучению острых лейкозов), этот показатель составляет 64% [1]. Несмотря на очевидные успехи в лечении острых нелимфобластных лейкозов (ОНЛЛ), приблизительно у 10–20% пациентов при применении стандартной химиотерапии не удается получить полной ремиссии. Данная группа больных представляет большую клиническую проблему, так как эффективность схем второй линии химиотерапии, основанных, главным образом, на высоких дозах цитарабина, не превышает 20%. Использование новых препаратов, таких как ингибиторы топоизомеразы II (топотекан), производные платины (карбоплатин), флударабин, не улучшило ситуацию. Применение столь агрессивного метода лечения, как аллогенная трансплантация костного мозга, позволяет надеяться на долговременную выживаемость у 10% первично-резистентных больных. Таким образом, первичная резистентность, т.е. отсутствие полной ремиссии после проведения 1–2 курсов современной индукционной химиотерапии в адекватных дозах, является крайне неблагоприятным фактором прогноза и представляет собой одну из основных проблем современной онкогематологии, для решения которой проводятся многочисленные исследования.

В последние годы все больший интерес исследователей привлекает феномен множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

МЛУ называют резистентность клеток к ряду лекарственных препаратов, различающихся по химической структуре и механизму действия [2].

От момента открытия данного феномена и до наших дней ОМЛ является наилучшей экспериментальной

моделью для изучения механизмов устойчивости злокачественных клеток к действию цитостатиков. Это обусловлено высокой чувствительностью клеток к химиотерапии, относительной простотой их получения и культивирования.

Наиболее изученным фактором, определяющим наличие у клетки феномена МЛУ, являются белки из семейства ABC-транспортёров (ATP Binding Cassette transporters, АТФ-зависимые транспортёры; рис. 1). Данная группа объединяет трансмембранные протеины, связывающие АТФ и использующие энергию для транспортировки некоторых молекул через все виды клеточных мембран. Семейство подразделяется на подсемейства А, В, С, D, E, F и G в зависимости от структуры АТФ-связывающих доменов и в настоящее время насчитывает около 50 белков, 3 из которых имеют значение в развитии феномена МЛУ при ОМЛ [3, 4].

Впервые связь мембранных белков-транспортёров с феноменом МЛУ была показана в исследованиях лаборатории Victor Ling при изучении белка с молекулярной массой 170 кД, названного Р-гликопротеином (Pgp), обладавшим способностью уменьшать внутриклеточное накопление и цитотоксичность структурно и функционально различных цитостатиков [5]. Pgp кодируется геном MDR1 (относится к семейству В, международное название ABCB1), расположенным на длинном плече хромосомы 7 (7q21). Молекула белка имеет внутри- и внеклеточный компонент и 12 раз пересекает цитоплазматическую мембрану. Его функцией являются энергозависимый транспорт (эффлюкс) за пределы клетки и уменьшение внутриклеточной концентрации большого числа ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов. Кроме того, последние исследования показывают, что Pgp играет роль в увеличении апоптотического порога клетки. Pgp демонстрирует широкую специфичность к веществам с различной структурой и соответственно определяет устойчивость клеток к большому числу препаратов, таких как алкалоиды барвинка, антрациклины, эпиподофиллотоксины, таксаны, актиномицин D [6, 7].

При ОМЛ гиперэкспрессия MDR1 наблюдается, по данным разных исследователей, у 20–50% первичных больных.

Несмотря на предпринятые многочисленные многоцентровые исследования, роль Pgp в развитии первичной резистентности у больных ОМЛ до сих пор остается спорной. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, составленной по результатам многоцентровых исследований, в мировой литературе имеются противоречивые результаты: в ряде исследований отмечается достоверно больший процент достижения полных ремиссий в группе пациентов, бластные клетки которых не экспрессируют Pgp, в других работах подобного различия не отмечено [8, 9].

Были предприняты попытки связать гиперэкспрессию белка Pgp с известными прогностически неблагоприятными факторами, включая возраст, цитогенетические aberrации, гиперлейкоцитоз, уровень гемоглобина, экспрессию CD34, вторичный характер ОМЛ.

Показана корреляция экспрессии Pgp с наличием маркера CD34 (по данным разных авторов, 50–70% CD34+CD38- клеток имеют Pgp) [10, 11]. Неизвестно, оказывает ли молекула CD34 непосредственное влияние на активность Pgp.

Встречаются отдельные сообщения о взаимосвязи экспрессии и функциональной активности Pgp с различными ФАБ-вариантами ОМЛ, однако на настоящий момент можно сказать, что экспрессия данного белка практически отсутствует только при остром промиелоцитарном лейкозе, отличающемся высочайшей чувствительностью к антрациклам и служащем экспериментальной моделью для поиска путей преодоления МЛУ при других ФАБ-вариантах ОМЛ. Несомненной является связь возраста с экспрессией Pgp. В исследовании O. Legrand и соавт. [12], включившем в себя 132 пациента, Pgp определялся лишь у 17% больных моложе 35 лет, в то время как в возрастных группах 35–50 лет и старше 65 лет экспрессия составила 39 и 71% соответственно.

D. Damiani и соавт. [13] считают Pgp независимым фактором прогноза у больных с нормальным кариотипом, поскольку имеющиеся данные убедительно показывают необходимость отнесения больных с гиперэкспрессией Pgp и нормальным кариотипом в группу неблагоприятного прогноза.

В последние годы проводятся исследования по выявлению взаимосвязи Pgp с новыми факторами прогноза, одним из которых является мутация *FLT3*. Показано, что бластные клетки, одновременно экспрессирующие Pgp и имеющие мутацию *FLT3*, отличаются сниженной апоптотической способностью в сравнении с клетками, не имеющими данной ассоциации [14].

Вслед за открытием Pgp исследование злокачественных клеток с фенотипом МЛУ, не связанным с геном *MDR1*, привело к открытию S.P. Cole и соавт. [15] в 1992 г. в клеточной линии мелкоклеточного рака легкого белка MRP1 (multidrug resistance-associated protein; белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью; класс C, ген *ABCC1*). Этот белок с молекулярной массой 190 кД, кодируемый геном, расположенным на хромосоме 16 (регион 16p13.1), обеспечивает резистентность примерно к тому же кругу химиопрепаратов, что и Pgp. Он транспортирует отрицательно заряженные ионы, конъюгированные с молекулой глутатиона. В норме белок MRP1 широко распространен в органах и тканях организма, включая клетки гемопоэтической системы. Признано его участие в развитии феномена МЛУ при раке легкого, толстой кишки, молочной железы, мочевого пузыря и простаты, а также при лейкозах. Данные о частоте экспрессии и функциональной значимости белка MRP при ОМЛ весьма противоречивы. По данным D.C. Zhou и соавт. [16], проанализировавших бластные клетки 91 первичного больного ОМЛ, экспрессия *MRP1* наблюдалась у 24% пациентов, полные ремиссии в данной группе были достигнуты у 22% по сравнению с 84% в группе пациентов без экспрессии *MRP1*. M. Filipits и соавт. [17] определяли экспрессию *MRP* у 121 первичного больного ОМЛ, обнаружив при этом низкий уровень экспрессии у

30% пациентов, средний и высокий – у 46 и 24% соответственно. Экспрессия *MRP1* не зависела от классических факторов прогноза (включая цитогенетические аномалии) и не влияла на непосредственные результаты лечения. Показана тенденция к снижению общей выживаемости в группе с высоким и средним уровнем экспрессии *MRP1* [17]. В исследовании M. Schaich и соавт. [18] при анализе данных 331 больного показано, что в отличие от Pgp, оказывавшего влияние на непосредственные результаты лечения и общую выживаемость, экспрессия *MRP1* является независимым фактором прогноза для безрецидивной выживаемости. Интересные данные опубликованы в 1996 г. B.J. Kuss и соавт. [19], которые, основываясь на локализации гена *MRP1* на хромосоме 16, предположили, что дезактивация этого гена при специфической мутации (*inv16*), характерной для М4 ФАБ-варианта ОМЛ с эозинофилией, является причиной благоприятного прогноза при данном варианте заболевания. Был проведен анализ 22 больных с *inv 16*, у 5 из них была обнаружена делеция гена *MRP*, у этих больных отмечены достоверно лучшие показатели выживаемости [19].

Некоторые исследователи высказали предположение, что феномен МЛУ в большей степени связан с коэкспрессией нескольких белковых молекул. Так, O. Legrand и соавт. [12], проанализировав данные 132 больных, показали прогностическое значение одновременного обнаружения Pgp и *MRP1* в бластных клетках при ОМЛ.

Активные исследования семейства ABC-транспортеров позволили в 1998 г. группе исследователей под руководством L.A. Doyle [20] выделить из клеточной линии рака молочной железы MCF-7/AdrVp, резистентной к даунорубину, топотекану и митоксантрон, новый белок этого семейства. Он был назван «белком устойчивости рака молочной железы» (breast cancer resistance protein, BCRP) и отнесен к подсемейству G (ген *ABCG2*). Было показано, что перенос этого гена в химиочувствительные клеточные линии индуцирует резистентность к вышеуказанным препаратам при сохранении чувствительности к цисплатину, паклитакселу и винкалкалоидам. Почти одновременно этот белок был выделен в двух других лабораториях, в связи с чем в литературе встречаются синонимичные обозначения MXR (mitoxantrone resistance protein) и ABCP (placental ABC transporter). Ген, кодирующий белок, располагается на длинном плече хромосомы 4 (4q22).

Хорошо известно, что антрациклины являются базисными препаратами при лечении ОМЛ, в связи с чем значение белка BCRP при ОМЛ начало активно изучаться сразу после его открытия. Данные продолжают накапливаться. Например, в исследовании Z. Vendetta и соавт. [21] (149 первичных больных ОМЛ), завершеном в 2004 г., экспрессия белка BCRP обнаружена в 52%. В данной группе частота достижения полных ремиссий составила 43% против 69% в группе BCRP-отрицательных пациентов ( $p=0,005$ ). Значимой корреляции между экспрессией BCRP и Pgp обнаружено не было. Исследователи делают вывод о том, что наихудший прогноз отмечен в группе больных, бластные клетки которых экспрессировали одновременно BCRP и Pgp (45% полных ремиссий в сравнении с 90% в группе без экспрессии обоих маркеров) [21]. Этот вывод был дополнен в более поздней работе той же исследовательской группы. У 81 больного ОМЛ была определена экспрессия MRP, BCRP и Pgp и продемонстрированы достоверно лучшие показатели общей выживаемости

Таблица 2. Влияние экспрессии LRP на частоту достижения полной ремиссии (в %)

Исследование	Экспрессия LRP1 у всех больных, %	Полные ремиссии в группе LRP1+	Полные ремиссии в группе LRP1-
R. Pirker и соавт. [24]	36	55	72
M. Filipits и соавт. [25]	35	55	81
M. Schaich и соавт. [18]	40	68	80

мости у пациентов, в бластных клетках которых белков МЛЮ не обнаружено вообще либо обнаружен 1 белок.

В 2006 г. были опубликованы результаты работы итальянской группы исследователей [13], в которую были включены 73 первичных больных ОМЛ. Экспрессия BCRP выявлена у 33% больных, причем статистически значимых различий в достижении полной ремиссии у BCRP-положительных и BCRP-негативных больных обнаружено не было. Тем не менее в группе BCRP-положительных пациентов отмечена достоверно более высокая частота рецидивов (78% против 38%), причем все рецидивы были ранними. В работе вновь подчеркивается важность комплексного исследования фенотипа МЛЮ.

Несмотря на отчетливую связь BCRP с транспортом антрациклинов *in vitro*, до последнего времени не было продемонстрировано преимуществ ни одного из них (даунорубицин, идарубицин, митоксантрон) для преодоления резистентности опухолевых клеток, обусловленной этим белком. Тем не менее в 2002 г. V.L. Abbott и соавт. [22] *in vitro* показали значение BCRP в развитии резистентности к митоксантону и топотекану при сохранении чувствительности к идарубицину.

Необходимо отметить тот факт, что ни в одном исследовании не было показано статистически значимой связи экспрессии BCRP с классическими неблагоприятными факторами прогноза, в том числе с цитогенетическими аномалиями, что позволяет считать данный белок независимым прогностическим фактором.

Помимо вышеописанных белков из семейства ABC-транспортёров, в развитии феномена МЛЮ участвует еще ряд факторов. В 1993 г. при помощи моноклонального антитела LRP56 в полирезистентной Pgp-отрицательной клеточной линии рака легкого был выделен белок с молекулярной массой 110 кД, названный белком устойчивости рака легкого — LRP (lung resistance protein). Ген *LRP*, расположенный на хромосоме 16 в регионе, близком к гену *MRP1*, является гомологом главного везикулярного белка крыс. Исследования показали, что в отличие от ABC-белков он локализован не на клеточной мембране, а в цитоплазме и ассоциирован с везикулами и лизосомами, что позволяет считать его участником ядерно-цитоплазматического транспорта. Везикулы представляют собой расположенные в цитоплазме частицы, состоящие из РНК и белка. При культивировании клеток, экспрессирующих LRP, с антрациклинами эти препараты обнаруживаются внутри везикул и выводятся из клетки путем экзоцитоза. Гиперэкспрессия LRP в норме наблюдается в тканях толстой кишки, легкого, проксимальных почечных канальцев, коре надпочечников и макрофагов, однако его физиологические функции остаются неизвестными. Белок LRP обнаруживается в клетках различных злокачественных опухолей при отсутствии экспрессии Pgp и *MRP1*, что ассоциируется с резистент-

ностью к доксорубину, винкристину, цисплатину и мелфалану.

Первые данные о значении LRP при ОМЛ появились в 1996 г. Группа исследователей под руководством А.Ф. List [23] на достаточно разнородной группе из 86 больных (первичный и вторичный ОМЛ, РАИБ-Т, бластный криз хронического миелобластного лейкоза) показала, что у LRP-отрицательных паци-

ентов частота достижения полной ремиссии достоверно выше (35% против 68%). Была выявлена зависимость экспрессии LRP от возраста (старше 55 лет), подтвержденная во всех последующих исследованиях. В других исследованиях была продемонстрирована взаимосвязь экспрессии LRP с лейкоцитозом. Влияние экспрессии LRP на непосредственные результаты терапии отображено в табл. 2.

Ряд исследователей, например M. Schaich и соавт. [18], на больших группах больных ( $n=331$ ) показывают отсутствие самостоятельного значения экспрессии LRP как прогностического фактора.

Неоднозначность данных и достаточно большой накопленный материал привели к тому, что в последние годы большинство исследователей, занимающихся проблемой лекарственной устойчивости, оценивают комплексный фенотип МЛЮ, т.е. экспрессию двух и более белков и влияние на исход лечения их ассоциаций. Например, H.J. Nuhn и соавт. [26] в 2006 г., проанализировав данные 81 больного, показали прогностическую значимость коэкспрессии *MRP* и *MDR1*, а также *MRP* и *LRP* для 2-летней выживаемости, подтвердив тем самым выводы ряда предшествовавших исследований. В последних работах показано, что у больных, бластные клетки которых экспрессируют 3 и более маркера МЛЮ, шанс достижения полной ремиссии при применении стандартных методов лечения чрезвычайно мал.

Отделением химиотерапии гемобластозов РОНЦ РАМН совместно с лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН впервые в России проводится комплексное исследование фенотипа МЛЮ у первичных больных ОМЛ (кроме М3), изучение его влияния на частоту достижения полной ремиссии, а также на возможность преодоления неблагоприятного фенотипа при использовании различных антрациклинов в схемах индукционной химиотерапии. Мы определяли экспрессию гена *MDR1*, белков BCRP, LRP и *MRP1* в бластных клетках костного мозга в первый острый период, а также во время рецидива. На настоящий момент в исследование включены 30 больных — 18 (58%) мужчин и 12 (42%) женщин с различными ФАБ-вариантами ОМЛ (табл. 3).

Средний возраст пациентов составил 39,5 года (разброс 15—80 лет).

У 22 больных перед началом лечения выполнено цитогенетическое исследование, в соответствии с которым больные были разделены на 3 прогностические группы (табл. 4).

У 22 больных проведено иммунофенотипическое исследование бластных клеток, причем у 76% выявлена экспрессия CD34.

Таким образом, число больных с неблагоприятными цитогенетическими и иммунологическими признаками было сравнительно выше, чем в среднем среди больных с ОНЛЛ.

Таблица 3. Распределение больных по ФАБ-вариантам

ФАБ-вариант	Число больных абс.	%
M1	8	26,7
M2	8	26,7
M4	7	23,3
M4эоз	1	3,3
M5	4	13,3
M6	2	6,7

23 больных получали лечение по протоколу РОНЦ для ОМЛ, включающее индукцию ремиссии по стандартной схеме 3+7+7 с этопозидом и идарубицином, консолидацию ремиссии высокими дозами цитозара (курсовая доза 18 г/м<sup>2</sup>) в комбинации с идарубицином (2 курса), поддерживающую терапию по схеме 1+5+5 также с идарубицином и этопозидом (4–6 курсов). По нашим данным, частота достижения полной ремиссии при подобной программе лечения составляет 72%, причем у всех больных с ремиссиями костномозговые ремиссии достигнуты после 1-го курса химиотерапии. Прочие пациенты получали индукционную химиотерапию по схеме 3+7 с даунорубицином в дозе 45 мг/м<sup>2</sup>.

В целом полные ремиссии были достигнуты у 20 (66,7%) больных, 10 (33,3%) пациентов оказались резистентными к проводимому лечению. Резистентными считались пациенты, у которых ремиссия не была получена после 2 курсов стандартной химиотерапии.

У всех пациентов проводился забор костного мозга перед началом лечения, образцы костного мозга в пробирках с ЭДТА доставлялись в лабораторию, где в течение 24 ч с момента взятия материала оценивали экспрессию белков МЛУ в реакции с моноклональными мышиными антителами фирмы CHEMICON: к MRP1 – MAB 4122, к LRP – MAB4126, к BCRP – MAB4146, к MDR1 – UIC2.

Анализ экспрессии проводился методом проточной лазерной флуориметрии на приборе FACScan Becton Dickinson.

Экспрессия белка считалась положительной при его обнаружении более чем в 25% бластных кле-

Таблица 4. Распределение больных по прогностическим группам в зависимости от цитогенетических аномалий

Прогноз	Число больных абс.	%
Благоприятный	4	18,2
Промежуточный	11	50
Неблагоприятный	7	31,8

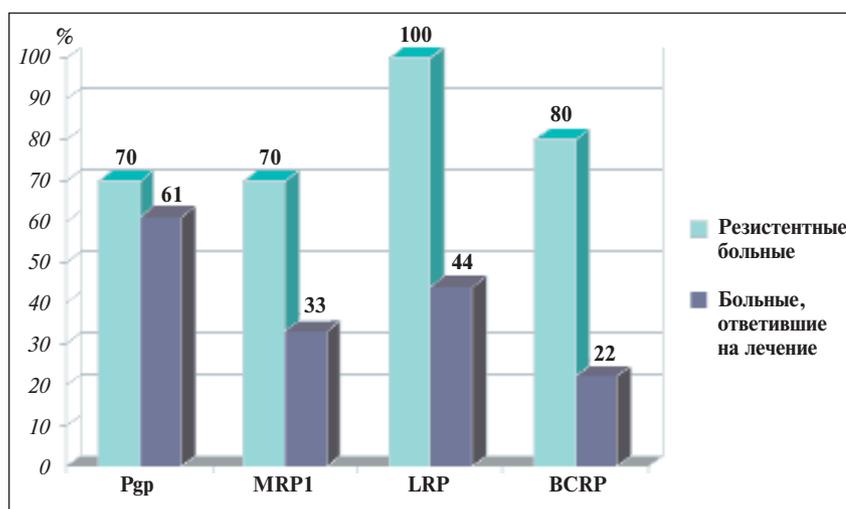


Рис. 2. Экспрессия белков МЛУ в группе больных, ответивших на лечение, и у резистентных больных

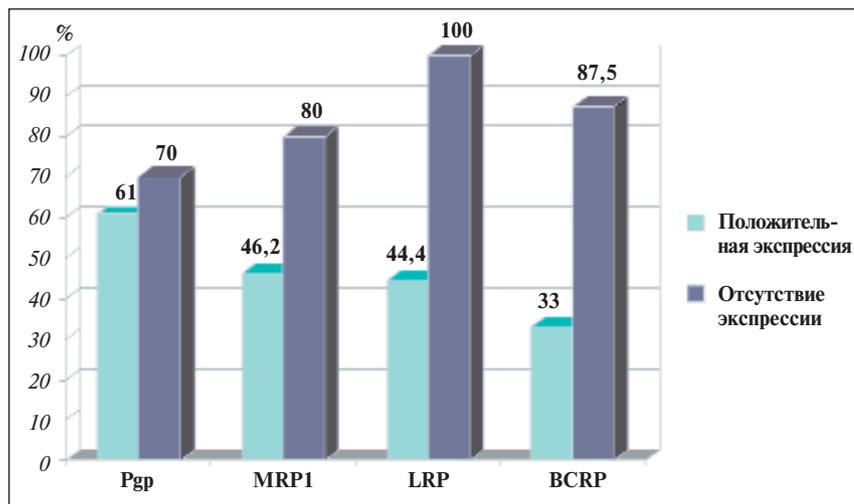


Рис. 3. Частота достижения полной ремиссии в зависимости от экспрессии белков МЛУ

ток. Положительная экспрессия Pgp выявлена у 64,3% больных, MRP1 – у 46,4%, LRP – у 64,3%, BCRP – у 42,9%.

Эти данные несколько превышают мировые, что может быть объяснено как относительно небольшой выборкой больных, так и совокупностью неблагоприятных факторов прогноза.

Таблица 5. Распределение пациентов в зависимости от числа экспрессируемых маркеров

Число экспрессируемых маркеров	Число больных абс.	Число больных %
1	12	40,0
2	7	23,3
3	6	20,0
4	5	16,7

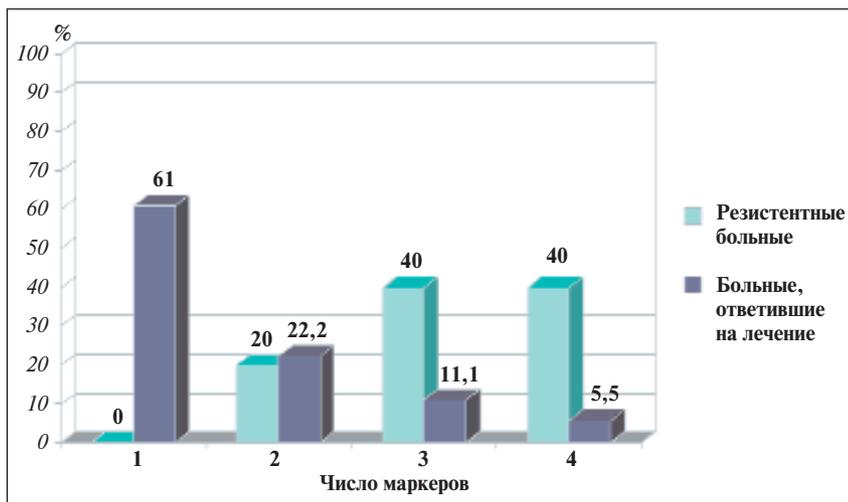


Рис. 4. Зависимость достижения полной ремиссии от числа экспрессируемых белков МЛУ

В группе резистентных больных отмечается более высокая экспрессия белков МЛУ, причем для BCRP и LRP различия достоверны ( $p=0,002$ ; рис. 2).

Частота достижения полной ремиссии оказалась ниже при экспрессии любого из изучаемых белков, причем вновь для BCRP и LRP различия были статистически достоверны ( $p=0,004$ ; рис. 3).

В исследованной группе у всех больных выявлена экспрессия хотя бы одного белка МЛУ. Мы оценивали влияние числа экспрессированных маркеров МЛУ на

процент достижения полных ремиссий. Лишь у 40% больных обнаружен только 1 ABC-белок, у большинства больных обнаружено 2 белка и более (табл. 5).

Из полученных нами данных следует, что бластные клетки всех больных, не ответивших на терапию, экспрессировали более одного маркера МЛУ, у 80% резистентных больных отмечена экспрессия трех и четырех маркеров, в то время как в группе чувствительных больных 1–2 маркера экспрессировались бластными клетками у 83% пациентов (рис. 4).

Более того, необходимо отметить, что у единственного больного, ответившего на лечение и экспрессировавшего все 4 белка (более 50% бластных клеток), развился ранний рецидив.

Определенный интерес представляет зависимость экспрессии белков МЛУ от цитогенетической прогностической группы. Несмотря на то что в ряде исследований подобная связь отрицается, по нашим данным, у всех больных из группы с неблагоприятными цитогенетическими аномалиями бластные клетки экспрессировали более двух маркеров МЛУ.

#### Заключение

В связи с потенциальной курбельностью ОМЛ феномен МЛУ и пути его преодоления вызывают большой интерес исследователей во всем мире. Данные о прогностической значимости ранее известных и вновь открываемых факторов продолжают накапливаться и все еще остаются весьма неоднозначными. Ряд исследователей полностью отвергают значение описанных белковых субстанций как фактора прогноза, другие же считают необходимым ввести обследование фенотипа МЛУ в рутинную практику.

Наши данные показывают, что наличие экспрессии одного белка МЛУ не является прогностически неблагоприятным признаком в условиях современной терапии, экспрессия более двух белков остается прогностически неблагоприятной.

## Л и т е р а т у р а

1. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н. Лечение острых лейкозов. М., 2004.
2. Ставровская А.А. Резистентность больных гемобластомами к лекарственной терапии. В кн.: Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М., Медицина; 2001.
3. Gregory D.L., Tito F., Susan E.B. The role of ABC transporters in clinical practice. The Oncologist 2003; 8(5):411–24.
4. Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res 2001;11(7):1156–66.
5. Riordan J.R., Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. J Biol Chem 1979;254(24):12701–5.
6. Guerci A., Merlin J.L., Missoum N. et al. Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. Blood 1995;85: 2147–53.
7. van der Kolk D.M., de Vries E.G., van Putten W.J. et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2000;6:3205–14.
8. Marie J.P., Legrand O. MDR1/P-GP expression as a prognostic factor in acute leukemias. Adv Exp Med Biol 1999;457:1–9.
9. Leith C.P., Kopecky K.J., I-Ming Chen et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia. A Southwest Oncology Group Study. Blood 1999;94(3): 1086–99.
10. Benderra Z., Faussat A.M., Sayadaye L. et al. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2005;11:7764–72.
11. van Stijn A., van der Pol M.A., Kok A. et al. Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. Haematologica 2003;88(5):497–508.
12. Legrand O., Zompi S., Perrot J.Y. et al. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups.

- Haematologica 2004;89(1):34—41.
13. Damiani D., Tiribelli M., Calistri E. et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica* 2006;91:825—8.
14. Hunter H.M., Pallis M., Seedhouse C.H. et al. The expression of P-glycoprotein in AML cells with FLT3 internal tandem duplications is associated with reduced apoptosis in response to FLT3 inhibitors. *Br J Hematol* 2004;127(1):26—33.
15. Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H. et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258(5088):1650—4.
16. Zhou D.C., Zittoun R., Marie J.P. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1995;9(10):1661—6.
17. Filipits M., Stranzl T., Pohl G. et al. MRP expression in acute myeloid leukemia. An update. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:141—50.
18. Schaich M., Soucek S., Thiede Ch. et al. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Hematol* 2005;128(3):324—32.
19. Kuss B.J., Deeley R.G., Cole S.P. et al. The biological significance of the multidrug resistance gene MRP in inversion 16 leukemias. *Leuk Lymphoma* 1996;20(5—6):357—64.
20. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15665—70.
21. Benderra Z., Faussat A.-M., Sayada L. et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2004;10:7896—902.
22. Abbott B.L., Colapietro A.-M., Barnes Y. et al. Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood* 2002;100(13):4594—601.
23. List A.F., Spier C.S., Grogan T.M. et al. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87(6):2464—9.
24. Pirker R., Pohl G., Stranzl T. et al. The lung resistance protein (LRP) predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:133—9.
25. Filipits M., Pohl G., Stranzl Th. et al. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1998;91(5):1508—13.
26. Huh H.J., Park C.J., Jang S. et al. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci* 2006;21(2):253—8.

## FLT3-ТИРОЗИНКИНАЗА ПРИ ОСТРЫХ НЕЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

А.С. Бавыкин<sup>1</sup>, М.А. Волкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии РАН, <sup>2</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**С**овременная интенсивная терапия острых нелимфобластных лейкозов (ОНЛЛ) нередко проводится на грани возможностей организма больного перенести ее. В первую очередь это относится к больным старше 60 лет, которые, составляя не менее половины всех больных ОНЛЛ, часто не получают интенсивной терапии и не включаются в рандомизированные исследования эффективности различных лечебных режимов из-за опасности развития угрожающих жизни осложнений. В то же время использование лекарственных средств, действие которых направлено на устранение молекулярного дефекта, лежащего в основе развития лейкоза, как показывает опыт терапии острого промиелоцитарного лейкоза полностью трансретиноевой кислотой (АТРА), может проводиться независимо от возраста и давать одинаково высокие результаты во всех возрастных группах [1—3].

В течение последних двух десятилетий ведутся активные исследования молекулярных изменений при лейкозах и разработка лекарственных средств, направленных на устранение молекулярных дефектов. Использование выявленных молекулярных маркеров в качестве прогностических факторов позволяет разделить пациентов на группы, требующие терапии различной интенсивности.

Успехи цитогенетики и изучение молекулярных дефектов, обусловленных хромосомными aberrациями, позволили разделить ОНЛЛ на 3 группы. Первая — группа со сбалансированными хромосомными aberrациями, т.е. с aberrациями, при которых не происходит

потери генетического материала. Эта группа представлена в основном реципрокными транслокациями с образованием химерных генов, в результате чего нарушается функция генов, кодирующих транскрипционные факторы, играющие ключевую роль в гемопоэзе. Больные с aberrациями этой группы при современной терапии имеют благоприятный прогноз [4]. Вторая — группа с несбалансированными хромосомными aberrациями, т.е. с aberrациями, при которых происходит потеря генетического материала, главным образом с делециями — потерей части или утратой целых хромосом. Плохой прогноз у больных с хромосомными aberrациями этого типа позволяет предполагать в патогенезе ОНЛЛ этой группы роль антионкогенов, утрачиваемых в результате хромосомных потерь [5]. Третью группу, в которую входят около половины всех больных ОНЛЛ, составляют больные с нормальным кариотипом. Отсутствие видимых цитогенетических нарушений затрудняет поиски молекулярных дефектов, поэтому патогенез лейкозов данной группы остается неясным. Больные с нормальным кариотипом традиционно относятся к группе с промежуточным прогнозом. Однако результаты применения различных лечебных программ показывают, что внутри этой группы существуют прогностически различные подгруппы.

В последние годы выявлены некоторые типы нарушений клеточного генома, которые не обусловлены или, по крайней мере, не всегда обусловлены видимыми хро-

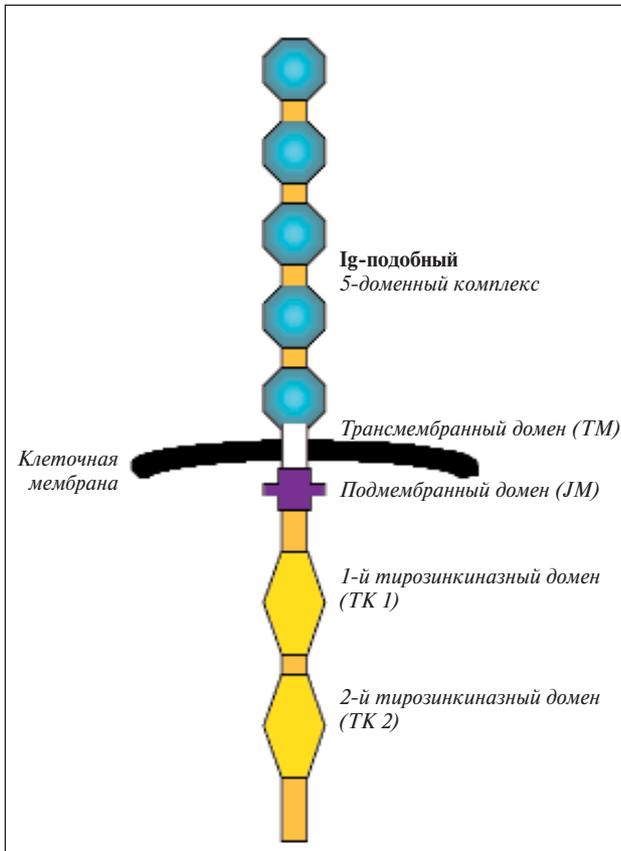


Рис. 1. Схема строения одиночной молекулы рецептора FLT3

мосомными абберациями, но вовлекают гены, играющие важную роль в гемопоэзе и в патогенезе лейкозов.

Первой аномалией, обнаруженной при ОНЛЛ с нормальным кариотипом, была реаранжировка гена *MLL* (ген смешанной лейкоэмической линии — mixed lineage leukemia) [6]. Ген *MLL* локализован на хромосоме 11 в районе 11q23. Транслокации, вовлекающие район 11q23 и различные другие хромосомы (всего обнаружено более 30 различных транслокаций с участием 11q23), встречаются при ОНЛЛ и при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) с экспрессией миелоидных маркеров. Изучение изменений гена *MLL* у больных с различными абберациями, вовлекающими район 11q23, показало, что при трисомии 11 с очень высокой частотой встречается частичное тандемное удвоение *MLL* [7, 8]. Вскоре было обнаружено, что такая же реаранжировка гена *MLL* встречается у 6—8% больных ОНЛЛ с нормальным кариотипом [8, 9]. Исследование больших групп больных показало, что частичное тандемное удвоение гена *MLL* никогда не встречается при транслокациях, ассоциированных с хорошим прогнозом — t(8;21), t(15;17), inv 16. Среди больных ОНЛЛ с нормальным кариотипом обнаружение реаранжировки *MLL* предвещает плохой прогноз [9, 10].

Вторая генная реаранжировка, обнаруженная у больных ОНЛЛ с нормальным кариотипом, — реаранжировка гена *FLT3*.

#### Рецептор FLT3: структура и функции

Рецептор FLT3, или CD 135, относится к семейству клеточных белков, которые совмещают в себе функции рецептора и внутриклеточной тирозинкиназы. Из членов этого семейства наиболее известны такие рецепторы, как рецептор к

фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR 2), рецептор к фактору роста стволовых клеток (С-KIT) и  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторы к фактору роста, продуцируемому тромбоцитами (PDGFR).

Белок FLT3 кодируется геном *FLT3*, который расположен на длинном плече хромосомы 13 (13q12.2). Ген *FLT3* состоит из 24 экзонов, длина его транскрипционной РНК составляет 2979 пар оснований. Молекулярная масса FLT3-тирозинкиназы — 112804 Д при длине в 993 аминокислоты.

Молекулу FLT3 можно условно разделить на две функциональные единицы: рецептор и тирозиную киназу, связанные друг с другом трансмембранным доменом (ТМ). Рецепторная часть расположена на клеточной мембране, она имеет характерную структуру — состоит из пяти иммуноглобулиноподобных доменов, которые могут связываться с лигандом (рис. 1). Внутриклеточная часть состоит из подмембранного домена (JM — юкстамембранный) и двух каталитических (киназных) доменов (ТК1 и ТК2).

Экспрессия FLT3-тирозинкиназы обнаружена преимущественно на стволовых CD34+ -клетках и на гемопоэтических клетках-предшественниках в костном мозге, на лимфоцитах тимуса и лимфоузлов, менее выраженная экспрессия обнаружена на клетках плаценты, головного мозга, мозжечка и на половых клетках [11, 12].

Лиганд для FLT3 (FL) представляет собой пока еще не вполне охарактеризованную молекулу, которую по ее свойствам относят к семейству цитокинов. FL состоит из 235 аминокислот и представляет собой трансмембранный белок, который может переходить в растворимую форму во внеклеточном пространстве и взаимодействовать со своим рецептором. FL продуцируется клетками костномозгового микроокружения, включая фибробласты, а также гемопоэтическими клетками миелоидного и В- и Т-клеточного лимфоидных рядов. FL является ростовым фактором для стволовых клеток и миелоидных предшественников и способствует пролиферации CD34+ -клеток в культуре и *in vivo* в опытах на животных [13—17]. Как и некоторые другие лиганды (например, фактор Стила — лиганд c-kit), FL не может самостоятельно эффективно индуцировать пролиферацию нормальных миелоидных и лимфоидных предшественников, он действует совместно с другими гемопоэтическими ростовыми факторами и интерлейкинами [18, 19]. Поскольку FLT3-киназа экспрессирована на тех же CD34+ -клетках, на которых определяется высокий уровень экспрессии С-KIT (CD117), их лиганды (FL и фактор Стила), очевидно, действуют в данной популяции клеток синергично [20]. В культуре клеток и в опытах на мышцах была показана способность FL совместно с гранулоцитарно-макрофагальным фактором и интерлейкином-4 индуцировать дифференцировку дендритных клеток, а совместно с интерлейкином-15 — увеличивать число натуральных киллеров [21—24].

В неактивном состоянии рецептор представлен в виде одиночных молекул (см. рис. 1). Взаимодействие лиганда с рецептором вызывает димеризацию двух одиночных молекул (рис. 2, а), и в этом состоянии рецептор становится активным. Этот процесс сопровождается фосфорилированием тирозиновых остатков тирозинкиназного домена ТК 2 (рис. 2, б). Эти аминокислотные остатки формируют так называемые зоны связывания для внутриклеточных белков — Src-киназ, что приводит к запуску каскада реакций (по MAP-киназному пути для FLT3), итогом которых является экспрессия генов, отвечающих за пролиферацию и рост клеток.

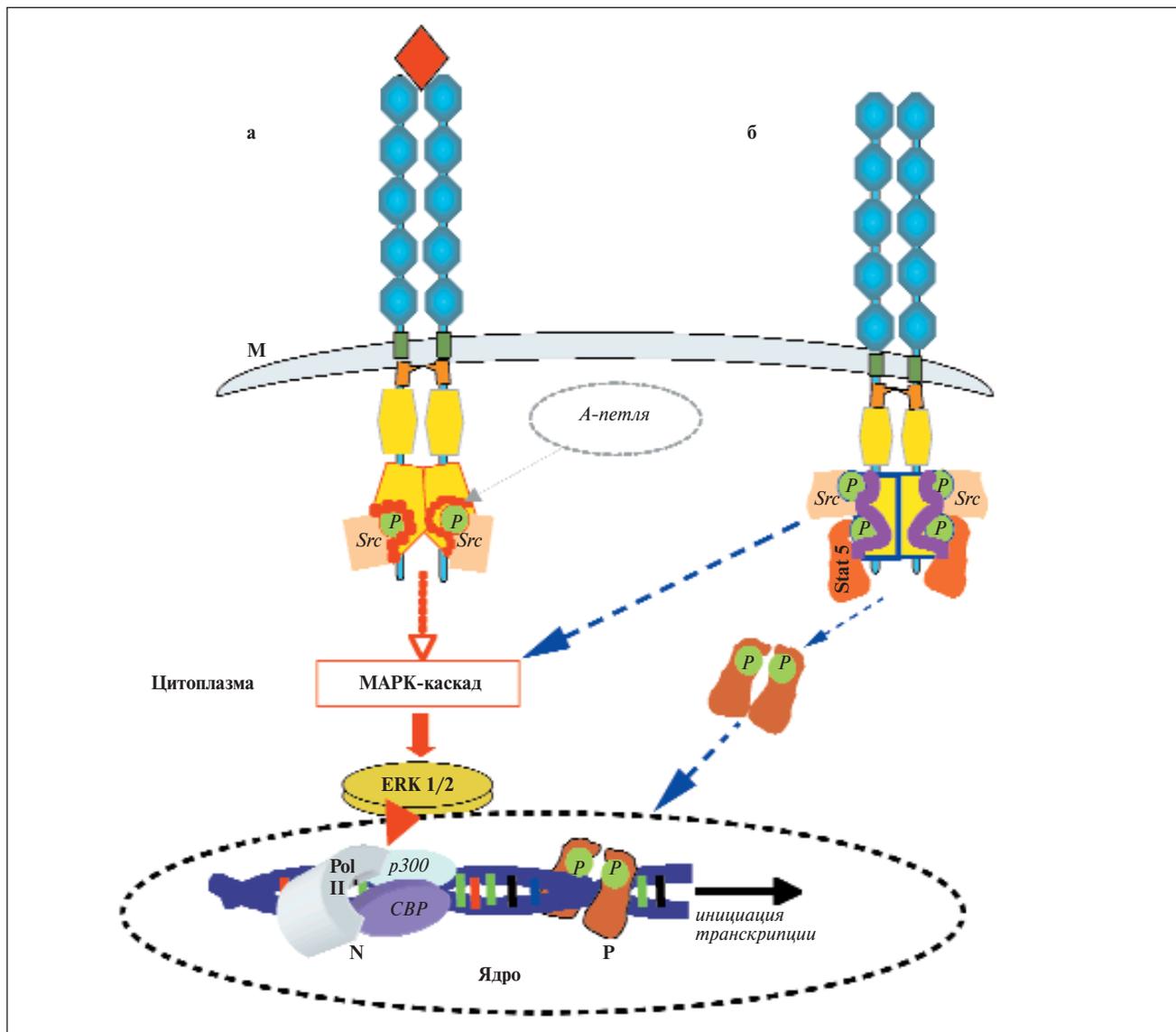


Рис. 2. Схематическое изображение активации FLT3

*L* – лиганд, *M* – цитоплазматическая мембрана, *N* – активация рецептора в норме, *P* – активация рецептора в патологии

**Механизм экспрессии FLT3 в норме и при гемобластозах**

Нарушение процесса рецепторной регуляции внутриклеточных структур является основным звеном в патогенезе острого миелолейкоза. Мутации FLT3 приводят к независимой от лиганда димеризации и неконтролируемой активации рецептора (см. рис. 2). Процессы в норме показаны на рис. 2, а красными линиями и стрелками в серединной части рисунка, синими стрелками – при патологии (см. рис. 2, б; помимо нормальной передачи сигнала через Src-белки включается дополнительная передача пролиферативного сигнала через STAT5). Особое внимание следует обратить на так называемую активационную (А-) петлю, которая служит для связывания внутриклеточных киназ. Процесс связывания в норме зависит от двух основных факторов: активированное (димеризованное) состояние рецептора и его сродство к Src-киназам (адапторные белки). В неактивном состоянии рецептора (одиночные молекулы FLT3) отсутствует контакт с Src-киназами. При мутации в А-петле (см. рис. 2, б) изменяется аминокислотная последовательность в

ней, и это может быть чревато сразу несколькими аномальными явлениями. Во-первых, А-петля в результате произошедшей мутации, как правило, переходит в состояние постоянной активации и проводит сигнал вне зависимости от контакта FLT3-рецептора с лигандом. В этом случае запускаемый каскад реакций становится более продолжительным, чем в норме, что может привести к неконтролируемой стимуляции экспрессии соответствующих генов, направленных на пролиферацию и ангиогенез. Во-вторых, А-петля становится доступной не только для Src-киназ, но и для других активационных факторов, например STAT 5. Эти факторы, в свою очередь, запускают активацию уже «своих» генов, что, в частности, может приводить к блокированию клеточного апоптоза.

Исследование экспрессии FLT3 на бластных клетках при гемобластозах показало ее высокий уровень у 70–100% больных ОНЛЛ и у 87–100% больных В- и Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [25–27]. Экспрессия FLT3 не была обнаружена на клетках крови и костного мозга больных хроническим миелолейкозом, но очень высокий уровень экспрессии обнаружен

при бластном кризе независимо от его иммунологического варианта [28]. Уровень экспрессии FLT3 бластными клетками миелоидной, В- и Т-лимфоидных лейкоэмических линий значительно превосходит уровень ее экспрессии клетками нормального костного мозга. Это позволило предположить, что экспрессия FLT3 может играть роль в пролиферации и выживании лейкоэмических клеток [26]. В одном из исследований было показано, что в 40 из 110 изученных клеточных линий человеческих лейкозов и лимфом на лейкоэмических клетках была обнаружена одновременно экспрессия FLT3 и FL. Это позволяет предполагать возможность существования аутокринного механизма пролиферации лейкоэмических клеток [29].

### Мутации гена FLT3

**Мутации в юкстамембранном домене.** Впервые мутации гена *FLT3* при ОНЛЛ были обнаружены в 1996 г. М. Накао и соавт. [30]. Изучая с помощью полимеразной цепной реакции структуру гена *FLT3* у больных ОНЛЛ, они неожиданно обнаружили удлинение фрагментов РНК юкстамембранного (подмембранного) домена у 5 из 30 больных. Исследуя ДНК генома *FLT3* этих больных, они исключили возможность удлинения домена за счет альтернативного сплайсинга нуклеотидов и показали, что во всех случаях удлинение было обусловлено tandemным удвоением в последовательности нуклеотидов, иногда со вставками добавочных нуклеотидов. Удвоенный участок варьировал по величине и локализации у разных больных, но всегда находился в пределах экзонов 14 и 15 юкстамембранного домена *FLT3*. Поскольку образующиеся при этом последовательности нуклеотидов всегда находились в пределах рамки считывания и не нарушали ее, было очевидно, что эти изменения не препятствуют продукции функционально активной FLT3-тирозинкиназы. Последующие многочисленные исследования показали, что обнаруженное внутреннее tandemное удвоение нуклеотидов в ДНК юкстамембранного домена *FLT3* (FLT3/ITD – internal tandem duplication) является наиболее частой мутацией у больных ОНЛЛ, в том числе у больных с нормальным кариотипом. Частота FLT3/ITD при ОНЛЛ, по данным разных исследований, составляет от 13,2 до 32% у взрослых больных [31, 32]. Эта мутация была обнаружена у 3% больных с миелодиспластическими синдромами [33, 34], у отдельных больных ОЛЛ, чаще с бифенотипическим иммунофенотипом [33, 35], и не обнаружена при хроническом миелолейкозе, хроническом лимфолейкозе, неходжкинских лимфомах [34] и у здоровых доноров в клетках костного мозга и пуповинной крови, имеющих физиологически высокую экспрессию *FLT3* [36, 37]. Исследование роли произошедшей мутации на культуре клеток Cos7 с трансфектным геном FLT3/ITD показало, что в них осуществляется независимое от лиганда фосфорилирование рецептора при любой длине и локализации удвоенного участка и что при этом одновременно происходит фосфорилирование *FLT3* дикого типа на другом аллеле в тех же клетках [38]. Трансфекция FLT3/ITD в линии клеток, рост которых в норме происходит только в присутствии ростовых факторов, вызывала пролиферацию клеток без добавления этих факторов. При этом в клетках активизировались сигнальные пути с участием STAT5 и RAS/MAP-киназ [23, 24].

На сегодняшний день считается, что процесс димеризации в норме пространственно ограничивается струк-

турным строением подмембранного домена (JM). В случае ITD структура домена JM нарушается таким образом, что процесс сближения двух рецепторных молекул оказывается в значительной степени облегченным и может происходить и без наличия лиганда.

Тандемные удвоения в юкстамембранном домене *FLT3* у больных ОНЛЛ с этим дефектом значительно различаются по длине удвоенного участка – от 3 до более чем 400 пар оснований [39]. Имеются также различия в локализации tandemного участка, однако в него всегда оказывается включенным тирозин в 589, 591, 597 или 599-й позиции в молекуле *FLT3* [40]. Поскольку данная мутация не всегда оказывается простым tandemным удвоением, а часто сопровождается добавочными включениями нуклеотидов, нередко вместо термина «внутреннее tandemное удвоение *FLT3*» (FLT3/ITD) в настоящее время применяется термин «мутация длины *FLT3*» (FLT3 length mutation – FLT3-LM).

**Мутации в киназном домене FLT3.** В 2001 г. двумя независимыми группами исследователей была описана еще одна разновидность мутаций гена *FLT3* – точечные нуклеотидные замены [41, 42]. Наиболее часто встречающейся и поэтому наиболее известной в настоящее время является мутация во втором киназном домене (TK2), в нуклеотидном триplete 835, который кодирует аминокислоту аспарагин. Чаще всего происходит замена аспарагиновой кислоты на тирозин, иногда на валин, гистидин или другую аминокислоту. Помимо этой мутации при ОНЛЛ могут встречаться и другие замены. Преимущественно они локализируются в области между 835 и 842-м триpleteми. Наиболее известной является замена метионина на изолейцин в 836-м триplete [41, 42]. Указанные триplete кодируют аминокислоты, которые являются структурными элементами А-петли домена TK2.

В клетках линии Cos7 с трансфекцией *FLT3* с мутациями в киназном домене происходит фосфорилирование тирозина без участия лиганда, а в клеточной линии 32D, для роста которой в обычных условиях необходим интерлейкин-3, – пролиферация без добавления интерлейкина [41]. Эти исследования показывают, что мутации в киназном домене гена *FLT3* в клеточной культуре вызывают такой же, хотя и менее выраженный, пролиферативный эффект, как FLT3/ITD. Частота мутаций в киназном домене *FLT3* при ОНЛЛ, по данным разных исследований, составляет 3–7%. Наличие всего одной точечной мутации достаточно для изменения конфигурации А-петли, которая становится доступной не только для Src-киназ, но и для белков STAT 5, которые принадлежат семейству STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) – факторов активаторов транскрипции (см. рис. 2, б). Известно, что избыточная экспрессия белков семейства STAT может провоцировать онкогенез, поскольку они регулируют экспрессию генов, которые кодируют регуляторы клеточного цикла – циклины D1/D2, С-мус, индуктор ангиогенеза – VEGF и ингибитор апоптоза – Bcl-X<sub>L</sub>. STAT относятся к цитоплазматическим факторам и имеют в своем составе ТК- и ДНК-связывающиеся домены. После связывания с тирозинкиназными доменами рецептора тирозиновые остатки STAT5 фосфорилируются, происходит димеризация двух отдельных молекул и активированный STAT 5-комплекс мигрирует в ядро к промоторным зонам соответствующих генов.

Таблица 1. Частота FLT3/ITD при различных вариантах ОНЛЛ

Автор	Число больных	Общая частота, %	% больных с нормальным кариотипом	В а р и а н т , %							
				M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>В з р о с л ы е</b>											
P.D. Kottaridis [40]	854	27		0			36		25	7	0
Ch. Thiede [44]	979	20,4	достав. чаще				31				
S. Schnittger [39]	1003	23,5	70,5			8,7	35,3 M3v-65		M5a-6,4 M5b-34,4	0	0
F. Kuchenbauer [45]	170 (M3)	38,4					24,1 M3v-64,5 bcr3-62,3				
<b>Д е т и</b>											
N.Y. Lacayo [46]	81	30	>50		59		20				
Ch.M. Zwaan [47]	234	11,5									

**Частота FLT3/ITD при различных вариантах ОНЛЛ**

Исследования, проведенные на больших группах больных, показали, что частота мутаций не связана с возрастом и полом, хотя в отдельных работах указывается более частая встречаемость мутации FLT3/ITD у женщин [43]. Наиболее часто у взрослых больных FLT3/ITD встречается при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ), особенно часто при его вариантной форме – M3v [44, 45]. На втором месте по частоте обнаружения FLT3/ITD находится острый монобластный лейкоз, его вариант M5b. Реже данная мутация обнаруживается при M1-, M2- и M4-вариантах ОНЛЛ, а при M0, M6 и M7 – лишь у отдельных больных. Особенно редко FLT3/ITD встречается у больных с t(8;21), абберациями 11q23, del 5q и комплексными изменениями кариотипа. Все различия в частоте встречаемости, по данным имеющихся исследований, оказались высокодостоверными ( $p < 0,006-0,0001$ ) [39, 40]. Почти так же часто, как при ОПЛ, FLT3/ITD обнаруживается у больных ОНЛЛ с нормальным кариотипом.

У детей частота FLT3/ITD при ОНЛЛ примерно такая же, как у взрослых, хотя имеются некоторые отличия в частоте данной мутации при различных вариантах ОНЛЛ. Как и у взрослых, более чем 50% больных детей с FLT3/ITD имеют нормальный кариотип [46, 47]. Однако в отличие от взрослых основную группу больных с FLT3/ITD составляют больные с M1- и M2-вариантами ОНЛЛ – на их долю приходится 59% среди всех обследованных больных с данной мутацией, хотя так же, как у взрослых, FLT3/ITD очень редко встречалась при M2 с t(8;21) – лишь у 1 из 25 обследованных больных [46]. В отличие от взрослых FLT3/ITD редко обнаруживается у детей с M3. FLT3/ITD не обнаружена ни у кого из детей с частыми при детском ОНЛЛ абберациями 11q23 [47]. Ch. Zwaan и соавт. [47] обнаружили FLT3/ITD достоверно чаще у более старших детей: медиана возраста больных с мутацией составила 13,4 года, без указанной мутации – 8,8 года ( $p < 0,001$ ). В отличие от взрослых мутация чаще встречалась у мальчиков [47]. В табл. 1 приведены данные о частоте FLT3/ITD при ОНЛЛ.

Во всех исследованиях у взрослых больных с FLT3/ITD были достоверно выше количество лейкоцитов и процент бластных клеток в крови и костном мозге. Это подтверждает возможную роль FLT3 в пролиферации бластных клеток. В то же время у детей с FLT3/ITD не обнаружено ни характерного для взрослых более высокого лейкоцитоза, ни более высокого процента бластных клеток в крови и костном мозге.

**Частота мутаций в киназном домене FLT3(FLT3/TKD) у взрослых больных ОНЛЛ.** Мутации в киназном домене FLT3 – FLT3/TKD встречаются значительно реже, чем FLT3/ITD. При ОНЛЛ, по данным разных исследований, частота FLT3/TKD колеблется от 6,4 до 7,7%. Эти мутации также встречаются чаще у больных с нормальным кариотипом [41–43]. FLT3/TKD обнаружена у 3,4% больных миелодиспластическими синдромами [41]. По данным немецкого кооперированного исследования, включившего 2535 больных ОНЛЛ, мутации в тирозинкиназном домене FLT3 (FLT3/TKD) обнаружены у 8,6% больных с нормальным кариотипом и у 4,7% больных с хромосомными абберациями. Наиболее часто мутации в киназном домене встречались у больных с M4 эозинофильным вариантом и inv16 и при M5-варианте, особенно при M5b [48]. Частота FLT3/TKD при M3, по разным данным, составляет 8,8–19% и так же, как FLT3/ITD, чаще встречается при M3v. Как и внутренние tandemные удвоения, мутации в киназном домене почти не встречаются при M6- и M7-вариантах ОНЛЛ [41, 43, 48]. Частота FLT3/TKD при ОНЛЛ у детей достоверно неизвестна в связи с редкостью у них этого вида острого лейкоза и единичными проведенными исследованиями.

**Мутации в киназном домене FLT3 у детей с ОЛЛ.** Оба вида рассмотренных мутаций гена FLT3 крайне редки у взрослых больных с ОЛЛ – они обнаружены лишь у 2–3% пациентов [33, 41]. В то же время мутации в киназном домене обнаружены с высокой частотой у детей с ОЛЛ, при этом, в отличие от ОНЛЛ, гораздо чаще у больных с хромосомными абберациями, главным образом, у больных с гиперплоидией или с реаранжировкой гена MLL. По данным T. Taketani и соавт. [49], ни у одного из

Таблица 2. Частота FLT3/TKD при различных вариантах острых лейкозов

Автор	Число больных	Общая частота, %	Нормальный кариотип, %	Хромосомные аберрации	В а р и а н т , %							
					M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>В З Р О С Л Ы Е — О Н Л Л</b>												
Ch. Thiede [48]	2235	6,5	8,6	4,7	3,5	7,1	4,2	8,8	10,2	11,4	0	0
<i>p</i> < 0,001												
<b>Д Е Т И — О Л Л</b>												
T. Taketani [49]	162			Гиперплоидия, % 21,5						Рearанжировка MLL, % 18,2		
S. Armstrong [50]	71			25						<3		

162 детей с ОЛЛ не было обнаружено FLT3/ITD. В то же время мутации в киназном домене обнаружены у 18,2% больных детей с реаранжировкой гена *MLL* и у 21,5% — с гиперплоидией. FLT3/TKD чаще встречалась у маленьких детей: у 5,4% детей старше 1 года и у 16% в возрасте до 1 года. Не было обнаружено корреляции частоты мутаций в киназном домене с полом ребенка, высотой лейкоцитоза, числом тромбоцитов, наличием гепато- и спленомегалии и нейрорлейкемии [49]. Эти данные подтверждены S. Armstrong и соавт. [50], которые обнаружили мутации в киназном домене *FLT3* у 25% детей с ОЛЛ с гиперплоидией. По их данным, мутации гораздо реже встречались при реаранжировке *MLL* [50]. В табл. 2 суммированы данные о частоте FLT3/TKD. По имеющимся данным, мутации в киназном домене *FLT3* не влияли на результаты терапии детей.

#### Прогностическое значение FLT3/ITD- и TKD-мутаций при ОНЛЛ

**Прогноз при FLT3/ITD.** Оценке прогностической роли FLT3/ITD при ОНЛЛ посвящено большое количество исследований. В большинстве из них сравнительный анализ продемонстрировал негативное влияние данной мутации на течение и результаты терапии. Частота ремиссий при современной терапии у больных с FLT3/ITD в большинстве исследований достоверно не отличалась от частоты ремиссий у больных без данной мутации, однако безрецидивная выживаемость в большинстве исследований у больных с FLT3/ITD оказалась достоверно короче, что ухудшало конечные результаты терапии. Так, в британском кооперированном исследовании, включившем 854 больных ОНЛЛ, частота ремиссий у больных без мутации составила 84%, у больных с FLT3/ITD — 78%, что не являлось статистически достоверной разницей. В то же время различия в 5-летней безрецидивной выживаемости (46% у больных без мутации, 30% у больных с FLT3/ITD) и общей выживаемости (44 и 32% соответственно) были высокодостоверными ( $p < 0,001$ ) [37]. В исследовании F. Abu-Duhier и соавт. [31], включившем 106 больных, при отсутствии достоверных различий в частоте ремиссий были существенные различия в выживаемости у больных с FLT3/ITD (12,8 мес в среднем) и без мутации (29,1 мес,  $p = 0,0002$ ). Все пациенты с FLT3/ITD, кроме одного, умерли в течение 18 мес от начала заболевания [31]. Аналогичные данные получены в кооперированном исследовании из Франции. Частота ремиссий была одинаковой в группе без мутации *FLT3* (80%) и с FLT3/ITD (78%), однако общая выживаемость оказалась различной за счет различий в эффективности

лечения рецидивов: 3-летняя выживаемость после лечения рецидивов составила 27% в группе без мутации и 0% в группе с FLT3/ITD [51]. Это положение подтверждается и для больных с ОПЛ, у 96–99% которых при современной терапии достигается ремиссия. При рецидиве у больных с FLT3/ITD удается получить лишь очень кратковременные ремиссии, большинство больных погибают в короткие сроки после рецидива [52].

Интересные данные получены в немецких кооперированных исследованиях, включивших 1003 больных. Все больные первоначально получили интенсивную терапию (двойная индукция TAD9/TAD9, или TAD9/HAM, или HAM/HAM). Частота ремиссий составила 70,3% в группе с FLT3/ITD и 70,4% в группе без мутации, не было и достоверной разницы в общей выживаемости, но безрецидивная выживаемость была достоверно хуже в группе с FLT3/ITD [39]. Эти данные показывают, что интенсивная терапия может изменить конечные результаты, поскольку отсутствие разницы в общей выживаемости между больными двух групп в этом исследовании, очевидно, было достигнуто за счет успешного лечения рецидивов, однако негативное влияние FLT3/ITD сохраняется. Это положение подтверждается британским кооперированным исследованием, в котором проанализированы результаты трансплантации стволовых кроветворных клеток у 311 больных. Результаты индукционной терапии были одинаковыми в группе больных с FLT3/ITD и без данной мутации — в обеих группах получено 85% ремиссий. После достижения ремиссии 141 больной получил ауто- и аллотрансплантацию стволовых кроветворных клеток, 170 — аллотрансплантацию от сиблинга. Разницы в числе ауто- и аллотрансплантаций между группами больных с FLT3/ITD и без нее не было, однако частота рецидивов за 10 лет наблюдения достоверно различалась: 70% в группе с FLT3/ITD, 51% — в группе без тандемного удвоения ( $p < 0,001$ ). Это отразилось на общей выживаемости: 10 лет прожили 27% больных в группе с FLT3/ITD, 39% — в группе без нее. Авторы делают вывод, что даже включение аллотрансплантации в лечебную программу не дает возможности преодолеть негативное влияние FLT3/ITD [53].

У детей влияние FLT3/ITD оказалось даже более универсальным, чем у взрослых: оно касается не только безрецидивной и общей выживаемости, но и частоты ремиссий. В американском кооперированном исследовании при лечении 91 ребенка в результате индукционной терапии было получено 40% ремиссий у больных ОНЛЛ с FLT3/ITD и 74% у больных без данной мутации, а 8-летняя безрецидивная выживаемость составила 7 и 44% со-

ответственно ( $p < 0,002$ ) [54]. Эти данные подтверждены исследованием, включившем 234 ребенка: частота ремиссий составила 70% в группе с FLT3/ITD и 88% в группе без нее, а 5-летняя безрецидивная выживаемость — 29 и 46% соответственно ( $p < 0,0046$ ) [47].

**Значение сохранения нормального аллеля FLT3 при FLT3/ITD мутации.** В последние годы появились исследования, показавшие, что на прогноз больных ОНЛЛ влияет не только наличие FLT3/ITD, но и соотношение мутировавших рецепторов и нормальных рецепторов — рецепторов «дикого» типа FLT3/WT. Было обнаружено, что у больных с FLT3/ITD мутация исчезает при достижении ремиссии, но в рецидиве появляется вновь, при этом в ряде случаев происходит уменьшение или полная утрата рецепторов FLT3/WT. Это показывает, что утрата нормального аллеля, по всей вероятности, играет роль в прогрессировании заболевания [39]. S. Whitman и соавт. [55] детально проследили динамику гематологических изменений и влияние на прогноз постепенной утраты нормального аллеля FLT3. Ими было показано, что по мере утраты FLT3/WT нарастают лейкоцитоз и число бластных клеток в крови, оба показателя были наиболее высокими у больных с отсутствием FLT3/WT. Оценка прогностического значения отсутствия FLT3/WT показала, что ремиссии в этой группе достигаются несколько реже, но различия недостоверны: 86% ремиссий в группе без FLT3/ITD, 79% — с FLT3/ITD и сохранением нормального аллеля, 75% — у больных без FLT3/WT. Однако продолжительность ремиссии у больных с отсутствием FLT3/WT оказалась достоверно и значительно короче: медиана продолжительности ремиссии составила 52, 24 и 4 мес соответственно, а процент больных, проживших 12 мес, — 71, 51 и 17 ( $p < 0,0017$ ). У 6 из 8 больных с FLT3/ITD и отсутствием нормального аллеля была получена ремиссия после индукционной терапии, однако у 5 из 6 рецидив развился в течение ближайших 3 мес. Один год прожили 74% больных без мутаций FLT3, 65% с FLT3/ITD и лишь 13% в группе без FLT3/WT ( $p < 0,0005$ ) [55]. Аналогичные результаты получены Ch. Thiede и соавт. [44]. При интенсивной терапии (двойная индукция и высокодозная консолидация) не было разницы в частоте ремиссий у больных без мутаций FLT3 и с FLT3/ITD (71,2 и 66,8% соответственно), но соотношение FLT3/ITD и FLT3/WT имело решающее значение для безрецидивной и общей выживаемости. Если это соотношение превышало 2, результаты были исключительно плохими: у 14 из 15 больных этой группы развился быстрый рецидив, и все 14 умерли в течение года после достижения ремиссии с медианой выживаемости 8 мес. Ремиссия сохранялась лишь у больного, получившего аллогенную трансплантацию [44]. Таким образом, можно сделать вывод, что больные ОНЛЛ с FLT3/ITD и утратой нормального аллеля имеют исключительно плохой прогноз.

Несколькими исследованиями показана также неблагоприятная роль наличия tandemных удвоений в нескольких местах гена FLT3 у одного и того же больного. P. Kottaridis и соавт. [37], обследовав 224 больных ОНЛЛ с FLT3/ITD, установили, что у 23% имеется не одно, а 2—4 tandemных удвоения. У этих больных были наиболее высокие лейкоцитоз и процент бластных клеток в крови и костном мозге. Многофакторный анализ показал, что количество мутаций является независимым неблагоприятным прогностическим признаком для частоты ремис-

сий, безрецидивной и общей выживаемости [37]. Такие же данные получены Ch. Thiede и соавт. [44].

**Прогноз при FLT3/TKD.** Анализ прогностического значения FLT3/TKD показал различные результаты в разных исследованиях. По данным Ch. Thiede и соавт. [44], эти мутации не оказывают влияния на частоту ремиссий, но снижают общую и безрецидивную выживаемость. В то же время S. Frohling и соавт. [32] и Y. Yamamoto и соавт. [41] не обнаружили влияния этих мутаций на показатели общей и безрецидивной выживаемости. Тем не менее два метаанализа, включившие 1160 и 2535 больных ОНЛЛ (249 из них с мутациями в киназном домене), показали отсутствие влияния FLT3/TKD на частоту ремиссий, но отрицательное влияние на общую и безрецидивную выживаемость [48, 56].

### Сочетание мутаций гена FLT3 с мутациями других генов

В отдельных случаях, главным образом у пожилых больных, обнаруживается сочетание мутаций гена FLT3 и других генов, чаще всего гена RAS, участвующего в передаче пролиферативного сигнала, и гена TP53, являющегося супрессором опухолевого роста. Мутации RAS выявлены примерно у 20% больных ОНЛЛ. В большинстве исследований не обнаружено влияния этих мутаций на результаты терапии [57, 58]. Мутации TP53 обнаруживаются примерно у 15% больных ОНЛЛ, преимущественно у больных старших возрастных групп. При этих мутациях отмечено снижение общей и безрецидивной выживаемости [59]. D. Stirewalt и соавт. [60], исследовав 140 больных, показали, что сочетание мутаций указанных генов встречается редко: в их наблюдениях мутации FLT3 обнаружены у 29% больных, RAS — у 19%, TP53 — у 9%, сочетание мутаций FLT3 и RAS обнаружено лишь у 2 больных, сочетание мутаций FLT3 и TP53 не обнаружено. По всей вероятности, в индуцировании мутаций FLT3 и TP53 участвуют разные механизмы, поскольку мутации TP53 в 90% случаев встречаются у больных с неблагоприятными хромосомными aberrациями (изменения хромосомы 7 и отсутствие хромосомы 5), в то время как мутации FLT3 практически не встречаются у больных с этими хромосомными aberrациями [60].

### Профиль экспрессии генов у больных с мутациями FLT3

Использование микрочипов для определения различий в экспрессии генов при разных вариантах острых лейкозов показало, что при ОНЛЛ без мутаций FLT3, с мутациями FLT3/ITD и FLT3/TKD экспрессируются различные гены. Обнаружено наибольшее прогностическое значение экспрессии двух генов: RUNX3, действующего как опухолевый супрессор, и ATRX, участвующего в метилировании ДНК. Оказалось, что по соотношению экспрессии этих генов больных ОНЛЛ с мутациями FLT3 можно разделить на 3 прогностические группы. В группе с низким соотношением RUNX3/ATRX (менее 2) 3 года без рецидива прожили 62% больных, в группе с соотношением от 2 до 10 — 37%, при соотношении более 10 — 0%. Общая трехлетняя выживаемость в группе с низким соотношением составила 70%, в группе с высоким — только 7% [46].

### Методы выявления мутаций в гене FLT3

Представленные нарушения FLT3 являются очень «удобными» в отношении диагностики из-за их локализации, главным образом, в двух участках гена.

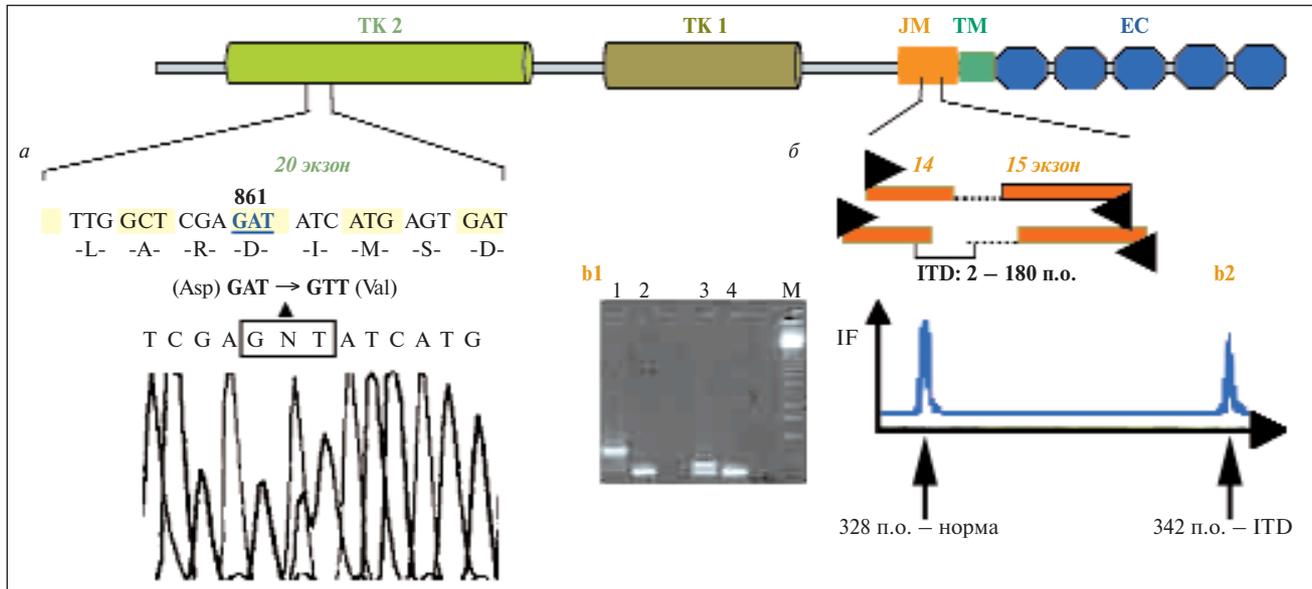


Рис. 3. ПЦР и капиллярный электрофорез.

*а* — секвенирование ПЦР фрагмента 20-го экзона. На сиквенсе показан смешанный пик N (в квадрате), который характеризует наличие гетерозиготной мутации в триплете 861 GAT, который в норме кодирует аспарагиновую аминокислоту. В результате замены А на Т аспарагин меняется на валин, что критическим образом меняет конформацию А-петли в домене TK 2 при ОМЛ;  
*б* — схема ПЦР (черными горизонтально-встречными стрелками обозначены праймеры) для анализа ITD (белый блок), которая возникает в интроне (помечен пунктиром) между 14-м и 15-м (оранжевые блоки), частично затрагивая 14-й экзон. *b1* — агарозный электрофорез ПЦР фрагментов, содержащих ITD различной длины. Треки: 1 — 398 п.о.; 2, 4 — норма 328 п.о.; 3 — 342 п.о. *b2* — капиллярный электрофорез ПЦР фрагментов, (удобен для анализа коротких ITD). IF — интенсивность флуоресценции, L — длина фрагментов

Внутренние tandemные дупликации ITD наблюдаются между 14-м и 15-м экзонами гена *FLT3*. По разным данным, размер вставки может варьировать от 2 до 400 нуклеотидов. Расстояние между этими экзонами составляет чуть более 300 нуклеотидов, поэтому вставку можно обнаружить с помощью одной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 3, *a*).

**ПЦР и электрофорез в агарозном геле.** Для анализа геномных нарушений *FLT3* используют образцы свежей периферической крови или костного мозга, из которых выделяется ДНК, и затем проводится ПЦР. После этого амплифицированные фрагменты ДНК разделяются по размеру в агарозном геле. В случае крупных ITD-вставок (более 10 нуклеотидов) можно ограничиться визуальным анализом полученного результата, так как крупные вставки видны невооруженным глазом. В норме подобранные праймеры амплифицируют фрагмент в 328 пар оснований (п.о.) (рис. 3, *b1*). В том случае, если вставка затрагивает оба аллельных локуса гена (что случается крайне редко), продукт ПЦР мигрирует в виде одной полосы выше 328 п.о. Как правило, наблюдается 2 полосы: 328 п.о., что соответствует нормальному аллелю, и полосы большего размера — показатель наличия ITD [25].

Нередко вставка может состоять всего из нескольких нуклеотидов. Такие вставки становятся неотличимыми в агарозе. В этом случае ПЦР-фрагменты лучше всего проверять с помощью капиллярного электрофореза на секвенаторах в режиме фрагментного анализа [27]. Этот метод обладает высокой степенью разрешения и позволяет разделять фрагменты, слабо различающиеся по размеру. Метод представляет собой автоматизированный капиллярный электрофорез, в ходе которого флуоресцентно меченные ПЦР-фрагменты разделяются с высокой степенью разрешения с точностью до одного нуклеотида.

На выходе из капилляра фрагменты облучаются лазером и регистрируются в виде двух пиков (интенсивности флуоресценции), отличающихся друг от друга по времени выхода из капилляра в зависимости от своей структуры и размера.

Мутации, приводящие к изменению структуры А-петли, локализуются в 20-м экзоне. Наиболее значимыми являются нуклеотидные триплеты D864 (старое обозначение D835) и N870 (или -N841). Буквы даны в соответствии с названием аминокислоты и ее (или соответствующего триплета нуклеотидов) порядковым номером. Эти нуклеотидные замены также проверяются с помощью ПЦР и последующего секвенирования [61]. Анализ результатов секвенирования подробно показан на рис. 3, *a*. Подавляющее число мутаций находится в гетерозиготном состоянии (т.е. затрагивает только один из аллелей). В этом случае на хроматографической картинке наблюдается смешанный пик, который является результатом наложения двух сигналов — от нормального и мутантного нуклеотидов.

#### **Ингибиторы FLT3-тирозинкиназы в терапии больных ОНЛЛ с активирующими FLT3-мутациями**

Выявление роли FLT3 в гемопоэзе и значения мутаций гена *FLT3* при ОНЛЛ побудило к поискам ингибиторов FLT3-тирозинкиназы. Несколько потенциальных ингибиторов было исследовано на клеточных культурах и в опытах на мышах. Два из них — ST53518 и PKC412 — показали активность при индуцированном лейкозе мышей, удлинив латентный период до развития заболевания и увеличив выживаемость животных [62, 63].

В 2005 г. опубликованы результаты первого клинического исследования эффективности PKC412 (N-benzoylstauropirine). Препарат не имеет узко направленного действия, он ингибирует все рецепторные тирозин-

киназы данного класса. Лечение получили 20 больных с рецидивом ОНЛЛ или с рефрактерностью к ранее проведенной терапии. У 18 больных обнаружено FLT3/ITD, у 2 — мутации в киназном домене FLT3. У 14 из 18 больных, которым успешно выполнено цитогенетическое исследование, был нормальный кариотип. Препарат назначался внутрь по 75 мг 3 раза в день. Лечение пришлось отменить 8 пациентам из-за негематологической токсичности (гипербилирубинемия) или осложнений (бронхопневмония). У 14 из 20 больных после месячно-

го лечения достигнуто более чем 50% уменьшение числа бластных клеток в крови, у 6 больных — их полное исчезновение на несколько недель и более чем 50% уменьшение в костном мозге. У 3 больных констатирована полная ремиссия, правда, при сниженной клеточности костного мозга [64].

Возможно, подобно АТРА, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ окажутся высокоэффективными в сочетании с цитостатической терапией, что обеспечит прогресс в лечении еще одной группы больных ОНЛЛ.

## Л и т е р а т у р а

1. Ason N., Adachi K., Tamura J. et al. Analysis of prognostic factors in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;6:78–85.
2. Sanz M.A., Martin G., Rayon C. et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARa-positive acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94: 3015–21.
3. Sanz M.A., Lo Coco F., Martin G. et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000;96:1247–53.
4. Look A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997;278:1059–64.
5. Caligiuri M.A., Strout M.P., Gilliland D.G. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:32–44.
6. Caligiuri M.A., Schichmann S.A., Strout M.P. et al. Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 1994;54:372–3.
7. Tanaki N., Kaneko Y., Maseki N. et al. Trisomy 11 in chronic myelomonocytic leukemia: report of two cases and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30:109–17.
8. Caligiuri M.A., Strout M.P., Lawrence D. et al. Rearrangement of the ALL(MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetic. *Cancer Res* 1998;58:55–9.
9. Dohner K., Tobis K., Ulrich R. et al. Prognostic significance of partial tandem duplication of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2000;20:3254–61.
10. Schnittger S., Kinkelin U., Schoch C. et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000;14:796–804.
11. Agnes F., Shamoon B., Dina C. et al. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 1994;145:283–8.
12. Rosnet O., Schiff C., Pebusque M.J. et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993;82:1110–9.
13. Maroc N., Rottapel R., Rosnet O. et al. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLT2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1993;8:909–18.
14. Brasel K., Escobar S., Anderberg R. et al. Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* 1995;9:1212–8.
15. Rasko J.E., Matcalf D., Rossner M.T. et al. The flt3/flt2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia* 1995; 9:2058–66.
16. Rusten L.S., Lyman S.D., Veiby O.P. et al. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 1996;87:1317–25.
17. Brashem-Stein C., Flowers D.A., Bernstein I.D. Regulation of colony forming cell generation by flt3 ligand. *Br J haematol* 1996;94:17–22.
18. Lyman S.D., Brasel K., Rousseau A.M. et al. The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells* 1994;12:99–107.
19. Ray R.J., Paige C.J., Furlonger C. et al. FLT3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin 11 and interleukin 7. *Eur J Immunol* 1996;26:1504–10.
20. Rosnet O., Buhning H.J., Marchetto S. et al. Human FLT3/FLT2 receptor tyrosine kinase is expressed on the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996;10:238–48.
21. Marascovsky E., Brasel K., Teepe M. et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953–62.
22. Yu H., Fehniger T.A., Fuchshuber P. et al. FLT3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin 15. *Blood* 1998;92:3647–57.
23. Hayakawa F., Towatari M., Kiyoi H. et al. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3 dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19:624–31.
24. Muzuki M., Fenski R., Halfter H. et al. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT pathways. *Blood* 2000;96:3907–14.
25. Birg F., Rosnet O., Carbuca N. et al. The expression of FMC, kit and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymph* 1994;13:223–7.
26. Carow C.E., Levenstein M., Kaufmann S.H. et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3(STK-1/FLK2) in human leukemias. *Blood* 1996;87:1089–96.
27. Drexler H.C. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996;10:588–99.
28. Birg F., Courcoul M., Rosnet O. et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992;80:2584–93.
29. Meierhoff G., Dehmel U., Gruss H.J. et al. Expression of FLT3 receptor and FLT3 ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995;9:1368–72.
30. Nakao M., Yokota S., Iwai T. et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911–8.
31. Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A. et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000;111:190–5.
32. Frohling S., Schlenk R.F., Breittrück J. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16–60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002;100:4372–80.
33. Xu F., Taki T., Yang H.W. et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is

- found in acute lymphoblastic leukemia as well as acute myeloid leukemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukemia in children. *Br J Haematol* 1999;105:155–62.
34. Yokota S., Kiyoi H., Nakao M. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997;11:1605–9.
35. Nakao M., Janssen J.W., Erz D. et al. Tandem duplication of the FLT3 gene in acute lymphoblastic leukemia: a marker for the monitoring of minimal residual disease. *Leukemia* 2000;14:525–9.
36. Ishi E., Zaitsu M., Yhara K. et al. High expression but no internal tandem duplication of FLT3 in normal hematopoietic cells. *Pediatr Hematol Oncol* 1999;16:437–41.
37. Kottaridis P.D., Gale R.E., Frew M.E. et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752–9.
38. Kiyoi H., Towatari M., Yokota S. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12:1333–7.
39. Schnittger S., Schoch C., Dugas M. et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB-subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002;100:59–66.
40. Kottaridis P.D., Gale R.E., Linch D.C. FLT3 mutation and leukemia. *Br J Haematol* 2003;122:523–38.
41. Yamamoto Y., Kiyoi H., Nacano Y. et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001;97:2434–9.
42. Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A. et al. Identification of novel FLT3 Asp 835 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2001;113:983–8.
43. Schnittger S., Boell I., Schoch C. et al. FLT3 D835/I836 point mutations in acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, cytomorphology, and prognosis in 1229 patients. *Blood* 2002;100:329a.
44. Thiede Ch., Stendel Ch., Mohr B. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB-subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326–35.
45. Kuchenbauer F., Schoch C., Kern W. et al. Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 2005;130:196–202.
46. Lacayo N.Y., Meshinchi S., Kinnunan P. et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identified FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004;104:2646–54.
47. Zwaan Ch.M., Meshinchi S., Radich J.P. et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003;102:2387–94.
48. Thiede Ch., Schnittger S., Kern W. et al. Point mutations of the FLT3-receptor tyrosine kinase in patients with acute myeloid leukemia – results of an intergroup analysis of the AML CG study and the AML96 study of the SHG. *Blood* 2003;102:606a, abstr. 2237.
49. Taketani T., Taki T., Sugita K. et al. FLT3 mutations in the activating loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperploidy. *Blood* 2004;103:1085–8.
50. Armstrong S.A., Mabon M.E., Silverman L.B. et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:3544–6.
51. Boisel N., Cayela J.M., Predhomme C. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:1699–704.
52. Callens C., Chervet S., Cayuela J.-M. et al. Prognostic implication of FLT3 and RAS mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia* 2005;19:1153–60.
53. Gale R.E., Hills R., Kottaridis P.D. et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML 10 and 12 trials. *Blood* 2005;106:3658–65.
54. Meshinchi S., Woods W.G., Stirewalt D.L. et al. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:89–94.
55. Whitman S.R., Archer K.J., Feng L. et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3. A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Res* 2001;61:7233–9.
56. Yanada M., Matsou K., Suzuki T. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005;19:1345–9.
57. Neubauer A., Dodge R.K., George S.L. et al. Prognostic importance of mutations in the ras protooncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:1603–11.
58. Radich J.P., Kopecky K.J., Willman C.L. et al. N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. *Blood* 1990;78:801–7.
59. Wattal E., Preudhomme C., Hecquet B. et al. P53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84:3148–57.
60. Stirewalt D.L., Kopecky K.J., Meshinchi S. et al. FLT3, RAS and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589–95.
61. Au W.Y., Fung A., Chim C.S. et al. FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematology* 2004;125:463–9.
62. Kelly L.M., Yu J.C., Boulton C.L. et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 2002;1:421–32.
63. Levis M., Allebach J., Tse K.F. et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002;99:3885–91.
64. Stone R.M., De Angelo D.J., Klimek V. et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC 412. *Blood* 2005;105:54–60.

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

Т.В. Наседкина

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

## Введение

Микрочипы как метод анализа генома получили широкое распространение в молекулярной биологии и биомедицинских исследованиях. Публикуется огромное количество статей, связанных с этой технологией, микрочипы производят многие крупные компании, а объем продаж составляет сотни миллионов долларов в год.

Идея микрочипов зародилась в конце 1980-х годов параллельно в нескольких лабораториях. В 1990 г. был опубликован патент югославских исследователей Дрманача и Чрквенякова, которые предложили иммобилизовать на двумерной поверхности анализируемую ДНК и проводить ряд последовательных гибридизаций с олигонуклеотидными пробами для определения последовательности исследуемого образца ДНК. Независимо от них российский ученый А.Д. Мирзабеков предложил определять последовательность ДНК с помощью обратного подхода, а именно иммобилизации набора коротких олигонуклеотидов, представляющих собой все возможные последовательности определенной длины, с которыми предполагалось гибридизовать анализируемый фрагмент меченой ДНК с неизвестной последовательностью. Реконструкция последовательности анализируемой ДНК должна была производиться с помощью математических методов анализа. Более подробную историческую справку можно найти в обзоре А.М. Колчинского и соавт. [1].

В дальнейшем лавинообразное развитие этих идей породило множество вариантов микрочипов, используемых в самых разнообразных областях молекулярной биологии и биомедицины [2, 3]. Хотя создано множество различных систем на основе этой технологии, можно выделить некоторые общие моменты, характерные для всех микрочипов. Прежде всего, микрочипы представляют собой устройства для проведения массового анализа по многим параметрам одновременно. Наиболее широкое применение нашли микрочипы, изготовленные на твердой поверхности. В качестве подложки используют стекло, пластик, металл, мембрану и т.п. На этой подложке могут быть иммобилизованы различные биологические макромолекулы, в первую очередь ДНК, а также РНК или белки. По устоявшейся терминологии, иммобилизуемые молекулы принято называть зондами, а те молекулы, которые находятся в исследуемом образце и подвергаются анализу, — мишенями. Как правило, зонды наносят на поверхность мик-

рочипа в определенной последовательности; таким образом, микрочип представляет собой упорядоченную матрицу, в которой каждый элемент заранее задан и определен. В процессе гибридизации происходит специфическое взаимодействие молекул-зондов и молекулы-мишени по принципу комплементарности, а для того чтобы выявлять стабильные гибридизационные структуры и определить, с каким зондом произошло взаимодействие, молекулы-мишени предварительно метят флуоресцентным красителем. Таким образом, картина гибридизации представляет собой картину распределения флуоресцентных сигналов, наиболее ярких в точках специфического связывания зонда и мишени. В качестве примера можно рассмотреть схему строения и общий вид так называемых трехмерных микрочипов, в которых молекулы-зонды иммобилизованы не просто на поверхности стекла, а в каплях полиакриламидного геля (рис. 1). В большинстве случаев зонды синтезируют предварительно, а затем наносят на твердую подложку с помощью робота. Однако разработана также технология синтеза олигонуклеотидных зондов непосредственно на поверхности микрочипа *in situ* с использованием литографических масок (в микрочипах, разрабатываемых фирмой Affymetrix).

## Экспрессионные микрочипы

Одно из активно разрабатываемых направлений с применением технологии микрочипов — это исследование транскрипционных профилей при сложных заболеваниях. Хотя все клетки нашего организма обладают од-

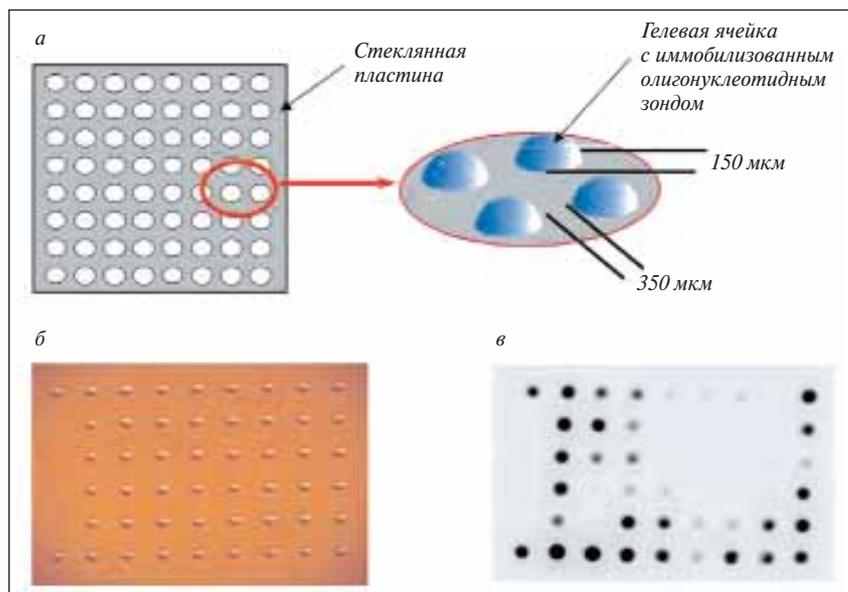


Рис. 1. Микрочип с трехмерными ячейками из полиакриламидного геля, в которых иммобилизованы олигонуклеотидные пробы.

а — строение микрочипа. Ячейки фиксированы на твердой подложке, каждая ячейка содержит индивидуальную пробу; б — фотография микрочипа в световом микроскопе; в — изображение микрочипа после гибридизации с флуоресцентно меченой мишенью. Наиболее темные точки соответствуют наиболее ярким флуоресцентным сигналам

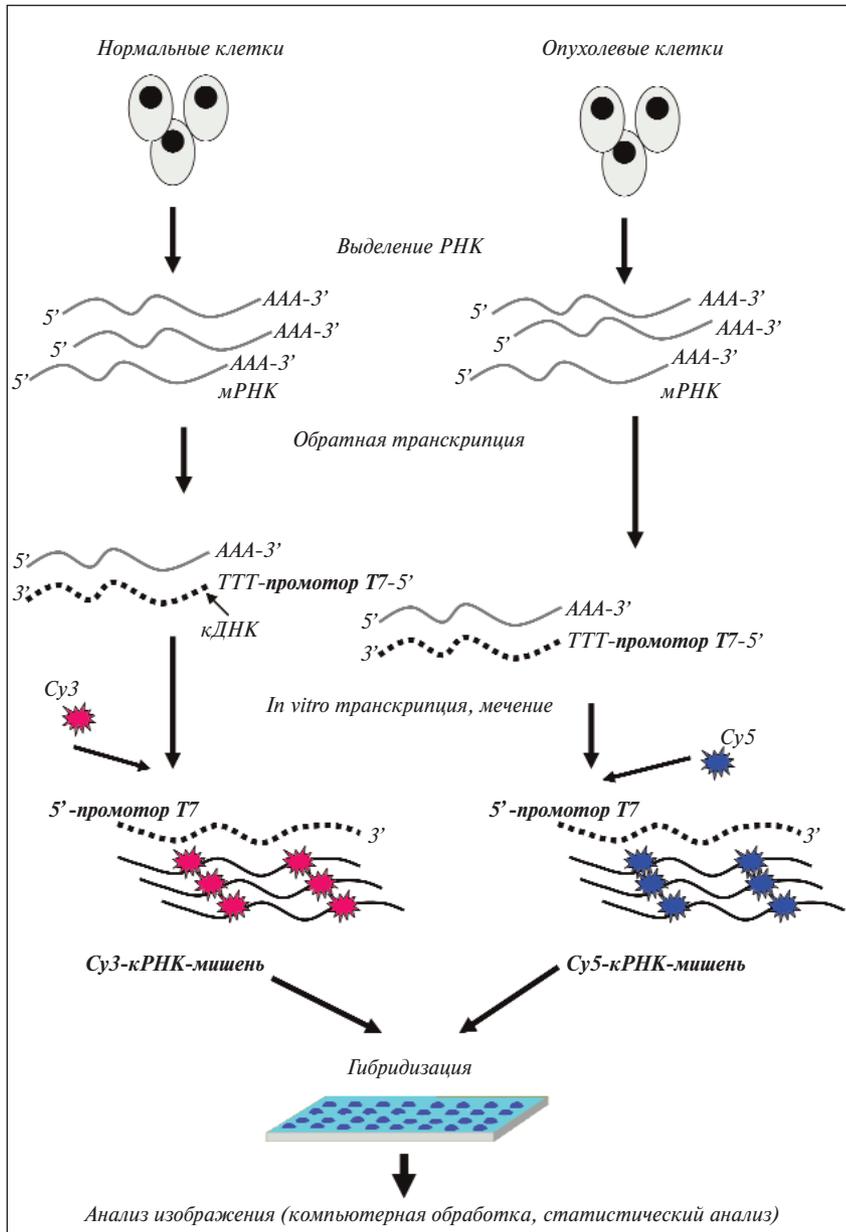


Рис. 2. Анализ на экспрессионных микрочипах при использовании двух флюоресцентных красителей.

Параллельно проводят выделение РНК из нормальных и опухолевых клеток. Далее следуют этапы обратной транскрипции и *in vitro* транскрипции с одновременным включением флюоресцентной метки. После гибридизации в каждой точке микрочипа измеряют флюоресцентные сигналы от обоих красителей и определяют их соотношение. Таким образом определяют повышение или понижение уровня экспрессии данного гена в опухолевой клетке относительно нормальной

ной и той же переданной по наследству геномной ДНК, каждая клетка экспрессирует различные гены в виде мРНК в соответствии с типом клетки, биологическими процессами, нормальным или патологическим состоянием и т.д. Это разнообразие в профилях генной экспрессии является предметом интенсивного изучения ввиду его биологического и клинического значения. Способность технологии микрочипов анализировать экспрессию сотен и тысяч генов оказалась наиболее востребована при расшифровке такого сложного заболевания, как рак. Технология микрочипов позволяет одновременно отслеживать экспрессию десятков тысяч генов, создавая молекулярный портрет клетки [4, 5]. К наиболее значительным пос-

ледствиям изучения профилей генной экспрессии можно отнести диагноз, стратификацию и определение прогноза при многих видах рака [6]. Хотя гистопатологическая оценка, дополненная цитогенетическим исследованием и анализом нескольких молекулярных маркеров, все еще является золотым стандартом в постановке диагноза и определении прогноза, работы последних лет показывают, что во многих случаях она может быть заменена определением профиля экспрессии генов. Диагноз и прогноз при раковых заболеваниях требуют совместной экспертизы нескольких специалистов-практиков, таких как онкологи, патологи и цитогенетики, кроме того, окончательные выводы могут варьировать в зависимости от методических подходов и квалификации экспертов. Микрочипы могли бы полностью заменить усилия многих специалистов, кроме того, повысить точность в постановке диагноза и определении прогноза, а также обеспечить единую стандартизированную платформу для анализа.

Для анализа экспрессии генов используют микрочипы двух типов: на основе комплементарной ДНК (кДНК) и на основе олигонуклеотидных зондов. Микрочипы на основе кДНК представляют собой фрагменты ДНК, закрепленные на поверхности стандартных микроскопических стекол или на другой твердой подложке. В олигонуклеотидных микрочипах на такой же подложке иммобилизованы олигонуклеотиды длиной 25–60 нуклеотидных оснований (н.о.). Процедура подготовки образца при проведении анализа на микрочипах представлена на рис. 2. Из клеток выделяют тотальную РНК (иногда выделяют также фракцию мРНК), далее проводят реакцию обратной транскрипции, используя комбинированный праймер, содержащий последовательность, комплементарную полиА-концевому фрагменту мРНК, и участок промотора Т7 РНК-полимеразы. Включение в состав синтезирующейся цепи кДНК последовательности промотора Т7 РНК-полимеразы позволяет в дальнейшем провести реакцию амплификации *in vitro*: фермент Т7 РНК-полимеразы нарабатывает в пробирке множество копий РНК с каждой молекулы кДНК. Так происходит линейная амплификация исходной мРНК. Как правило, одновременно проводят мечение образующихся молекул РНК за счет использования в реакции нуклеотидов, содержащих флюоресцентную метку. В экспериментах с олигонуклеотидными микрочипами часто используют для мечения образца комплемен-

тарной РНК (кРНК) флюоресцентную метку одного типа, а уровни экспрессии генов определяют, сравнивая получаемые флюоресцентные сигналы с сигналами внутренних контрольных точек микрочипа. При работе с микрочипами на основе кДНК, как правило, в эксперименте используют 2 образца: контрольный образец метят одним флюоресцентным красителем, исследуемый образец — другим, далее их смешивают и гибридизуют с одним микрочипом. По соотношению двух разных флюоресцентных меток в каждой ячейке микрочипа судят о повышении или понижении уровня экспрессии данного гена. Независимо от технологической платформы в каждом эксперименте формируются данные, содержащие оценку уровня экспрессии десятков и сотен тысяч генов. Для обработки такого количества данных используется довольно сложный математический аппарат, в первую очередь, кластерный анализ. Анализ данных, полученных с помощью микрочипов, может производиться в сопоставлении с клиническими данными (анализ, ориентированный на проверку гипотезы, supervised analysis) или безотносительно к любой клинической характеристике пациента (независимый анализ, unsupervised analysis).

#### **Анализ экспрессии генов при онкогематологических заболеваниях**

Анализ профиля генной экспрессии с использованием микрочипов внес существенный вклад в наши представления о процессах, лежащих в основе онкогематологических заболеваний. Первым выдающимся примером явился анализ экспрессии генов при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДККЛ) [7, 8]. ДККЛ, наиболее часто встречающийся вариант неходжкинской лимфомы, является клинически гетерогенной по ответу на терапию. Несмотря на то что большинство пациентов инициально отвечают на терапию, только около 40% остаются в длительной ремиссии. Такая гетерогенность приводит к мысли, что на самом деле это не одно, а, по крайней мере, два отличных друг от друга заболевания. В работе А.А. Alizadeh и соавт. [8] впервые была проведена стратификация пациентов с ДККЛ по экспрессии генов в клетках опухоли. Был использован микрочип на основе кДНК, содержащий фрагменты ДНК генов, участвующих в пролиферации и дифференцировке клеток лимфоидного ряда. В результате этого исследования были выявлены 2 различные по молекулярной природе формы: ДККЛ из В-клеток герминального центра (ГЦ) и ДККЛ из активированных В-клеток. При этом различные профили экспрессии генов отражали различия в скорости пролиферации, ответе на терапию и уровнях дифференцировки опухолей. При использовании одного и того же стандартного курса химиотерапии общая 5-летняя выживаемость у больных ДККЛ из В-клеток ГЦ составила 76% против 16% у больных ДККЛ из активированных В-клеток. При этом общая 5-летняя выживаемость без разделения на подгруппы составила 52%. До сих пор наиболее известным предсказателем прогноза при лимфомах служит Международный прогностический индекс (МПИ), который включает такие клинические показатели, как возраст, стадия опухоли, концентрация лактатдегидрогеназы в сыворотке, выраженность и количество экстранодальных очагов. С использованием МПИ была выделена группа низкого риска, которая на основании анализа экспрессии генов снова дала две подгруппы с различной выживаемо-

стью. Таким образом, было показано, что дифференциальная экспрессия генов независима от других клинических показателей, таких как возраст пациента, стадия опухоли и т.п., может с высокой точностью определять прогноз при лимфопротеративных заболеваниях.

Эта работа вдохновила исследователей на поиски групп генов, экспрессия которых может служить независимым прогностическим фактором при стратификации пациентов по группам риска и оценке выживаемости. Одна такая попытка была сделана в работе М.А. Shipp и соавт. [9], где были выделены две категории пациентов в группе из 58 больных с диагнозом ДККЛ, которые существенно различались по 5-летней выживаемости (70 и 12%). На основе сравнительного анализа профилей генной экспрессии в двух этих группах пациентов была подобрана панель из 13 генов для использования в качестве независимого фактора прогноза.

В аналогичной работе [10] при сопоставлении клинических данных и результатов анализа экспрессии генов для 160 образцов лимфом была составлена несколько отличная панель из 17 генов, которая была успешно применена к анализу последующих 80 образцов, показав, что этот набор из 17 генов может быть использован как молекулярный предсказатель выживаемости. На основании анализа экспрессии генов были выделены 3 группы пациентов, 2 из которых соответствовали определенным ранее [8]. Параллельный анализ геномных aberrаций показал, что транслокация  $t(14;18)$  с участием гена *BCL-2* и амплификация гена *c-REL*, ранее описанные для ДККЛ, встречаются строго в одной группе, а именно у пациентов с ДККЛ из В-клеток ГЦ. Третья группа с отличающимся профилем экспрессии характеризовалась плохим прогнозом, как и ДККЛ из активированных В-клеток, но, скорее всего, не являлась однородной. Дальнейшее исследование с помощью независимых методов оценки уровня экспрессии, таких как ПЦР в реальном времени, показало большую информативность 17-генной модели, которая включала гены, относящиеся к 4 группам: гены В-клеток ГЦ, гены класса II основного комплекса гистосовместимости, гены, участвующие в развитии лимфатических узлов, и гены, участвующие в пролиферации [11]. Кроме того, были выделены всего 6 генов (*LMO2*, *BCL6*, *FN1*, *CCND2*, *SCYA3*, *BCL2*), экспрессия которых в наибольшей степени коррелировала с клиническим исходом.

Фолликулярная лимфома (ФЛ) также характеризуется высокой гетерогенностью и по клиническим показателям подразделяется на опухоли с высокой и низкой пролиферативной активностью. Кроме того, ФЛ может трансформироваться в более агрессивную ДККЛ. Анализ экспрессии генов у 80 пациентов с ФЛ в сопоставлении с клиническими данными позволил выделить панель из 81 гена, пользуясь которой можно различить вялотекущую и агрессивную формы с точностью 93% [12].

Для лимфомы клеток мантийной зоны характерным является наличие хромосомной aberrации  $t(11;14)$ , приводящей к повышению уровня экспрессии циклина D1 [13]. Используя микрочипы на основе кДНК, содержащие фрагменты 6386 генов, авторы проанализировали профили экспрессии для 38 случаев [14]. В последующий анализ было включено 446 генов, участвующих в апоптозе, клеточном цикле и ответственных за иммунный ответ. Наибольшее количество изменений было отмечено для сигнальных путей с участием ядерного транскрипцион-

ного фактора NFκB и фактора некроза опухоли. Предполагается, что активация NFκB-сигнального пути в ходе воспалительных процессов в организме играет важную роль в этиологии лимфопролиферативных заболеваний. В результате были выделены 26 генов, повышенный или пониженный уровень экспрессии которых можно рассматривать как прогностический фактор. С использованием этого молекулярного классификатора все пациенты были стратифицированы на 2 группы: высокого и низкого риска. В группе низкого риска, к которой были отнесены около половины всех пациентов, 5-летняя выживаемость составила 52%. В группе высокого риска ни один из пациентов не дожил до 5 лет. Медиана общей выживаемости для всех пациентов составила 27 мес.

Методологически схожие исследования были проведены на группах пациентов с острыми лейкозами. Острые лейкозы представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу заболеваний, различающихся по происхождению, клинической картине, прогнозу заболевания и требующих различной терапии [15]. В ранних работах основное внимание было уделено поиску генов, по экспрессии которых можно было бы различать крупные нозологические формы. Например, при анализе 51 образца костного мозга детей с острыми лейкозами на микрочипах, содержащих кДНК от 4608 генов, были получены различия в профилях экспрессии между следующими группами пациентов: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и острый нелимфобластный лейкоз (ОНЛЛ), В-клеточный лейкоз и Т-клеточный лейкоз, В-клеточный лейкоз с химерным транскриптом TEL/AML1 и лейкоз без транслокаций [16]. Таким образом, технология микрочипов оказалась в состоянии успешно стратифицировать пациентов по группам, выявляемым стандартными методами, такими как иммунофенотипирование и цитогенетический анализ. Отдельную группу лейкозов, обладающих специфическим профилем экспрессии, составляют случаи, в которых обнаружены хромосомные перестройки с участием гена *MLL* [17]. Ген *MLL* (mixed-lineage leukemia) расположен на хромосоме 11 (11q23) и часто вовлекается в хромосомные транслокации с различными генами-партнерами. Аберрации, затрагивающие регион 11q23, встречаются как при ОЛЛ, так и при ОНЛЛ. Как правило, они характеризуются плохим прогнозом, хотя на прогноз оказывает влияние также и ген-партнер, участвующий в транслокации. Было обнаружено, что для лейкозов с *MLL*-транслокациями в отличие от других случаев ОЛЛ и ОНЛЛ характерна повышенная экспрессия генов, ассоциированных с ранними стадиями развития клеток-предшественников гемопоэза, таких как *PROM1*, *LMO2*, *FLT3*, а также генов семейства *HOX* (так называемые гомеобоксные гены, участвующие в регуляции развития на ранних стадиях эмбриогенеза). Дальнейшие исследования подтвердили, что для всех случаев с t(11q23)/*MLL* независимо от гена-партнера характерна единая транскрипционная программа; в то же время внутри этой общей группы могут быть четко разделены варианты с t(11q23)/*MLL* при ОЛЛ и при ОНЛЛ [18–20]. Более глубокое понимание механизмов развития заболевания может играть важную роль в поиске новых подходов к лечению. Так, высокий уровень экспрессии гена *FLT3*, кодирующего белок семейства тирозинкиназ, позволяет рассматривать FLT3-тирозинкиназу как потенциальную терапевтическую мишень при некоторых вариантах лейкозов, в том числе и при t(11q23)/*MLL* [21]. Проводятся ис-

следования по применению ингибиторов тирозинкиназы *FLT3* в лечении больных лейкозами [22].

Более детальные исследования профилей генной экспрессии при ОЛЛ у детей показали, что пациенты могут быть стратифицированы по группам, соответствующим вариантам лейкозов с химерными транскриптами *BCR-ABL*, *E2A-PBX1* и *TEL-AML1*, перестройками с *MLL*-геном, гипердиплоидным кариотипом (более 50 хромосом) и Т-клеточным лейкозом [23]. Во многом такое распределение совпало с разделением на группы на основе хромосомных аберраций. Однако в некоторых случаях классификация образца по профилю генной экспрессии может быть более точной, чем по генетической поломке. Это лучше всего иллюстрируется теми случаями, которые согласно профилю экспрессии классифицировались как носители химерного транскрипта *TEL-AML1*, в то время как при анализе с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) этот химерный транскрипт обнаружен не был. В дальнейшем было показано, что каждый из этих случаев, тем не менее, имеет какие-то изменения в гене *TEL*. Кроме того, была выделена группа генов, по всей видимости, ассоциированных с повышенным риском развития вторичного ОНЛЛ, обусловленного терапией у пациентов с *TEL-AML1* подтипом. Эти данные были проверены с использованием другого типа микрочипов, а именно олигонуклеотидных микрочипов, позволяющих анализировать около 39 000 транскриптов, и результаты стратификации пациентов на группы в целом совпали [24]. Аналогичное исследование, показывающее важность генетических изменений при ОЛЛ, было проведено на 35 образцах взрослых пациентов. Профили генной экспрессии образцов, несущих транслокации t(9;22), t(4;11), а также Т-ОЛЛ оказались очень схожими с теми, что были обнаружены у детей с ОЛЛ [25].

Т-клеточный лейкоз — агрессивная форма ОЛЛ. За последнее время ситуация была улучшена благодаря интенсификации терапии. Тем не менее известные на сегодняшний день клинические и биологические особенности Т-клеточного ОЛЛ не позволяют точно определять прогноз и выбирать подходящую по интенсивности терапию. Молекулярная природа Т-ОЛЛ была изучена в основном с помощью цитогенетики. Хромосомные аберрации при этом варианте лейкоза приводят к тому, что гены транскрипционных факторов *HOX11/TLX1*, *TAL1/SCL*, *TAL2*, *LYL1*, *BHLHB1*, *LMO1* оказываются в непосредственной близости от сильного промотора генов иммуноглобулинов, что приводит к резкому повышению уровня их экспрессии [26]. Действительно, при анализе лейкоэмических клеток у детей-пациентов с Т-ОЛЛ была выявлена повышенная экспрессия онкогенных транскрипционных факторов: *LYL1*, *HOX11L2*, *TAL1* [27]. На основании этих данных, были выделены группы, для которых по профилю генной экспрессии можно было определить соответствие бластных клеток определенной стадии нормального созревания лимфоцитов в тимусе. Эти стадии включали про-Т-лимфоциты (корреляция с *LYL1+*), ранние кортикальные тимоциты (*HOX11+*) и поздние кортикальные тимоциты (*TAL1+*). Было показано, что повышенная экспрессия гена *HOX11* относится к онкогенетическим событиям, ухудшающим прогноз [28]. Прогностическое значение активации гена *HOX11* в дальнейшем было показано также для взрослого Т-ОЛЛ [29, 30].

При остром нелимфобластном лейкозе (ОННЛ) эффективная стратификация пациентов обычно проводится с использованием таких факторов риска, как возраст, кариотип бластных клеток, инициальный лейкоцитоз и ответ на индукционную терапию. Особенно большое значение имеют специфические хромосомные aberrации, которые используются как диагностические и прогностические маркеры [31–33]. Однако примерно в половине случаев у пациентов с ОННЛ обычными цитогенетическими методами изменений кариотипа не обнаруживают, что делает невозможным прогноз по данным цитогенетики. В этом случае исследование экспрессии генов открывает новые возможности в понимании механизмов возникновения ОННЛ и в определении клинического исхода в этой группе пациентов. Первые работы с применением микрочипов при анализе ОННЛ были направлены на то, чтобы выяснить, имеется ли соответствие между конкретным профилем генной экспрессии и специфической хромосомной транслокацией, которая определяет генотип лейкоэмической клетки. При исследовании 37 образцов костного мозга взрослых больных с ОННЛ было показано, что подтипы ОННЛ со специфическими хромосомными aberrациями  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$  и  $inv(16)$  могут быть независимо идентифицированы по характерному профилю генной экспрессии [34]. В другом исследовании было показано, что случаи ОННЛ с нормальным кариотипом отличаются повышенной экспрессией нескольких генов из семейства гомеобоксных (гены, участвующие в регуляции развития на ранних стадиях эмбриогенеза) [35]. Т. Yagi и соавт. [36] впервые применили анализ генной экспрессии для предсказания клинического исхода у детей с ОННЛ. Авторами был выявлен набор из 35 ассоциированных с прогнозом генов, который мог быть использован для индивидуального подбора риск-адаптированной терапии. Среди 54 пациентов с ОННЛ было выбрано 9 пациентов с хорошим прогнозом, которые были живы без рецидива в течение 3 лет, и 9 с плохим прогнозом, у которых или не была достигнута ремиссия, или развился рецидив в течение первого года первой ремиссии. При сравнении профилей экспрессии в двух этих группах были выбраны 135 генов, экспрессия которых характеризовалась наиболее сильными различиями. С использованием такого классификатора остальные 36 пациентов были стратифицированы на 2 группы с заметно различающейся бессобытийной выживаемостью (75 и 30%). В другом исследовании с помощью микрочипов были проанализированы 285 образцов от пациентов с ОННЛ. С применением кластерного анализа было выделено 16 групп пациентов с ОННЛ, характеризующихся определенным профилем экспрессии, включая группы с  $t(8;21)$ ,  $inv(16)$ ,  $t(15;17)$ , а также группу с мутациями в гене *FLT3*, с моносомией 7, повышенной экспрессией гена *EVII* [37]. При анализе другой когорты из 116 взрослых пациентов с ОННЛ, из них 45 с нормальным кариотипом, было выявлено несколько новых подтипов ОННЛ [38]. Это исследование фокусируется на возможности использовать микрочипы для предсказания клинического исхода. Авторами был выбран набор из 133 генов для определения прогноза по молекулярному портрету лейкоэмических клеток независимо от того, имелись ли в клетках цитогенетические поломки или клетки были с нормальным кариотипом. Например, образцы с нормальным кариотипом на основании анализа экспрессии генов были разделены на 2 группы с различным прогно-

зом, при этом выживаемость составила 1200 дней при хорошем прогнозе и 700 дней при плохом.

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) ассоциирован с хромосомными транслокациями, вовлекающими рецептор ретиноевой кислоты и такие гены-партнеры, как *PML* и *PLZF*. Наибольшие успехи в лечении ОПЛ были достигнуты при применении препаратов ретиноевой кислоты (all-trans retinoic acid, ATRA), при этом участие в транслокации гена *PML* или *PLZF* определяет ретиноидчувствительный или ретиноидустойчивый вариант ОПЛ соответственно. При исследовании клеточных линий, в которых была индуцирована экспрессия или *PML/RARA*, или *PLZF/RARA* химерных транскриптов, с помощью микрочипов были выявлены гены сигнальных путей, определяющих чувствительность и устойчивость к препаратам ретиноевой кислоты. Это позволяет надеяться на использование микрочипов для определения чувствительности или устойчивости к специфическому лечению [39].

Хронический В-клеточный лимфолейкоз (В-ХЛЛ) является наиболее распространенным вариантом лейкоза у взрослых. В-ХЛЛ характеризуется моноклональной экспансией В-лимфоцитов. Это также гетерогенное заболевание по своему клиническому течению. Оно может развиваться годами и даже десятилетиями у одних больных, но в некоторых случаях быстро прогрессирует вскоре после постановки диагноза, приводя к летальному исходу [40]. Анализ соматических мутаций в вариабельных участках генов иммуноглобулинов (IgV) при В-ХЛЛ показал, что вялотекущее или прогрессирующее течение заболевания зависит от отсутствия или наличия таких мутаций [41, 42]. Была выдвинута гипотеза о том, что В-ХЛЛ в действительности может представлять собой два разных заболевания: в одном случае опухоль развивается из префолликулярных или независимых В-клеток, а в другом — из постфолликулярных В-клеток [43]. Эту гипотезу объясняет тот факт, что гены иммуноглобулинов подвергаются соматической гипермутации, проходя через центр фолликула или ГЦ.

Тем более удивительным было обнаружить, что независимый (unsupervised) кластерный анализ оказался неспособным выявить различия между В-ХЛЛ с мутациями вариабельного региона (M-CLL) и В-ХЛЛ без мутаций вариабельного региона (UM-CLL) [44, 45]. В то же время по профилю экспрессии В-ХЛЛ заметно отличается от других лимфоидных опухолей и от нормальных популяций лимфоцитов [46, 47]. При использовании подхода с учетом клинических данных (supervised analysis) все же был выявлен ряд генов, по-разному экспрессирующихся при M-CLL и UM-CLL. Клиническое использование этого результата оказалось возможным, когда авторы сузили количество генов, с помощью которых удавалось дискриминировать подтипы В-ХЛЛ, до 1–3 [48]. По экспрессии гена *ZAP-70* (Zeta-associated protein 70) оказалось возможным определять прогноз с точностью до 90%. Таким образом, для того чтобы отличить M-CLL и UM-CLL, достаточно простого диагностического теста, основанного на количественной ПЦР, вместо сложного анализа профилей экспрессии с помощью микрочипов или анализа последовательности ДНК вариабельного региона Ig гена. Экспрессия гена *ZAP-70* коррелирует с мутационным статусом вариабельного региона Ig гена, но может также независимо определять течение заболевания и выживаемость у пациентов с В-ХЛЛ, являясь, таким обра-

зом, независимым суррогатным маркером [48, 49]. Было показано, что анализ экспрессии ZAP-70 может быть проведен на образцах периферической крови без предварительного выделения В-клеток [48]. Эти два исследования положили начало простому измерению экспрессии ZAP-70 — количественной ПЦР и проточной цитометрии. Таким образом, вывод, сделанный на основе анализа профилей генной экспрессии, уже нашел применение в прогнозировании клинического течения В-ХЛЛ [50].

Множественная миелома (ММ) является разновидностью В-клеточных злокачественных новообразований и возникает из плазматических клеток (ПК) крови. В норме эти клетки играют важную роль в иммунной системе человека. ММ характеризуется клональной экспансией ПК, неспособных выполнять защитные функции. Обычно это сопровождается повышенной выработкой моноклонального иммуноглобулина (парапротеина). Серьезным осложнением, резко ухудшающим прогноз, является выраженная инфильтрация костного мозга плазматическими клетками [51]. ММ все еще рассматривается как неизлечимое заболевание, для которого медиана выживаемости сохраняется на уровне 3 лет, несмотря на применение высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации костного мозга [52]. Молекулярные механизмы болезни связывают с активной экспрессией онкогенов, которые попадают под контроль промоторов генов иммуноглобулинов в результате хромосомных aberrаций. Имеются два основных момента, по которым ММ является подходящим объектом для анализа с помощью микрочипов. Во-первых, ММ является морфологически гомогенным, но клинически гетерогенным заболеванием, демонстрируя резкую разницу в выживаемости, которая может составлять от нескольких месяцев до 10 лет. Во-вторых, генетические аномалии при ММ сложны и разнообразны, так что установить корреляцию между этими аномалиями и клиническим исходом крайне затруднительно [53–55].

Первое исследование ММ с помощью микрочипов позволило сравнить экспрессию генов в ПК пациентов с ММ, моноклональной гаммопатией неустановленного значения (МГНЗ), в нормальных ПК от здоровых доноров и в клеточных линиях ММ. Были выделены 4 подгруппы больных с ММ (ММ1, ММ2, ММ3 и ММ4). Профиль экспрессии в подгруппе ММ1 был близок к нормальным ПК и ПК пациентов с МГНЗ, в то время как в подгруппе ММ4 соответствовал профилю экспрессии клеточных линий ММ. Подгруппа ММ4 характеризовалась также плохим прогнозом, аномальным кариотипом и высоким уровнем  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке крови. Среди генов с повышенным уровнем экспрессии в подгруппе ММ4 были выявлены гены *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3, рецептор 3 фактора роста фибробластов) и *CCND1* (Cyclin D1, циклин D1). Повышенная экспрессия этих генов была обусловлена транслокациями  $t(4;14)(p16;q32)$  или  $t(11;14)(q13;q32)$  соответственно. В конечном счете был определен набор генов, позволяющих различать клетки ММ и нормальные ПК, что стало существенным вкладом в понимание молекулярной и клеточной биологии ММ [56]. Стоит отметить возможные мишени при терапии, для которых была выявлена повышенная экспрессия: это гены *ABL* (abl-tyrosine kinase, abl-тирозинкиназа) и *CBS* (cystathionine beta synthase, цистатионин бета-синтаза) [57]. Так же как и при ДККЛ [10], экспрессия генов при ММ коррелирует с различными стадиями поздней дифферен-

цировки В-клеток в норме. Были выделены подгруппы ММ, которые, хотя и приблизительно, соответствовали по профилю экспрессии тонзиллярным В-клеткам, тонзиллярным ПК или костномозговым ПК [58, 59]. Наиболее интересные результаты с помощью микрочипов были получены при сравнении профилей экспрессии ПК больных ММ, имеющих и не имеющих заметного поражения костной ткани на момент постановки диагноза. Это позволило идентифицировать молекулярную составляющую остеолитического при ММ [60]. Из 10 000 генов, экспрессия которых была измерена в этом эксперименте, были выявлены только 4 гена, экспрессия которых заметно повышалась у больных ММ с поражением костной ткани. Только один ген из этих четырех, *DKK1*, кодирует секретируемый белок, который функционально связан с остеобластами и поэтому выбран для дальнейшего исследования. Действительно, в последующих экспериментах было подтверждено, что продукция *DKK1* клетками миеломы ассоциирована с возникновением очагов деструкции в костной ткани. Это открывает новые возможности для стратификации пациентов с ММ и поиска мишеней для дифференцированной терапии.

Обобщая эти многочисленные данные, можно сказать, что анализ профилей экспрессии генов при онкогематологических заболеваниях позволяет получить новую информацию о молекулярной природе опухоли. В практическом приложении это дает уточнение диагноза, выявление новых подтипов заболевания, предсказание ответа на терапию и клинического исхода. В конечном счете речь идет о создании принципиально новой классификации раковых заболеваний, которая позволит разрабатывать дифференцированную терапию, направленную на восстановление или нейтрализацию последствий молекулярного дефекта, вызвавшего болезнь. В одной из итоговых работ по результатам анализа образцов костного мозга 892 пациентов с различными клиническими вариантами лейкозов и 45 образцов здоровых доноров были выделены 13 подгрупп, включая пациентов с ОНЛЛ  $t(15;17)$ , ОНЛЛ  $t(8;21)$ , ОНЛЛ  $inv(16)$ , В-ХЛЛ, пре-В-ОЛЛ с  $t(11q23)$ , различными субвариантами Т-ОЛЛ и т.д. [61]. По мнению авторов, различные методы диагностики лейкозов могут быть полностью заменены таким универсальным диагностическим подходом на основе анализа экспрессии генов.

Однако продвижение по этому пути происходит не так быстро, как хотелось бы, и предполагает решение еще очень многих проблем. Исследование профиля экспрессии с помощью микрочипов, содержащих пробы на тысячи и десятки тысяч генов, является слишком дорогостоящим и трудоемким для внедрения в клиническую практику. Данные, получаемые с помощью таких микрочипов, зачастую противоречивы, поскольку при использовании коммерческих продуктов разных фирм результаты могут различаться. На конечный результат исследования в значительной степени могут влиять технические различия в изготовлении микрочипов, различия в протоколах приготовления «мишеней» для гибридизации, различные алгоритмы обработки данных и т.п. Вместе с тем для клинических целей зачастую нет необходимости в отслеживании экспрессионного профиля десятков тысяч генов, достаточно информативным оказывается анализ экспрессии нескольких десятков генов, который можно проводить с помощью более простых вариантов микрочипов. Необходима стандартизация исследований в этой области, а так-

же разработка недорогих и более простых в использовании подходов, которые будут доступны для каждой клинической лаборатории [62].

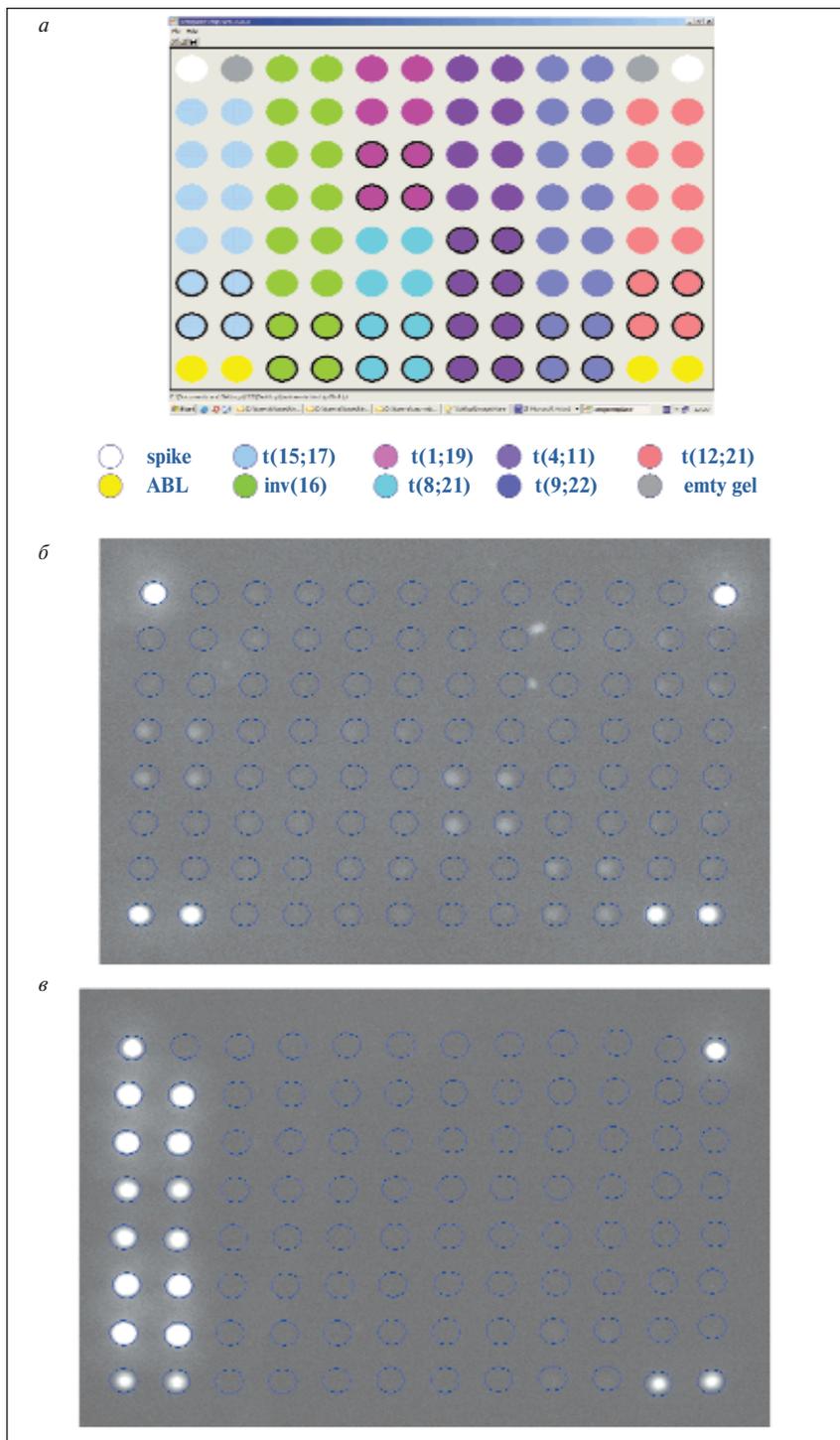
**Анализ хромосомных перестроек с помощью микрочипов**

Микрочипы являются удобным и эффективным инструментом для решения конкретных клинко-диагностических задач. Большое значение в современной диагностике лейкозов придается выявлению и идентификации хромосомных перестроек в бластных клетках. Специфические хромосомные aberrации, приводящие к образованию химерных, или «слившихся», генов (fusion genes), встречаются примерно в 50% случаев ОНЛЛ и 40% случаев ОЛЛ и являются диагностическими и прогностическими маркерами разных форм заболевания, требующих различных подходов к лечению [63–65].

Анализ хромосомных перестроек с помощью традиционных цитогенетических методов трудоемок и не всегда надежен. В последнее время широкое распространение получили методы выявления самих химерных транскриптов, которые экспрессируются в бластных клетках с перестроенных последовательностей. Такую возможность дает метод ОТ-ПЦР. Однако, поскольку для выявления каждого транскрипта требуется индивидуальная реакция ПЦР со специфическими праймерами, при анализе одного пациента на наличие сразу нескольких химерных транскриптов объем работы резко возрастает.

С целью упрощения и удешевления такого исследования, а также повышения специфичности анализа был разработан олигонуклеотидный микрочип, способный идентифицировать химерные транскрипты, соответствующие восьми наиболее клинически значимым транслокациям при лейкозах. Поскольку разрывы в генах при образовании транслокаций могут происходить в разных точках, одна и та же транслокация может давать начало нескольким вариантам химерных транскриптов. Набор специфических олигонуклеотидов позволяет определять 14 вариантов химерных транскриптов. На микрочипе размещены также олигонуклеотидные пробы для выявления нормального транскрипта гена *ABL*, экспрессирующегося во всех типах клеток. Определение *ABL*-транскрипта используется для контроля качества выде-

ленной РНК и оценки эффективности всей процедуры подготовки меченого образца. Процедура анализа включает выделение РНК из клеток костного мозга или периферической крови, проведение ОТ-ПЦР в мультиплексном варианте, когда в одной пробирке проходит одно-



**Рис. 3.** Микрочип для выявления и идентификации хромосомных транслокаций. а — схема микрочипа. Разными цветами отмечены наборы проб на различные транслокации, каждая проба представлена на микрочипе в 4-кратной повторности; б — пример гибридационной картины, образец без транслокаций. Светятся только контрольные ячейки сверху и ячейки, содержащие пробу на ген *ABL*; в — пример гибридационной картины, образец с транслокацией *t(15;17)*. Также светятся пробы, специфичные для химерного транскрипта *PML/RARA, t(15;17)*

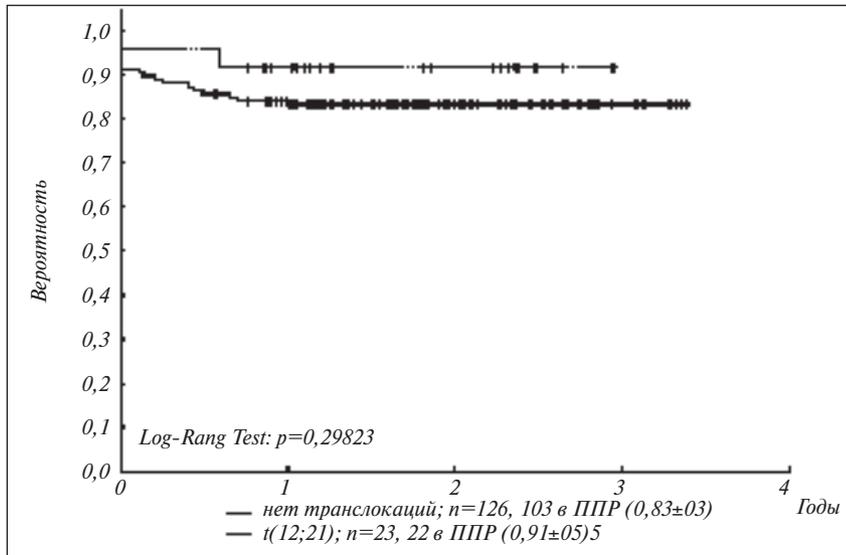


Рис. 4. Кривая бессобытийной выживаемости для пациентов с  $t(12;21)$  и без транслокаций. ППП — первичная полная ремиссия

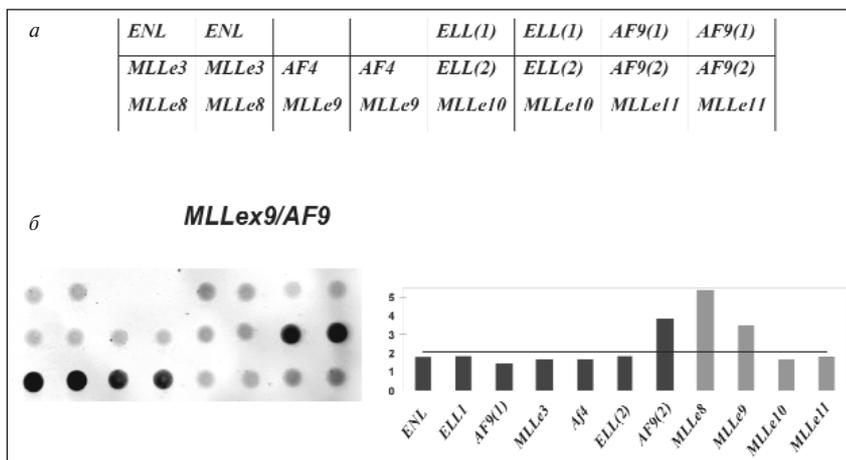


Рис. 5. Микрочип для анализа *MLL*-транслокаций.

а — схема микрочипа; б — пример определения транслокации  $t(9;11)$ . На гибридационной картине (слева) видны сигналы флуоресценции, на диаграмме (справа) представлены нормированные значения сигналов флуоресценции в различных ячейках микрочипа. Сигналы, превышающие пороговое значение (горизонтальная линия на диаграмме), являются специфичными и свидетельствуют о наличии химерного транскрипта *MLLex9/AF9*

временно несколько индивидуальных ПЦР с праймерами, специфичными для разных транслокаций, гибридизацию на микрочипе и анализ изображения с помощью портативного анализатора микрочипов. На рис. 3 приведены схема микрочипа и примеры гибридационных картин для различных случаев лейкозов. Компьютерная обработка флуоресцентных сигналов по разработанному алгоритму позволяет проводить автоматический анализ изображения. Чувствительность метода такова, что возможно обнаружение одной клетки с хромосомной перестройкой на 103 нормальные клетки, т.е. достаточна для выявления так называемой минимальной остаточной болезни. В целом достигнутая надежность выявления перестроек сравнима с таковой ОТ-ПЦР и существенно превышает надежность цитогенетических методов. С помощью разработанного микрочипа был проведен анализ образцов костного мозга 600 детей с острыми лейкозами. Полученные данные позволили определить частоту встречаемости различных транслокаций среди россий-

ских пациентов, а также оценить клиническое значение различных транслокаций (рис. 4) [66].

С клинической точки зрения также важными являются перестройки с участием гена *MLL* (*mixed lineage leukemia*). Ген *MLL* расположен в хромосоме 11, в регионе 11q23, который часто вовлекается в хромосомные перестройки при лейкозах с образованием химерных генов. Часть химерной последовательности с 5'-конца принадлежит гену *MLL*, а 3'-конец — одному из генов-партнеров, которых насчитывается более 30 [67, 68]. Такое разнообразие генных аномалий с участием *MLL* сильно затрудняет анализ с помощью стандартных методов диагностики. В то же время задача обнаружения и идентификации хромосомных перестроек региона 11q23 особенно актуальна, так как они встречаются в 70–80% случаев ОЛЛ и 50–60% случаев ОНЛЛ у детей первого года жизни.

Был разработан микрочип для анализа пяти транслокаций с участием гена *MLL*:  $t(4;11)$  *MLL/AF4*;  $t(9;11)$  *MLL/AF9*;  $t(11;19)$  *MLL/ELL*;  $t(11;19)$  *MLL/ENL*;  $dup(11)$  *MLL/MLL*. [69]. Принцип работы с *MLL*-микрочипом такой же, как для предыдущего варианта микрочипа на 8 транслокаций. Олигонуклеотидные пробы, расположенные в ячейках микрочипа, представляют собой участки последовательностей гена *MLL* и генов-партнеров, участвующих в транслокациях. При образовании транслокации ген *MLL* может претерпевать разрыв в различных местах (как правило, разрывы происходят после экзонов e8, e9, e10 и e11). Соответственно на схеме микрочипа в нижней строке рас-

положены олигонуклеотидные пробы, комплементарные участку в каждом из экзонов гена *MLL*. Таким образом, по картине гибридизации можно определить, какие экзоны гена *MLL* входят в состав химерного транскрипта, а также определить ген-партнер (рис. 5).

На долю Т-клеточных лимфом приходится 15–20% всех лимфоидных опухолей. Диагностика Т-клеточных опухолей традиционно основывалась на сочетании клинических данных, гистологического анализа и иммунофенотипирования. Однако во многих случаях этого оказывается недостаточно для постановки точного диагноза, и необходимо определение Т-клеточной клональности молекулярными методами. В основе этих методов лежит анализ перестроенных локусов Т-клеточных рецепторов в популяции Т-лимфоцитов. Был разработан микрочип для определения перестроек  $\gamma$ -цепи Т-клеточного рецептора. Микрочип содержит олигонуклеотидные зонды на все  $V\gamma$ - и  $J\gamma$ -гены, которые участвуют в перестройках  $\gamma$ -цепи Т-клеточного рецептора. Метод также включает мульти-

плексную ПЦР с последующей гибридизацией на микрочипе флуоресцентно меченной «мишени». Область слияния V—J-сегментов амплифицируется только в перестроенном локусе TCR $\gamma$ ; если  $\gamma$ -цепь не перестроена, то V- и J-гены удалены друг от друга на значительное расстояние, что делает амплификацию невозможной. При анализе поликлональной популяции T-лимфоцитов определяются сигналы практически от всех V $\gamma$ - и J $\gamma$ -генов (рис. 6, а). При преобладании в образце клеток, несущих в результате реарранжировки определенную комбинацию V—J-генов, с первых циклов ПЦР-реакции начинают нарабатываться однотипные фрагменты ДНК, что и выявляется в результате гибридизации на микрочипе (рис. 6, б). Таким образом можно определять наличие моноклональных T-клеток в клиническом образце [70].

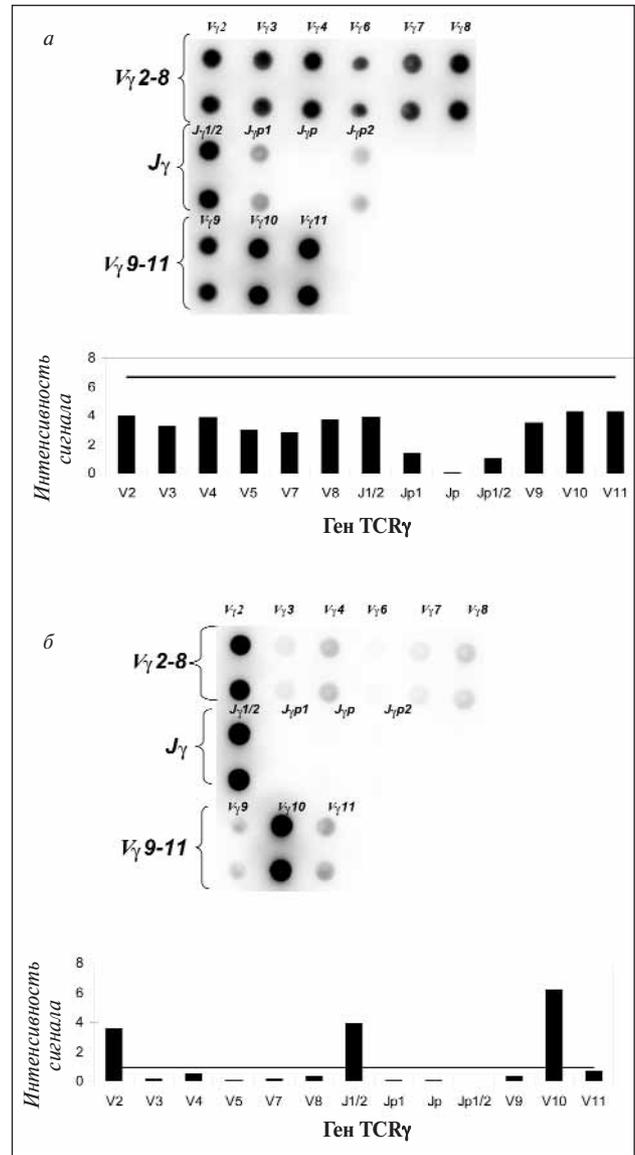
Преимуществами такого анализа на микрочипах являются простота использования, наглядность результата и значительное сокращение времени проведения анализа.

**Анализ полиморфизма в генах системы биотрансформации и фармакогенетика**

Успех в лечении онкогематологических заболеваний зависит в первую очередь от биологических свойств опухолевых клеток и чувствительности опухоли к химиотерапевтическим препаратам. Однако определенное значение имеют также характер и скорость метаболизма лекарственных средств в организме пациента. Ключевую роль в метаболизме лекарств играют ферменты системы биотрансформации, для которых характерен высокий уровень полиморфизма. Этот полиморфизм определяется однонуклеотидными заменами в генах, кодирующих соответствующие ферменты. Анализ полиморфных участков генов с помощью технологии биочипов дает важную информацию о способности организма пациента метаболизировать те или иные химиотерапевтические препараты. Эта информация может быть использована для индивидуализации терапии и корректировки дозы лекарства с тем, чтобы снизить его токсическое воздействие при лечении [71, 72].

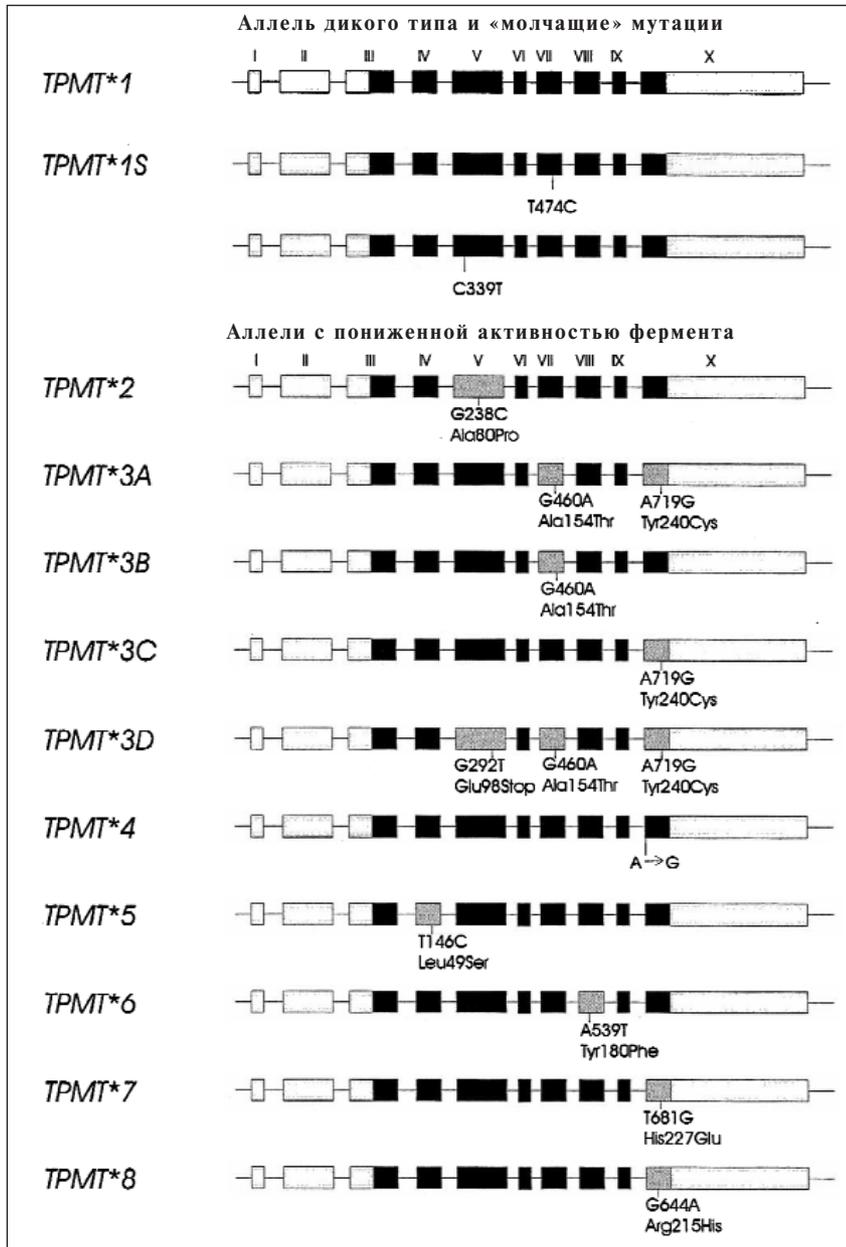
Одним из широко применяемых в терапии лейкозов препаратом является 6-меркаптопурин (6-МП), который используется в поддерживающей терапии ОЛЛ [73]. 6-МП, а также другие тиопуриновые препараты метаболизируются с участием тиопуридин-S-метилтрансферазы (ТРМТ) [74]. Активность ТРМТ наследуется по аутосомно-кодминантному типу и демонстрирует генетический полиморфизм: около 90% людей имеют высокую активность, около 10% — промежуточную активность вследствие гетерозиготности локуса гена *TPMT*, и 1 на 300 человек в популяции — низкую активность фермента (т.е. недостаточность ТРМТ), наследуя два мутантных аллеля ТРМТ [75] (рис. 7). Терапия 6-МП, 6-тиогуанином или азатиоприном в стандартных дозах у больных с недостаточностью ТРМТ приводит к развитию длительной глубокой миелосупрессии и вызывает тяжелые, нередко фатальные инфекционные осложнения [76, 77].

Был разработан *TPMT*-биочип для выявления наиболее распространенных мутаций в гене *TPMT*, приводящих к снижению активности фермента (рис. 8). Процесс генотипирования образцов ДНК пациентов включал выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, проведение мультиплексной ПЦР, гибридизацию



**Рис. 6.** Определение T-клеточной клоальности с помощью биочипа. а — поликлональный образец здорового донора: сверху — гибридационная картина, внизу — диаграмма распределения интенсивности флуоресцентного сигнала. Горизонтальная сплошная линия соответствует пороговому значению (ПЗ), ни один из сигналов не превышает ПЗ; б — образец больного с T-клеточной лимфомой. Вверху — гибридационная картина, полученная на биочипе, внизу — диаграмма распределения интенсивности флуоресцентного сигнала. Горизонтальная сплошная линия соответствует ПЗ. Сигналы от групп V $\gamma$  2, V $\gamma$  10, J $\gamma$  1/2 превышают ПЗ, что соответствует наличию биалельной клоальной реарранжировки V $\gamma$  2/J $\gamma$  1/2, V $\gamma$  10/J $\gamma$  1/2

с *TPMT*-микрочипом, регистрацию и обработку полученных результатов. Было проведено определение *TPMT*-генотипа у 280 пациентов с гемобластомами [78]. В обследованной группе больных 7,5% пациентов оказались гетерозиготными носителями мутации гена *TPMT*. Частота встречаемости и распределение мутантных аллелей гена *TPMT* в российской популяции пациентов с гемобластомами не отличались от таковой в популяции людей белой расы США и Европы [79]. Так, самым частым мутантным аллелем был *TPMT*\*3A (85,7%), более редкими аллелями *TPMT*\*3C (9,5%) и *TPMT*\*2 (4,8%). Также ретроспективно была оценена переносимость терапии

Рис. 7. Аллельные варианты гена *TPMT*

6-МП в зависимости от *TPMT*-генотипа. Оказалось, что больные ОЛЛ с гетерозиготным генотипом *TPMT* характеризовались сниженной способностью переносить терапию 6-МП и получали достоверно более низкие дозы препарата, чем пациенты с генотипом «дикого» типа (средняя доза 6-МП в неделю – 264 против 312 мг/м<sup>2</sup> соответственно;  $p = 0,04$ ). У пациентов с гетерозиготным генотипом *TPMT* в 2 раза чаще отменяли терапию 6-МП из-за гематологической токсичности, что нарушало сроки проведения консолидации. Гетерозиготные пациенты получали больше трансфузий эритроцитов и тромбоцитов, у них чаще развивались инфекционные осложнения. Это исследование показало, что почти у 10% детей с ОЛЛ в нашей стране имеется повышенный риск тиопуриновой токсичности вследствие наследственного дефицита *TPMT*. Проспективная диагностика мутаций гена *TPMT* у больных ОЛЛ позволяет осуществлять инди-

видуальный подход к лечению пациентов путем редукции дозы 6-МП с целью снижения токсичности и повышения эффективности терапии в рамках установленного протокола.

Генетический полиморфизм, определяемый однонуклеотидными заменами в последовательности ДНК, характерен и для других ферментов системы биотрансформации. Наиболее важными являются ферменты I фазы биотрансформации (это цитохромы семейства P450, такие как CYP1A1, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19), которые активируют ксенобиотики путем формирования генотоксичных промежуточных метаболитов, и ферменты II фазы (кроме *TPMT* к ним относятся глутатион-S-трансферазы, ариламин-N-ацетилтрансферазы и др.), которые осуществляют превращение генотоксичных соединений в нетоксичные [80]. Различные полиморфные варианты ферментов, обладающие пониженной или повышенной активностью, потенциально способны модулировать ответ на терапию различными антираковыми препаратами. Это может выражаться не только в повышении токсичности лечения, но и в формировании лекарственной устойчивости или склонности к возникновению рецидивов и вторичных опухолей [81]. Был разработан биочип для анализа полиморфизма в 10 генах системы биотрансформации (рис. 9) [82]. С помощью этого биочипа был протестирован 351 образец ДНК детей, больных острыми лейкозами. Для гена *CYP1A1* были выявлены распространенные сочетания аллельных вариантов \*1/\*1, \*1/\*2A, \*1/\*2B и \*1/\*4. Были определены частоты распределения *CYP1A1* генотипов у пациентов с первично диагностированным лейкозом и в рецидиве заболевания. Оказалось, что среди пациентов с рецидивом ОЛЛ или ОМЛ чаще встречаются гетерозиготы по \*2A аллели гена *CYP1A1*, чем в группе пациентов с первично диагностированным острым лейкозом (16,5 и 10% для пациентов с ОЛЛ и 19 и 10% для пациентов с ОМЛ соответственно). При этом у девочек с рецидивом острого лейкоза выявлено статистически достоверное увеличение частоты гетерозигот по \*2A аллели гена *CYP1A1* – более чем в 3 раза по сравнению с девочками с первично диагностированным лейкозом (относительный риск – ОР – 3,2,  $p < 0,05$ ) [83]. Выявленные закономерности согласуются с данными других авторов [84, 85]. Так, в работе М. Крајиновић и соавт. [85] было обнаружено, что наличие полиморфного варианта *CYP1A1\*2A* ассоциировано с плохим терапевтическим прогнозом у детей, больных ОЛЛ (ОР 3,1,  $p < 0,05$ ).

В целом эти результаты указывают на то, что дальнейший прогресс в лечении онкологических заболеваний должен идти по пути индивидуализации терапии с учетом генетических характеристик пациента.

**Заключение**

Развитие технологии микрочипов существенно расширило область молекулярных исследований до анализа целого генома и транскриптома (совокупность всех транскриптов в клетке). Технология микрочипов используется для расшифровки сложных механизмов возникновения злокачественных новообразований, в том числе онкогематологических заболеваний. Применение микрочипов в комбинации с другими подходами должно, наконец, привести к созданию направленной дифференцированной терапии при раковых заболеваниях с учетом индивидуальных особенностей каждого пациента.

В практическом отношении применение микрочипов уже сегодня позволяет решать следующие задачи:

- точная постановка диагноза, выявление новых подтипов заболевания, уточнение классификации;
- прогнозирование течения болезни и клинического исхода, выявление генов и сигнальных путей, вовлеченных в патогенез онкогематологических заболеваний, поиск новых мишеней для направленной дифференцированной терапии;
- разработка и создание более простых и дешевых диагностических тестов, в том числе и на основе технологии микрочипов (микрочипы, содержащие пробы на десятки или сотни генов вместо десятков и сотен тысяч);
- включение микрочипов в проспективные клинические исследования, подтверждение результатов анализа на микрочипах для внесения в клинические протоколы лечения, дизайн клинических протоколов с учетом новых данных о природе заболеваний, полученных с помощью технологии микрочипов.

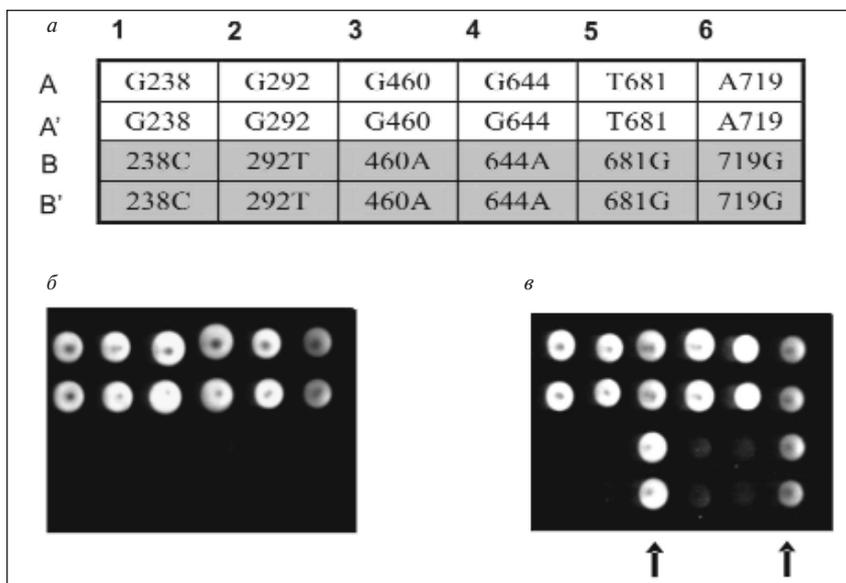


Рис. 8. TRMT-микрочип.

a — схема микрочипа, все пробы продублированы. В двух верхних рядах содержатся олигонуклеотидные пробы, комплементарные последовательностям «дикого типа», в двух нижних — соответствующие им мутантные последовательности; б и в — примеры гибридизационных картин: б — генотип «дикого типа» \*1/\*1, в — гетерозигота по двум позициям в гене TRMT, генотип \*1/\*3A, стрелками отмечены выявленные мутации 460A и 719G

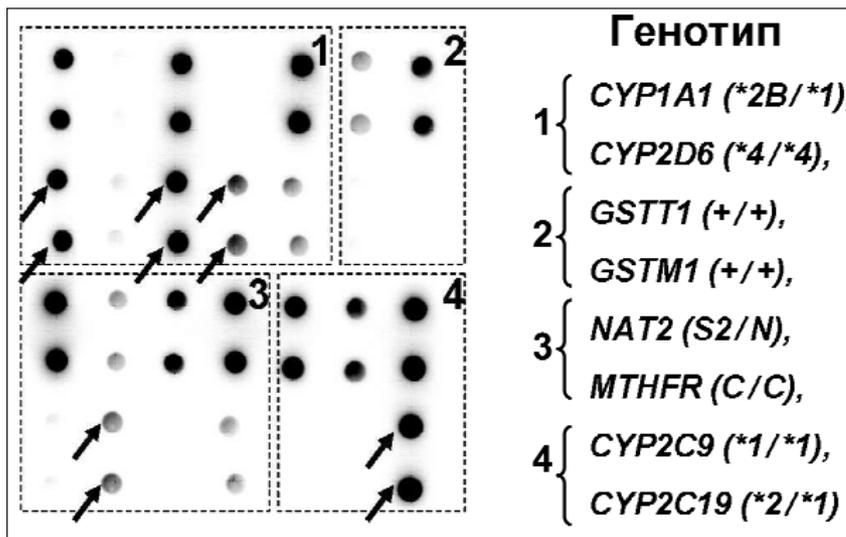


Рис. 9. Пример гибридизационной картины, полученной на биочипе для анализа полиморфизма в генах CYP1A1, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, CYP2C9, CYP2C19 и NAT2. Стрелками указаны обнаруженные «мутантные» варианты

**Л и т е р а т у р а**

1. Колчинский А.М., Грядунов Д.А., Лысов Ю.П. и др. Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы. Мол биол — 2004; 38(1):5–16.  
 2. Blohm D.H., Guiseppe-Elie A. New developments in microarray technology. Curr Opin Biotechnol 2001; 12:41–7.  
 3. Lockhart D.J., Winzeler E.A.

Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature 2000; 405: 827–36.  
 4. van Berkum N.L., Holstege F.C. DNA microarrays: raising the profile. Curr Opin Biotechnol 2001; 12: 48–52.  
 5. Hughes T.R., Shoemaker D.D. DNA microarrays for expression profiling. Curr Opin Chem Biol 2001; 5: 21–5.  
 6. Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P. et

al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286: 531–7.  
 7. Alizadeh A., Eisen M., Davis R.E. et al. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. Cold Spring Harb

- Symp Quant Biol 1999, 64: 71–8.
8. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–11.
  9. Shipp M.A., Ross K.N., Tamayo P. et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68–74.
  10. Rosenwald A., Wright G., Chan W.C. et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 2002; 346: 1937–47.
  11. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A. et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Engl J Med* 2004; 350: 1828–37.
  12. Glas A.M., Kersten M.J., Delahaye L.J. et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 2005; 105(1): 301–7.
  13. Hofmann W.K., de Vos S., Tsukasaki K. et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 2001; 98: 787–94.
  14. Martinez N., Camacho F.I., Algara P. et al. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res* 2003; 63: 8226–32.
  15. Pui C.H., Evans W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 1998; 339: 605–15.
  16. Moos P.J., Raetz E.A., Carlson M.A. et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8(10): 3118–30.
  17. Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30: 41–7.
  18. Rozovskaia T., Ravid-Amir O., Tillib S. et al. Expression profiles of acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias with ALL-1 rearrangements. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(13): 7853–8.
  19. Tsutsumi S., Taketani T., Nishimura K. et al. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res* 2003; 63: 4882–7.
  20. Kohlmann A., Schoch C., Dugas M. et al. New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia* 2005; 19(6): 953–64.
  21. Armstrong S.A., Kung A.L., Mabon M.E. et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 2003; 3(2): 173–83.
  22. Brown P., Levis M., McIntyre E. et al. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 2006; 20(8):1368–76.
  23. Yeoh E.J., Ross M.E., Shurtleff S.A. et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1: 133–43.
  24. Ross M.E., Zhou X., Song G. et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003; 102: 2951–9.
  25. Kohlmann A., Schoch C., Schnittger S. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* 2004; 18: 63–71.
  26. Ferrando A.A., Look A.T. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2003; 40: 274–80.
  27. Ferrando A.A., Neuberg D.S., Staunton J. et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75–87.
  28. Ballerini P., Blaise A., Busson-Le Coniat M. et al. HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 2002; 100: 991–7.
  29. Ferrando A.A., Neuberg D.S., Dodge R.K. et al. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2004; 363: 535–6.
  30. Chiaretti S., Li X., Gentleman R. et al. Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood* 2004; 103: 2771–8.
  31. Ravandi F., Kantarjian H., Giles F., Cortes J. New agents in acute myeloid leukemia and other myeloid disorders. *Cancer* 2004; 100: 441–54.
  32. Look A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059–64.
  33. Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92: 2322–33.
  34. Schoch C., Kohlmann A., Schnittger S. et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10008–13.
  35. Debernardi S., Lillington D.M., Chaplin T. et al. Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 149–58.
  36. Yagi T., Morimoto A., Eguchi M. et al. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 2003; 102: 1849–56.
  37. Valk P.J., Verhaak R.G., Beijnen M.A. et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2004; 350: 1617–28.
  38. Bullinger L., Dohner K., Bair E. et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2004; 350: 1605–16.
  39. Park D.J., Vuong P.T., de Vos S. et al. Comparative analysis of genes regulated by PML/RAR alpha and PLZF/RAR alpha in response to retinoic acid using oligonucleotide arrays. *Blood* 2003; 102: 3727–36.
  40. Rozman C., Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 1995; 333: 1052–7.
  41. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219–34.
  42. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198–206.
  43. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A. et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854.
  44. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A. et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625–38.
  45. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G. et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639–47.
  46. Jelinek D.F., Tschumper R.C., Stolovitzky G.A. et al. Identification of a global gene expression signature of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 346–61.
  47. Wang J., Coombes K.R., Highsmith W.E. et al. Differences in gene expression between B-cell chronic lymphocytic leukemia and normal B cells: a meta-analysis of three microarray studies. *Bioinformatics* 2004; 20: 3166–78.
  48. Crespo M., Bosch F., Villamor N. et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 2003; 348: 1764–75.
  49. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S.

- et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944–51.
50. Bosch F., Muntanola A., Gine E. et al. Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70B(4): 214–7.
51. Kuehl W.M., Bergsagel P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 175–87.
52. Kaufman J., Lonial S. Multiple myeloma: the role of transplant and novel treatment strategies. *Semin Oncol* 2004; 31: 99–105.
53. Bergsagel P.L., Kuehl W.M. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev* 2003; 194: 96–104.
54. Sawyer J.R., Waldron J.A., Jagannath S., Barlogie B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82:41–9.
55. Dewald G.W., Kyle R.A., Hicks G.A., Greipp P.R. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985; 66: 380–90.
56. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B. et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; 99: 1745–57.
57. Claudio J.O., Masih-Khan E., Tang H. et al. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100: 2175–86.
58. De Vos J., Thykjaer T., Tarte K. et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002; 21: 6848–57.
59. Zhan F., Tian E., Bumm K. et al. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood* 2003; 101: 1128–40.
60. Tian E., Zhan F., Walker R. et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *New Engl J Med* 2003; 349: 2483–94.
61. Haferlach T., Kohlmann A., Schnittger S. et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 2005; 106(4): 1189–98.
62. Staal F., Cario G., Cazzaniga G. et al., Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia* 2006; 20(8): 1385–92.
63. Pui C.H., Campana D., Evans W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2001; 2: 597–607.
64. Shrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol* 2004; 83 (Suppl 1): 121–3.
65. Pui C.H., Relling M.V., Sandlund J.T. et al. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2004; 83 (Suppl 1): 124–6.
66. Исаева Е.А., Жаринов В.С., Наседкина Т.В. и др. Анализ хромосомных aberrаций и их прогностическое значение при остром лимфобластном лейкозе у детей. *Вопр гематол онкол иммунопатол педиатр* 2003; 2 (4): 59–66.
67. Rabbits T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143–9.
68. Rubnitz J.E., Look A.T. Molecular basis of leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 1998;5: 264–70.
69. Митяева О.Н., Наседкина Т.В., Жаринов В.С. и др. Анализ хромосомных транслокаций с участием гена MLL методом гибридизации с олигонуклеотидными микрочипами. *Мол биол* 2004; 38(3): 376–82.
70. Gra O.A., Sidorova J.V., Nikitin E.A. et al. Analysis of TCR gamma gene rearrangements using oligonucleotide microchip: a novel approach for the determination of T-cell clonality. (in press).
71. Nebert D.W. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997; 60: 265–71.
72. Nebert D.W., McKinnon R.A., Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273–80.
73. Elion G.B. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244: 441–7.
74. Weinshilboum R.M., Sladek S.L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 651–62.
75. McLeod H.L., Lin J.S., Scott M.C. et al. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55: 15–20.
76. Roberts W.M., Estrov Z., Kitchingam G.R. et al. The clinical significance of residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia as detected by polymerase chain reaction amplification of antigen-receptor gene sequences. *Leuk Lymphoma* 1996; 20: 181–97.
77. Krynetski E.Y., Evans E.E. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* 1999, 16(3): 342–9.
78. Чупова Н.В., Самочатов Е.В., Руднева А.Е. и др. Генетический полиморфизм ТПМТ в лечении детей с острым лимфобластным лейкозом. *Гематол трансфузиол* 2005; 6: 3–9.
79. McLeod H.L., Coulthard S., Thomas A.E. et al. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1999, 105: 696–00.
80. Balta G., Yuksek N., Ozyurek E. et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003; 73: 154–60.
81. Celander M., Weisbrod R., Stegeman J.J. Glucocorticoid potentiation of cytochrome P4501A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in porcine and human endothelial cells in culture *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232(3): 749–53.
82. Плотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э. и др. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. *Молекуляр биол* 2005; 39: 403–12.
83. Гра О.А., Плотов А.С., Кожебаева Ж.М. и др. Опыт использования биочипов для анализа полиморфных вариантов гена CYP1A1 при лейкозах у детей. *Мед генет* 2006; 4: 34–8.
84. Krajinovic M., Labuda D., Richer C. et al. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999; 93(5): 1496–501.
85. Krajinovic M., Labuda D., Mathonnet G. et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 802–10.

# СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ НА МАТЕРИАЛЕ ТРЕПАНОБИОПТАТА

Е.В. Чигринова, А.И. Павловская  
 ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**В**овлечение костного мозга (КМ) при периферических неходжкинских лимфомах (НХЛ) является одной из закономерных фаз течения данной группы заболеваний. Основные показания для исследования КМ при НХЛ можно сформулировать следующим образом:

- установление стадии при первичном диагнозе лимфомы;
- оценка динамики процесса на фоне лечения;
- оценка качества полученной ремиссии;
- контроль полноты ремиссии;
- оценка клеточности КМ.

Костномозговая инвазия НХЛ может быть установлена на разных диагностических уровнях, от световой микроскопии до молекулярно-биологических тестов. Для всех типов исследований имеются как достаточно четкие критерии идентификации неопластической лимфоидной популяции, так и объективные ограничения возможностей.

Как известно, существуют два основных типа исследуемого материала КМ — аспират (нативная клеточная взвесь) и трепанобиоптат (остеомедулярный цилиндр). Аспират костного мозга представляет собой клеточную взвесь, позволяющую давать качественно-количественную цитологическую характеристику элементов гемопоэза, а также исследовать иммунофенотип любых нормальных и патологических клеточных субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии (ПЦ). Целью трепанобиопсии является комплексное морфологическое исследование, позволяющее помимо собственно гемопоэтической получить информацию о состоянии костной и стромальной тканей.

Задачей данной публикации стала попытка доступного изложения сути современных методов исследования КМ на уровне трепанобиоптата.

Трепанобиопсия позволяет наиболее полно оценить строение КМ (наличие или отсутствие в нем лимфоидной инфильтрации, характер ее распределения в КМ, и в частности, расположение лимфоидного инфильтрата по отношению к балкам пластинчатой кости), а также состояние гемопоэза в целом, соотношение жировой и кроветворной тканей, клеточность последней, дать характеристику стромы КМ и костных балок, в частности, распределение и степень выраженности ретикулиновых и коллагеновых волокон, активность остеобластов и остеокластов, ширину межбалочных полостей и т.д.

При отсутствии или технической недоступности экстрамедулярного очага лимфомного поражения, отсутствии патологического лимфоцитоза в аспирате КМ трепанобиоптат КМ может стать единственным источником диагностического материала. К причинам, приводящим к отсутствию лимфомных клеток в аспирате, можно отнести крайне малую численность клеток лейкоэмического клона,

выраженность склеротических изменений в лимфомных очагах, а также экспрессию лимфомными клетками молекул адгезии (МА), которые, с одной стороны, при диссеминации обеспечивают тропность к гемопоэтической ткани и строме КМ, а с другой — определяют прочность межклеточных и клеточно-стромальных контактов [1]. Адгезины, обеспечивающие подобные интратканевые взаимодействия, относятся к трем суперсемействам: иммуноглобулинов — ICAM-1, CD54, интегринов —  $\alpha$ L(CD11a/LFA-1a),  $\alpha$ X(CD11c),  $\alpha$ 4(CD49d/VLA-4),  $\beta$ 1(CD29),  $\beta$ 2(CD18),  $\beta$ 3; а также селектинов — L- селектин (CD62L), P-селектин (CD62P). Безусловно, это далеко не весь список МА, которые могут определять тип диссеминации НХЛ с органоспецифичной тропностью. Однако в литературе последних лет экспрессия именно этих типов МА ассоциируется с вовлечением КМ и особенностями архитектоники лимфомных очагов в нем [2]. P.J. Lucio и соавт. [3] описали взаимосвязь экспрессии CD11a, CD11c, CD18, CD29, CD44, CD49d, CD54, CD62L с нозологическим вариантом НХЛ и агрессивностью течения. Одним из интересных выводов их работы стало предположение о возможности классификации НХЛ вообще, а также отдельных подтипов внутри каждой нозологии в соответствии с иммунологическим профилем экспрессии МА. E. Horst и соавт. [4] приводят сравнительную оценку уровня экспрессии молекулы CD44 при нормальной В- и Т-дифференцировке и разных стадиях НХЛ. По их данным, экспрессия CD44 соответствует лимфомам с высоким риском лейкоэмизации, а степень экспрессии этой молекулы увеличивается при прогрессии НХЛ. M.K. Angelopoulou и соавт. [5] также приводят характеристику иммунологического профиля экспрессии МА при разных НХЛ, выделяя CD44 и CD56 как основные факторы риска для поражения КМ при НХЛ.

Таким образом, существуют факторы, которые, с одной стороны, способствуют лейкоэмизации НХЛ, а с другой — могут быть препятствием для попадания лимфомных клеток в материал аспирата КМ. При данных обстоятельствах трепанобиоптат КМ может быть единственным объектом КМ для исследования лейкоэмического субстрата.

Установлено, что с большей частотой костный мозг поражается при В-клеточных лимфомах низкой степени злокачественности [6], к которым в соответствии с классификацией опухоли гематопоэтической и лимфоидной тканей ВОЗ [7] относят лимфомы из зрелого вида мелких клеток:

- лимфому из малых лимфоцитов/В-клеточный хронический лимфолейкоз;
- лимфому из клеток мантии;
- нодальный вариант лимфомы маргинальной зоны;
- экстранодальный MALT-типа и маргинальной зоны селезенки;
- фолликулярную лимфому;
- лимфоплазмочитарную лимфому.

**Морфологический анализ**

Результативность исследования трепанобиоптата во многом зависит от адекватности биоптата. Последний, по мнению ряда исследователей, должен быть длиной от 2 до 3 см (по крайней мере, не менее 1,5 см) и содержать как минимум 5 или 6 межбалочных полостей [8, 9]. Это связано с тем, что клеточность КМ может быть разной в разных межбалочных полостях. Ее нельзя оценить достоверно по небольшому фрагменту КМ, тем более в тех случаях, когда материал представлен субкортикальной зоной, т.е. зоной, расположенной под кортикальной костью. Эта зона, как правило, малоклеточная, особенно у лиц пожилого возраста. Кроме того, чем больше межбалочных полостей присутствует в биоптате, тем выше вероятность обнаружения очагового поражения КМ.

Успешность исследования трепанобиоптата, вне всякого сомнения, зависит также от адекватности всех этапов его обработки: фиксации, декальцинации, заливки и изготовления гистологических срезов.

В последние годы предпринимаются попытки методического усовершенствования каждого из этапов обработки КМ, что продиктовано в первую очередь широким внедрением в диагностический процесс методик иммуногистохимического исследования, в частности, с целью определения характера и природы лимфоидной инфильтрации в КМ. Например, предложены методы заливки биоптата в метакрилатные смолы без предварительной декальцинации [10, 11]. Однако одновременно подчеркивается, что эти методы слишком дороги и трудоемки, а хороших результатов, включая и иммуногистохимическое исследование, можно добиться при точном соблюдении всех правил и требований стандартного гистологического метода [11].

Основными показаниями к проведению трепанобиопсии КМ являются:

- подозрение на лимфому;
- установление гистотипа лимфомы;
- определение стадии опухолевого поражения на всех этапах лечебно-диагностического процесса;
- контроль результатов лечения с целью выявления ремиссии, частичной ремиссии, рецидива опухоли и т.д.

Выявление лимфоидной инфильтрации в КМ не является тождественным его лимфомному поражению. В КМ в норме присутствуют лимфоидные клетки, которые могут составлять до 15–20% всей популяции ядродержащих клеток КМ. Это зрелые клетки и клетки-предшественники Т- и В-лимфоидных линий. Среди зрелых клеток более многочисленны Т-лимфоциты, среди клеток-предшественников преобладают В-линейные клетки. Лимфоидные клетки могут быть расположены интерстициально, между элементами гемопоэза, а могут иметь вид небольших скоплений – лимфоидных узелков. Увеличение числа лимфоидных клеток может быть как абсолютным, так и от-

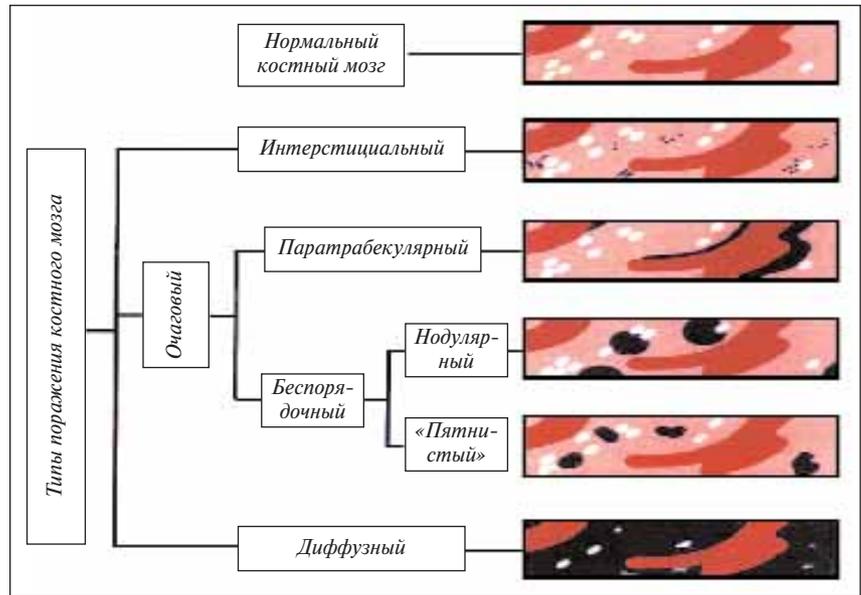


Рис. 1. Схематическое изображение типов поражения КМ при НХЛ [8]

носительным вследствие сокращения гемопоэза, например, при гипопластических состояниях. Доброкачественные лимфоидные узелки могут быть обнаружены в любом КМ, хотя чаще их находят у лиц пожилого возраста, у женщин, при некоторых гематологических и негематологических заболеваниях, например, при ревматоидных заболеваниях [8], в случаях цитомегаловирусной инфекции, при токсоплазмозе, инфекционном мононуклеозе и других инфекциях, при посттрансфузионном синдроме [12–14] и т.д.

Описаны 4 типа доброкачественных лимфоидных узелков [15, 16]: первый – с зародышевым центром; второй – с четкими границами; третий – с неправильными неровными очертаниями; четвертый – в виде небольших скоплений лимфоидных клеток.

В их составе, помимо лимфоидных клеток, обычно находят плазматические клетки, гистиоциты, капилляры, иногда эозинофилы и тучные клетки, а также нежную ретикулиновую сеть. Они могут быть множественными, расположены, как правило, межтрабекулярно.

Выявление даже минимальной лимфомной инфильтрации, как известно, является показателем генерализации опухоли и, следовательно, может иметь значение для прогноза и планирования терапии [17]. Поэтому вопросы выяснения природы лимфоидной инфильтрации, дифференциальной диагностики между лимфоидной инфильтрацией доброкачественного характера и лимфомным поражением КМ являются предельно важными, но при этом и одними из самых сложных и не всегда решаются только методом гистологического исследования, а требуют применения иммуногистохимического, молекулярно-биологического, генетического методов.

Основными гистологическими критериями, используемыми для дифференциальной диагностики лимфомного поражения КМ и доброкачественной лимфоидной инфильтрации, а также для субклассифицирования лимфомы в КМ, являются, во-первых, топографические особенности лимфоидной инфильтрации и, во-вторых, морфологические (ядерно-цитоплазматические) характеристики клеток инфильтрата.

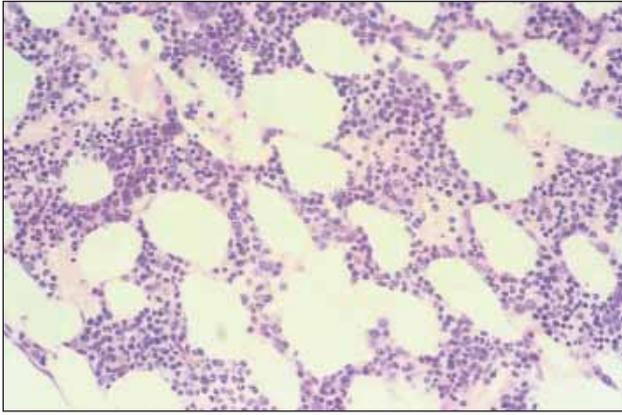


Рис. 2. Интерстициальный тип поражения при В-ХЛЛ. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 250

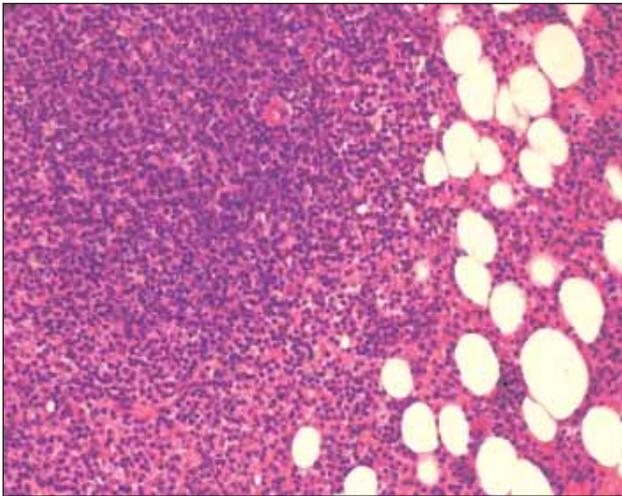


Рис. 4. Очаговое поражение КМ при лимфоме маргинальной зоны. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200

Выделяют 3 основных типа локализации опухолевой лимфоидной инфильтрации в костном мозге: интерстициальный, очаговый и диффузный [8] (рис. 1).

При **интерстициальном** типе лимфоидные клетки расположены между клетками КМ без нарушения его нормальной архитектуры и гематопоза (рис. 2).

При **диффузном** типе отмечается массивная лимфоидная инфильтрация, заполняющая все или почти все меж trabecularное пространство с резким сокращением или полным замещением жировой и гематопоетической тканей.

**Очаговый** тип лимфоидной инфильтрации характеризуется наличием очагов, чаще всего множественных. Очаги могут располагаться меж trabecularно и/или паратrabecularно.

**Паратrabecularная** локализация может иметь вид пласта лимфоидных клеток разной ширины и длины, плотно примыкающего к trabecule, с явлениями стромального склероза или очага, лежащего на костной trabecule своим широким основанием (рис. 3).

Очаги опухолевой лимфоидной инфильтрации могут располагаться в центральных отделах меж trabecularной полости, т.е. меж trabecularно. Они могут иметь вид узелка (рис. 4) с центром (чаще — без него) размножения или очага с неправильными, плохо контурируемыми границами.

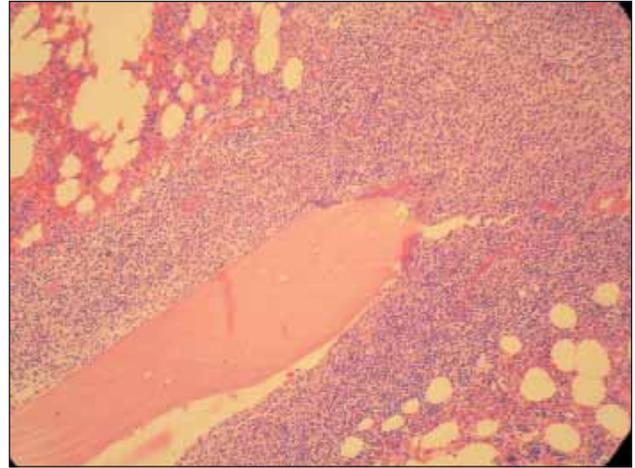


Рис. 3. Паратrabecularный рост опухолевого инфильтрата при фолликулярной лимфоме. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200

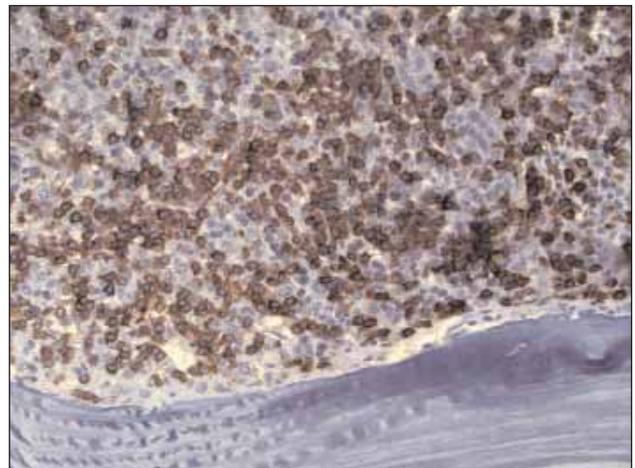


Рис. 5. Интрасинусоидальная локализация опухолевых лимфоцитов. Иммуногистохимия, окраска на CD20

Очаг крупного размера может прилежать на небольшом протяжении к trabecule, но такого типа локализация лимфомного очага не является паратrabecularной.

Разновидностью интерстициального типа инфильтрации является интрасинусоидальная локализация опухолевых клеток (рис. 5) [8, 18].

Описан еще один тип лимфомной инфильтрации КМ — моноклеточная дисперсия с присутствием отдельных лимфомных клеток среди элементов гемопоэза в качестве минимально выраженного интерстициального типа.

Имеют место сочетания разных типов локализации лимфоидной инфильтрации, составляющие смешанный тип. Например, интерстициально-диффузный, интерстициально-нодулярный, интерстициально-интрасинусоидальный [8, 11].

С учетом топографии лимфомной инфильтрации, морфологических (ядерно-цитоплазматических) характеристик опухолевых клеток и присутствия или отсутствия признаков миелофиброза в зонах поражения разработан алгоритм субклассифицирования лимфом в КМ.

Наличие только паратrabecularной лимфомной инфильтрации позволяет без всякого сомнения говорить о фолликулярной лимфоме. Для фолликулярной лимфомы характерен также смешанный тип инфильтрации, включающий меж trabecularные очаги, но с непременно-

ным присутствием при этом и паратрабекулярной локализации. Очень редким является интерстициальный характер роста лимфомных клеток, почти не встречается диффузный тип. Инфильтраты состоят преимущественно из клеток, похожих на центроциты разного размера, с единичными клетками типа центробластов. Преобладающим по клеточному составу в КМ является тип 1 фолликулярной лимфомы. Нередко картина фолликулярной лимфомы в лимфатическом узле не совпадает по клеточному составу с картиной, наблюдаемой в КМ. Это явление получило название дискордантности. Характерной чертой фолликулярной лимфомы в КМ служит миелофиброз, наблюдаемый в зонах лимфомного поражения без признаков нарушения нормальной архитектуры КМ.

Небольшие фокусы паратрабекулярной инфильтрации могут встречаться при лимфоме зоны мантии и лимфоцитоплазматической лимфоме, но позволяют исключить лимфому из малых лимфоцитов/В-хронический лимфолейкоз.

Для лимфомы зоны мантии типичными являются интерстициальный и очаговый межтрабекулярный типы роста лимфомных клеток [19]. Последние представляют собой смесь однотипных клеток небольшого и среднего размера с неправильными очертаниями ядерной мембраны. Иногда клетки имеют центроцитоидную морфологию, что может усиливать сходство с фолликулярной лимфомой. Однако крупные клетки со строением центробластов или иммунобластов не встречаются. Возможно присутствие гистиоцитов со светлой цитоплазмой без признаков фагоцитоза. Миелофиброз не характерен.

Для лимфоцитоплазматической лимфомы типичными являются интерстициальный, очаговый межтрабекулярный и диффузный типы роста опухолевых клеток. Паратрабекулярная локализация встречается, но крайне редко [18]. Диагностика лимфоцитоплазматической лимфомы на основании только локализации лимфомного инфильтрата невозможна. Решающую роль играет детальная характеристика клеточного состава, который представлен клетками типа малых лимфоцитов, плазматическими и лимфоцитоплазматическими клетками, а также небольшим числом иммунобластов, плазмобластов. Частым является миелофиброз, очаговый или диффузный, без нарушения нормальной архитектуры [14].

При интерстициальном и/или диффузном типе инфильтрации с или без формирования очагов, в первую очередь возникает подозрение на лимфому из малых лимфоцитов/В-клеточный хронический лимфолейкоз. Наличие псевдофолликулов в случаях преимущественно диффузного типа роста опухоли, особенности клеточного состава инфильтрата (малые лимфоциты с округлым ядром, комковатым хроматином) позволяют подтвердить предполагаемый гистотип лимфомы.

Миелофиброз для лимфомы из малых лимфоцитов/В-хронического лимфолейкоза не характерен.

Лимфома маргинальной зоны селезенки с циркулирующими виллезными лимфоцитами или без характеризуется очаговой межтрабекулярной или диффузной инфильтрацией опухолевыми клетками КМ. Характерной считают локализацию лимфомных клеток внутри синусов костного мозга [20–22]. Этот тип инфильтрации может встречаться при других вариантах лимфом [18], но в случаях его преобладания диагноз лимфомы маргинальной зоны селезенки можно ставить с большой долей вероятности. Лимфома маргинальной зоны нодального и

экстранодального MALT-типа редко вовлекает КМ, но в случаях его поражения имеет место интерстициально-очаговый тип инфильтрации. Очаги крупного размера могут касаться костных трабекул, некоторые из очагов могут быть похожи на лимфоидные фолликулы, иметь центры размножения и широкую маргинальную зону, состоящую из клеток с моноцитоидной морфологией. В клеточном составе присутствуют лимфоидные клетки небольшого и среднего размера с округлыми ядрами, умеренной ширины светлой цитоплазмой, а также разное число плазматических клеток, небольшое количество активированных лимфоидных клеток.

Агрессивным вариантам периферических неходжкинских В-клеточных лимфом – диффузной крупноклеточной лимфоме и лимфоме Беркитта – свойствен главным образом диффузный тип роста опухолевых клеток в КМ.

Поражение КМ при периферических Т-клеточных лимфомах встречается реже, чем при периферических В-клеточных [23]. Гистотипами периферических Т-клеточных лимфом являются:

- неспецифицированная;
- ангиоиммунобластная;
- анапластическая крупноклеточная и кожная

Т-клеточная лимфома.

Частота поражения КМ при периферических Т-клеточных лимфомах весьма вариабельна, так же как и типы локализации лимфомного субстрата.

К особенностям периферических Т-клеточных лимфом относят их способность вызывать выраженные вторичные изменения в виде сосудистой пролиферации, гранулематозной реакции, эозинофилии, миелофиброза и т.д.

Одной из важных проблем при верификации поражения КМ периферическими Т-клеточными лимфомами является дифференциальная диагностика с Т-клеточными пролифератами реактивной природы, которые встречаются при опухолевых заболеваниях, например, мелкоклеточных В-клеточных опухолях, классической лимфоме Ходжкина, нодулярном лимфоидном преобладании лимфомы Ходжкина, миелодиспластических синдромах, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме, богатой Т-клетками и/или гистиоцитами, а также при неопухолевых состояниях: аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит и полимиалгия, ряде вирусных и бактериальных инфекций и т.д. [23].

Интерпретация гистологической информации не всегда бывает простой, и правильный диагноз на основании только гистологического исследования в большинстве случаев невозможен. Требуется тесное сотрудничество между гистопатологом и гематологом, широкое применение дополнительных методов исследования, таких как иммунофенотипирование, а в ряде случаев – молекулярно-биологического и генетического анализа.

#### **Иммунофенотипирование**

Трепанобиоптат КМ (остеоиммуноцитарный цилиндр) представляет собой неоднородный по плотности материал: костная составляющая – плотное вещество, гемопоэтическая ткань – рыхлая полужидкая субстанция. Для проведения иммунологических реакций необходимо приготовление ультратонких срезов, требующих приведения всех гистологических компонентов к однородной плотности.

Сравнение разных методов окрашивания в зависимости от протокола обработки материала трепанобиоптата КМ

Параметр	Свежемороженый материал	Парафин	Метакрилатные смолы
Сохранность антигенных детерминант	Нативный антиген	Существенное изменение/разрушение структуры антигенов: <ul style="list-style-type: none"> <li>• метиленовые сшивки при фиксации в формалине;</li> <li>• лизис эпитопов при декальцинации</li> </ul>	Изменение структуры антигенов: метиленовые сшивки при фиксации в формалине
Спектр антител	Полный*	Есть исключения	Есть исключения
Оптимальный метод визуализации реакции антиген – антитело	Имунофлюоресценция (возможно сочетание с ИГХ)	ИГХ (возможно сочетание с иммунофлюоресценцией)	ИГХ (возможно сочетание с иммунофлюоресценцией)
Возможность архивирования окрашенных препаратов	Нет	Есть	Есть
Скорость проведения: (от момента взятия материала до получения результата)	Несколько часов	Несколько суток	Несколько суток
Стоимость	Требуются дорогостоящее оборудование – криостат, флюоресцентный микроскоп, меченные флюоресцентными красителями антитела	Стандартное для любой морфологической лаборатории оборудование. Основные затраты – моноклональные антитела и системы визуализации	Требуются специальное оборудование – сверхпрочные ножи для микротомы. Метакрилатные смолы – дорогостоящий материал. Обязательно наличие проточной вытяжной системы (метакрилатные смолы – летучие токсичные вещества)
Трудоемкость	+	+++	+++

*Примечание.* \* Имеется в виду весь спектр выработанных на сегодня моноклональных антител.

Этого можно добиться либо размягчением костных структур, либо уплотнением собственно гемопоэтической ткани. В первом случае проводится декальцинация кости, второй эффект может быть получен при заливке материала в растворы на основе метакрилатных смол или замораживании при низких температурах (до  $-70^{\circ}\text{C}$ ) в особых смесях, при этом оба метода не требуют проведения процесса декальцинации [24, 25]. Замораживание материала трепанобиоптатов идеально для сохранения антигенных детерминант, в то время как использование метакрилатных смол позволяет получать гистологические препараты отменного качества [10, 11]. В настоящее время, как уже было отмечено, наиболее широко в рутинной практике используется метод декальцинации с последующей заливкой материала в парафин. Выбор метода произошел в результате исторической селекции с учетом экономической целесообразности и технической доступности.

Вне зависимости от использованного гистологического протокола заливки материала иммунологическое окрашивание материала производится по единому принципу, в основе которого лежит реакция интересующий антиген – моноклональное антитело. Тип гистологической подготовки трепанобиоптата может влиять только на вид красителя, с помощью которого позитивная реакция может быть прочтена морфологом. Так, для криостатных срезов оптимально использование флюоресцентных красителей, для материала, залитого в парафин или метакрилатные смолы, – хромогенов, видимых на уровне световой микроскопии.

Эволюция иммунологических методов исследования материала трепанобиоптатов КМ привела к выбору иммуноферментного метода (иммуногистохимии – ИГХ) на парафиновых срезах КМ в качестве основного. Для наглядности можно привести сравнение всех методик окрашивания (см. таблицу).

В лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ РАМН опробованы все представленные методы. Предпочтение отдано ИГХ в сочетании с иммунофлюоресценцией на парафиновых срезах [26, 27].

Очевидно, что иммунофенотипирование трепанобиоптатов КМ – процесс технически сложный и экономически затратный и поэтому требующий четко сформулированных показаний для проведения.

В целом при НХЛ основными задачами иммунофенотипирования КМ являются:

- выявление неопластической лимфоидной инфильтрации;
- дифференциальный диагноз различных вариантов лимфом;
- дифференциальный диагноз с реактивными процессами.

Приоритет в решении поставленных задач должен быть, безусловно, отдан современной проточной цитофлюориметрии аспирата КМ. Показания для иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов КМ при НХЛ являются еще более узкими. Исследование должно проводиться:

- при обнаружении патологической лимфоидной инфильтрации КМ и отсутствии возможности проведения проточной цитофлуориметрии аспирата;
- в случае достоверного отсутствия клеток в аспирате или низкого процента общего числа лимфоцитов при лимфомах, отличающихся высокой частотой поражения КМ;
- в составе комплексного исследования КМ при CD5-негативных вариантах (фолликулярная, все варианты лимфом маргинальной зоны);
- для дифференциальной диагностики реактивных и опухолевых плазматитозов, при низком проценте плазматических клеток в аспирате;
- во всех случаях при выявлении только в материале трепанобиоптата КМ лимфоидной инфильтрации, подозрительной в отношении опухолевой.

При Т-клеточных НХЛ предпочтение должно также отдаваться ПЦ, поскольку при большинстве лимфом диагностической считается коэкспрессия антигенов. Кроме того, существуют сложности применения антител к  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -Т-клеточным рецепторам, определяющим клональность неопластических Т-лимфоцитов на парафиновых срезах КМ.

Комплексного иммуноморфологического исследования трепанобиоптата из всех Т-линейных НХЛ требует анапластическая крупноклеточная лимфома (АКЛ), поскольку ее отличает своеобразный тип костномозговой инвазии — в виде монодисперсии отдельных клеток между элементами гемопоэза, что может быть определено только иммуногистохимически. Процент лейкемизации данного варианта, по мировым данным, составляет около 30, при этом исследование аспирата КМ, как правило, неинформативно [28–30]. Например, в работе А.И. Слугина [31], посвященной крупноклеточным лимфомам у детей, ни у одного из 18 детей с диагнозом АКЛ, установленным на основании морфоиммунофенотипирования нодальных и экстранодальных очагов поражения, при исследовании аспирата КМ из двух точек поражения КМ не определялось.

М. Фгага и соавт. [32] при рутинном гистологическом исследовании биоптатов КМ обнаружили поражение только у 17% пациентов, а при проведении дополнительного иммуногистохимического окрашивания с применением моноклональных антител к CD30 и эпителиальному мембранному антигену (ЕМА) — уже у 23% больных. Во всех 42 случаях, вошедших в их работу, имела место дисперсия единичных опухолевых элементов между нормальными гемопоэтическими клетками и адипоцитами. Подобные гистологические особенности костномозговой инвазии АКЛ описаны также в работах Y. Sadahira и соавт. [16] и С. Wayle и соавт. [33].

Что касается В-НХЛ, то объективная диагностическая ценность иммунофенотипирования трепанобиоптатов КМ неодинакова для разных вариантов, поэтому основные диагностические возможности метода нагляднее представить в соответствии с нозологиями.

Например, В-клеточный лимфолейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (В-ХЛЛ/ЛМЛ) и волосатоклеточный лимфолейкоз помимо ярко выраженных иммунофенотипических характеристик обладают высоким потенциалом лейкемизации (>90%), что отражается в стабильном появлении патологического лимфоцитоза в аспирате КМ [7, 8, 14]. Комплексное иммуноморфологическое исследование аспирата с использованием ПЦ можно считать основополагающим, поскольку только ПЦ позволяет при ис-

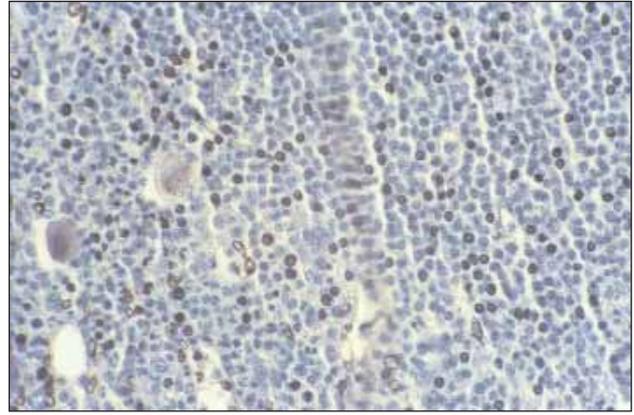


Рис. 6. Ядерная экспрессия циклина D1 клетками костномозгового субстрата лимфомы из клеток мантии. Иммуногистохимия, ув. 250

пользовании двойного и тройного флуоресцентного меченения оценивать диагностические маркерные коэкспрессии: CD23 и CD5 при В-ХЛЛ/ЛМЛ и CD103 и CD25 при ВКЛ на поверхности CD19 + лимфоцитов [34, 35].

Необходимость проведения трепанобиопсии при развернутой лейкемической картине периферической крови и аспирата КМ окончательно не ясна. Если одни авторы, в литературе более ранних лет, утверждают прогностическое значение разных типов инфильтрации КМ при В-ХЛЛ [36, 37], то другие, позднее, это опровергают [38, 39]. Впоследствии были выделены более надежные признаки биологической агрессивности опухоли, такие как наличие соматических гипермутаций в генах, кодирующих переменные участки тяжелых цепей, экспрессия молекулы CD38 и высокий уровень  $\beta 2$  — микроглобулина [40, 41].

#### Лимфома из клеток мантии (ЛКМ)

Поражение КМ при ЛКМ встречается примерно у 75–80% пациентов [42–48], причем в отличие от В-ХЛЛ лейкемическая фаза периферической крови встречается только у 50% больных. P.L. Cohen и соавт. [49] описали наибольший процент (93) поражения КМ при лимфоме зоны мантии на материале 46 больных. Подобный результат авторы объяснили исследованием материала строго билатеральной трепанобиопсии у всех больных. Основным методом определения иммунофенотипа лейкемического клона при данной нозологии следует считать ПЦ аспирата, позволяющую определять антиген CD5 на клональных В-лимфоцитах и уровень экспрессии молекулы CD20. Однако на настоящий момент накоплено достаточно описаний случаев этой лимфомы с абберрантным профилем экспрессии иммунологических маркеров: с отсутствием экспрессии CD5 при положительной экспрессии CD23 [50], коэкспрессией CD5 и CD23 [51], CD5 и CD10 [42, 44], CD10 при отсутствии CD5 [52].

Кроме того, основным патогномичным признаком лимфомы, в соответствии с классификацией ВОЗ (2001), является гиперэкспрессия циклина D1, ассоциированная с транслокацией (11;14), затрагивающей локусы генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов на хромосоме 14, и локус *Bcl-1* (Cyclin D1) на хромосоме 11 [53–57]. Считается, что данное генетическое событие играет основную роль в патогенезе развития лимфомы зоны мантии, так как гиперэкспрессия циклина D1 (белка — регулятора клеточного цикла) блокирует клетку на границе перехода фаз G1 → S. Циклин D1 относится к белкам, экспрессируемым на

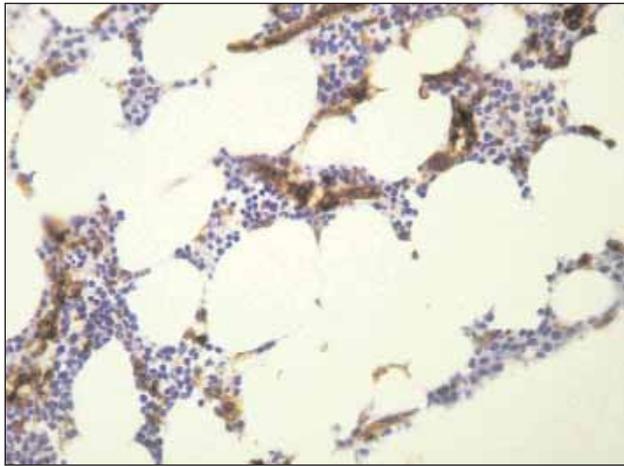


Рис. 7. Интрасинусоидальная локализация «сладжей» опухолевых клеток при ЛМЗ селезенки. Иммуногистохимия, окраска на CD20, ув. 200

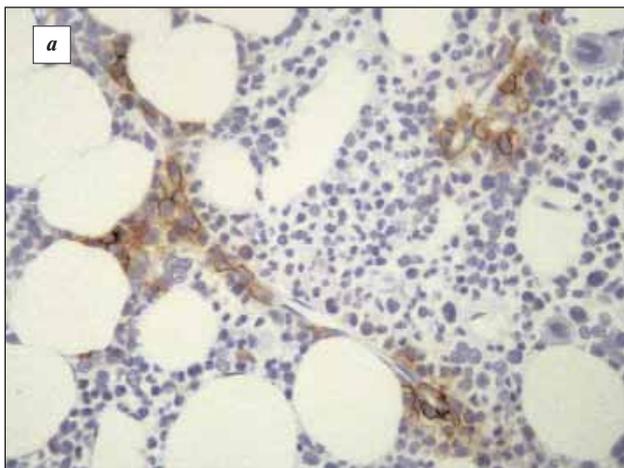


Рис. 9. Реактивный плазмцитоз. а — иммуногистохимическая окраска на CD138 (синдекан-1); б — иммунофлуоресцентное окрашивание комбинированным меченым антителом к (зеленое свечение)/λ (желтое свечение)

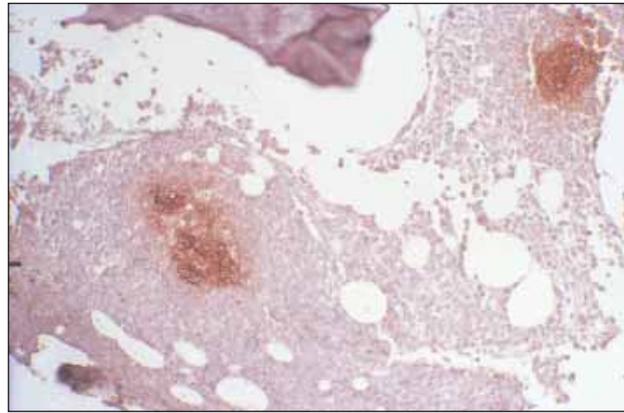
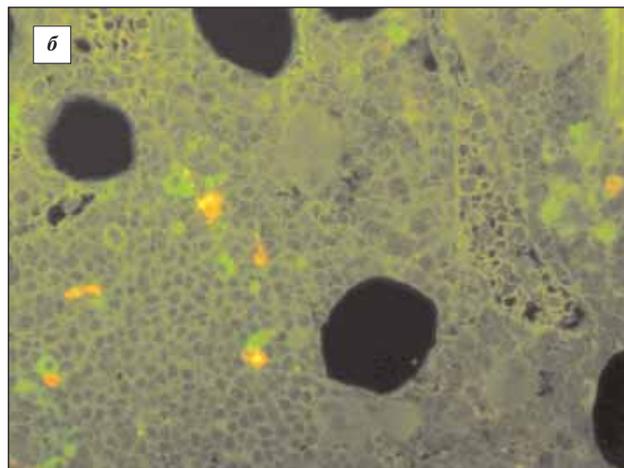


Рис. 8. Сеть фолликулярных дендритных клеток в лимфатических узлах при ЛМЗ. Иммуногистохимия, окраска на CD21



ядерной мембране, поэтому единственным способом его определения на сегодняшний день является метод иммуногистохимии [58] (рис. 6).

Таким образом, можно сказать, что первичное определение иммунофенотипа лейкоемического клона при ЛКМ наиболее удобно с использованием ПЦ, но окончательная идентификация диагноза требует проведения иммуногистохимического исследования трепанобиоптата КМ.

#### **Фолликулярная лимфома (ФЛ)**

По статистическим данным, вовлечение КМ при ФЛ определяется в 40–60% случаев [59, 60], причем циркуляция опухолевых клеток в периферической крови определяется меньше чем у трети больных [8].

Характерная для ФЛ выраженность склеротических изменений в КМ, а также, вероятно, профиль экспрессии молекул адгезии достаточно часто препятствуют попаданию неопластических клеток в аспират [61–63], поэтому основным методом исследования КМ при известном иммунофенотипе экстрамедуллярной опухоли можно считать гистологию трепанобиоптата. Существование «золотого диагностического стандарта» при ФЛ — паратрабекулярной локализации лимфомного субстрата с centroцитарно-центробластным составом — позволяет морфологу ограничиться уровнем

стандартного исследования КМ без применения иммуногистохимического окрашивания.

Иммуногистохимическое исследование при ФЛ требуется для определения минимальной резидуальной инфильтрации КМ при оценке полноты ремиссии [64]. Однако при минимальном количестве В-клеток оценка их природы находится уже за рамками возможностей ИГХ и может быть осуществлена только на основании определения клональной реаранжировки генов иммуноглобулинов или патогномичной транслокации t(14;18).

#### **Лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ)**

В классификации ВОЗ (2001) выделяется 3 основных типа лимфом, происходящих из клеток маргинальной зоны мантии лимфоидных фолликулов или периартериоларных лимфоидных муфт. Это — ЛМЗ селезенки, нодальный вариант ЛМЗ, а также вариант, ассоциированный со слизистыми (МАЛТ).

При ЛМЗ селезенки, по разным данным, поражение КМ встречается наиболее часто — в 67–100% случаев [65–68], при МАЛТ-лимфомах примерно в 20% [65, 69, 70]. Вовлечение КМ при нодальном варианте считается казуистикой, что, однако, может быть объяснено редкостью самой нозологии [12, 71, 72].

На этапе иммунофенотипирования диагноз ЛМЗ ус-

танавливается скорее методом исключения, так как типичных иммунологических маркерных ассоциаций не определено. Характерна экспрессия пан-В-линейных антигенов при отсутствии коэкспрессии молекул CD5, CD23, CD10 [1, 73–77]. Для дифференциальной диагностики внутри группы ЛМЗ может быть полезным учет некоторых различий в экспрессии поверхностных иммуноглобулинов. Так, для ЛМЗ селезенки характерна коэкспрессия молекул IgM+, IgD+, в то время как для нодального варианта — только молекулы IgM в отсутствие IgD- [7, 78].

В данной работе основное внимание хотелось бы уделить варианту ЛМЗ селезенки, обладающему наибольшей тропностью к гемопоэтической ткани. Следует отметить, что у ряда пациентов с ЛМЗ селезенки существуют объективные сложности проведения спленэктомии, поэтому диагностическая нагрузка часто ложится на доступный лейкоэмический субстрат лимфомы.

Патологический лимфоцитоз аспирата КМ при ЛМЗ селезенки позволяет изучить фенотип лимфомных элементов цитометрически и цитогенетически [8, 79]. Так как эта лимфома не имеет достаточно типичных иммунологических и цитогенетических признаков (делеция хромосомы 7 встречается менее чем в 40% случаев, трисомия хромосомы 3 — менее чем в 17%), для подтверждения диагноза полезна любая дополнительная диагностическая информация, например, определение специфического типа роста лимфомы в трепанобиоптате КМ (ВОЗ). Для ЛМЗ селезенки описано два патогномоничных гистологических типа роста — интрасинусоидальный и нодулярный [8, 14]. При первом типе определение опухолевых «слабей» внутри сосудов микроциркулярного русла при исследовании стандартно окрашенных срезов трепанобиоптатов КМ не всегда возможно — только при использовании иммуногистохимического окрашивания с применением моноклональных антител к пан-В-клеточным маркерам (рис. 7) [27].

Патологические лимфоциты, окрашенные хромогеном коричневого цвета (DAB), формируют линейные структуры по ходу «забитых» ими синусов (микрососудов) КМ.

Нодулярный тип считается вторым по частоте встречаемости при ЛМЗ селезенки. Его отличают межтрабекулярное расположение, сохранение резидуальных герминогенных центров (вариабельный признак) и выраженная зональность [8, 14, 80]. Указанная ассоциация морфологических признаков определяет сходство патологических нодулей с реактивными лимфоидными фолликулами, поэтому очевидно, что проведение иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов КМ при нодальном типе лимфомной инфильтрации при ЛМЗ селезенки также обязательно, и в задачи исследования, помимо проведения дифференциальной диагностики с другими вариантами периферических В-клеточных мелкоклеточных лимфом, входит исключение реактивной природы лимфоидной инфильтрации.

Дополнительным признаком неопластической природы лимфомных инфильтратов считается формирование сети фолликулярных дендритных клеток, позитивных по CD21, CD23 и CD35, что нехарактерно для инфильтратов при других вариантах В-НХЛ, а также для реактивных нодулей (рис. 8) [14, 80, 81].

Лейкемизация MALT-ом, как уже сообщалось, встречается довольно редко [65, 69, 70]. Однако при этих лимфомах могут определяться достаточно плотные

Т-клеточные реактивные лимфоидные инфильтраты. Определение природы этих инфильтратов с исключением специфического поражения КМ, лежащего в основе правильного стадирования MALT-ом, также возможно только при иммунофенотипировании [82].

#### Плазмноклеточные В-НХЛ

Имуногистохимия трепанобиоптатов КМ представляется замечательным дифференциально-диагностическим тестом при низком проценте плазматических клеток в аспирате КМ у пациентов с парапротеинемией при подозрении на инициальную стадию множественной миеломы (ММ) или контроле минимальной резидуальной болезни при ММ у леченых больных. Оптимальной по информативности можно считать комбинацию иммуноферментного и иммунофлюоресцентного методов на материале трепанобиоптатов КМ (рис. 9) [27, 83]. Иммуногистохимия позволяет определить количество, локализацию и цитологические особенности плазматических клеток. Применение меченного двойной флюоресцентной меткой антитела к легким цепям иммуноглобулинов к- и λ позволяет определить моно- или поликлоновость плазмочитов в одном поле зрения.

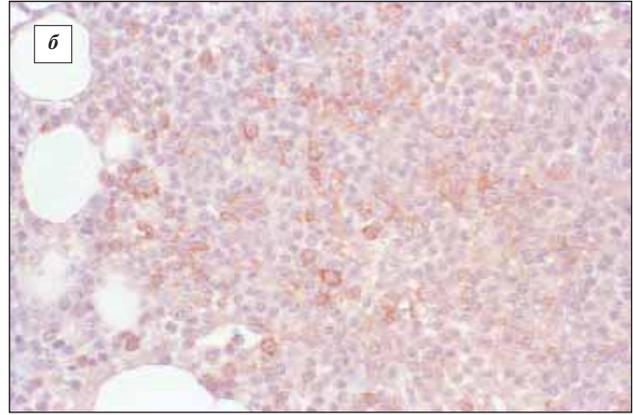
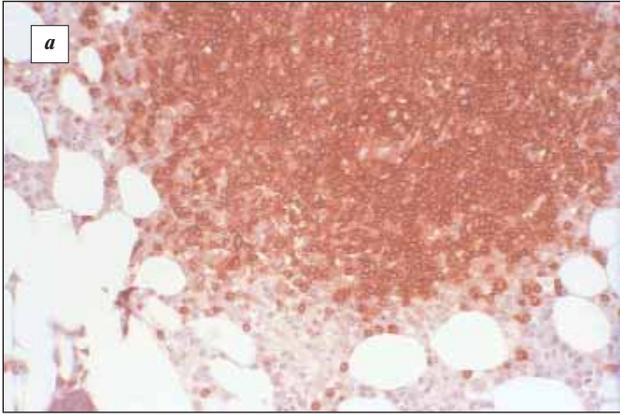
На рис. 9, а хорошо видно, что плазматические клетки, окрашенные коричневым хромогеном, имеют зрелый облик, в них отсутствует ядерная атипия и они расположены перикапиллярно (вдоль синуса). Все признаки наиболее характерны для реактивного плазмочитоза. На рис. 9, б — в темном поле флюоресцентного микроскопа соотношение плазматических клеток, несущих к- и λ- цепи иммуноглобулинов, примерно одинаковое (есть небольшое преобладание к+), т.е. клетки не клональны. Диагноз множественной миеломы исключен.

#### Агрессивные В-НХЛ: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) и лимфома Беркитта (ЛБ)

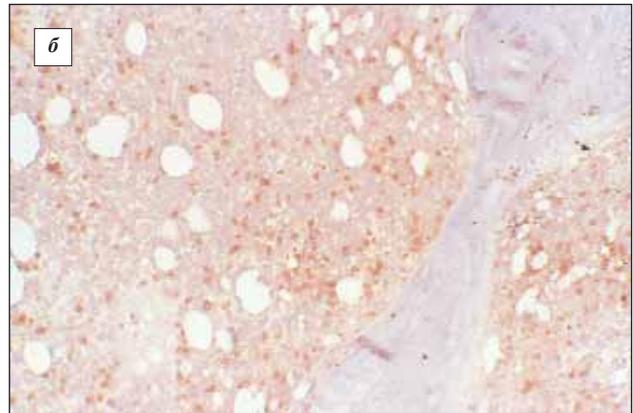
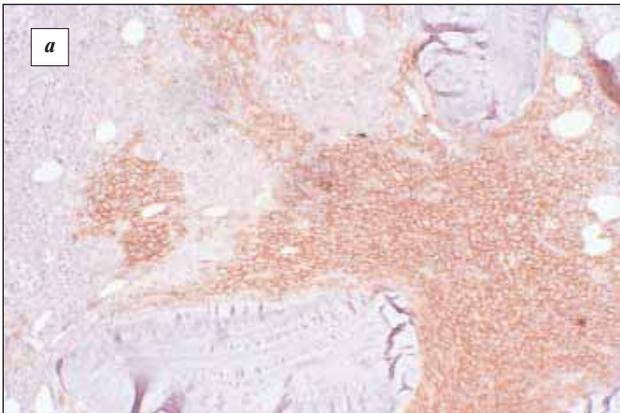
Определение поражения КМ при данных вариантах, имеющих характерную морфологию, представляется достаточно простым и в случаях известного иммунофенотипа экстрамедуллярного компонента может быть ограничено только морфологическим исследованием трепанобиоптата или аспирата КМ. Особый интерес представляет изучение дискордантных мелкоклеточных лимфоидных инфильтратов в КМ при ряде В-НХЛ, в частности, при ДВКЛ и ЛБ.

В современной литературе явление дискордантных гистологических ситуаций при ДВКЛ обсуждается довольно редко. Суммируя весь доступный литературный материал, можно выделить три основные причины дискордантности [17, 84]:

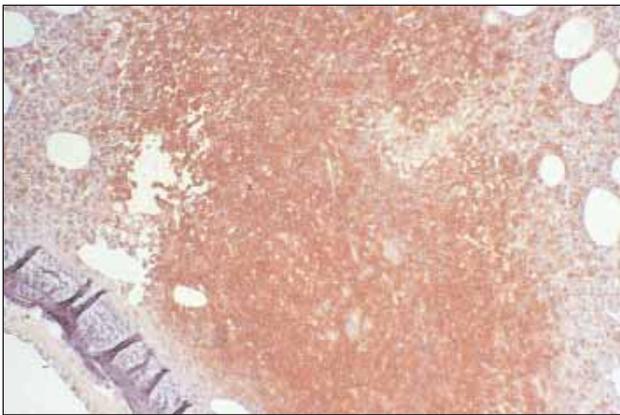
- трансформация в более агрессивный вариант (крупноклеточную НХЛ). Наиболее характерно для ФЛ и В-ХЛЛ (синдром Рихтера) и представляет собой морфологическое проявление опухолевой прогрессии;
- реактивный процесс. Мелкоклеточные инфильтраты в КМ, в отличие от экстрамедуллярной ДВКЛ, имеют Т-клеточную природу с разным соотношением CD4+/CD8+-популяций;
- истинная биклональность. Одновременное существование двух лимфопрлиферативных процессов с разными иммуноморфологическими и молекулярно-биологическими клональными особенностями. Подоб-



**Рис. 10.** ИГХ дискордантной мелкоклеточной лимфоидной инфильтрации в КМ больного экстранодальной ДВКЛ. а — окрашивание на CD3 (Т-клеточный компонент); б — окрашивание на CD20 (крупные дискретные атипичные В-клетки)



**Рис. 11.** Иммуногистохимическое исследование лейкомического субстрата КМ при первичной нодальной ДВКЛ. а — окраска на CD20: диффузный рост опухоли крупноклеточного состава; б — окраска на CD3: разрозненные немногочисленные Т-клетки. Ув. 200



**Рис. 12.** Дискордантная мелкоклеточная лимфоидная инфильтрация КМ при ЛБ. ИГХ, окрашивание на CD3

ные первично-множественные процессы называются также композитными.

В работе, проведенной в лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ РАМН, при иммунологическом изучении дискордантных лимфоидных мелкоклеточных инфильтратов у пациентов с ДВКЛ (20 больных) были получены достаточно интересные результаты. Во всех случаях лимфоидные инфильтраты оказались представлены реактивными Т-клетками. В некоторых наблюдениях при иммуногистохимическом исследовании среди Т-компонента определялись крупные В-клетки с признаками явной атипичности, подобные центробластам и иммунобластам,

что было расценено как начальные признаки костномозговой инвазии ДВКЛ. В этих случаях иммунологическая картина КМ соответствовала варианту ДВКЛ, богатой Т-клетками (рис. 10), при том что экстрамедуллярная опухоль у всех пациентов имела вид классической ДВКЛ.

При всестороннем анализе особенностей клинического течения исследованной группы было определено, что тенденция к образованию Т-клеточных скоплений встречалась, в основном, у больных с первичной экстранодальной локализацией ДВКЛ. У пациентов с первичными нодальными формами в КМ выявлялась типичная бластная диффузная инфильтрация, соответствующая экстрамедуллярному компоненту ДВКЛ, а Т-клеточный реактивный компонент был представлен немногочисленными разрозненными клетками (рис. 11).

Дискордантная мелкоклеточная лимфоидная инфильтрация была обнаружена нами и при ЛБ — при иммуногистохимическом окрашивании трепанобиоптата КМ она также оказалась представлена Т-реактивным компонентом (рис. 12). ЛБ у пациента возникла на фоне ВИЧ-инфекции, и Т-клеточная инфильтрация является, вероятно, синцитиальной структурой, характерной для болезни.

На примере дискордантных ситуаций было показано, что иммунофенотипирование трепанобиоптатов КМ помимо чисто практической ценности может представлять научно-исследовательский интерес. Например, определение реактивной Т-клеточной природы мелкоклеточных лимфоидных инфильтратов у пациентов с первичной экстранодальной локализацией ДВКЛ может свидетельст-

зовать о высокой иммуногенности этой формы лимфомы по сравнению с первичной нодальной. Дальнейшее изучение субпопуляционного состава реактивного Т-компонента, а также сопоставление иммунофенотипа двух форм ДВКЛ с разной иммуногенностью может пролить свет на особенности механизмов противоопухолевого иммунитета при лимфомах и гемобластозах вообще.

ИГХ, как любой другой метод, имеет, безусловно, свои ограничения. Например, смешанно-клеточные (Т- и В-клеточные) лимфоидные нодулы при периферических В-НХЛ ранее безоговорочно воспринимались как реактивные, однако с развитием молекулярно-биологических методов стало возможным оценивать отдельно взятый В-клеточный компонент. Вследствие этого появилось множество публикаций, посвященных ретроспективному анализу архивного материала трепанобиопсий, в которых авторы доказывали клональную природу В-клеток, выделенных из «реактивных» инфильтратов с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) [85, 86]. Действительно, по сравнению с иммунофенотипированием молекулярная диагностика, в частности ПЦР, является более точной, позволяет оценивать минимальное количество лимфоидных

элементов, что определяет особенности ее применения — для диагностики минимальной инфильтрации КМ при стадировании в начале болезни и для контроля ремиссии.

Таким образом, можно сказать, что исследование материала трепанобиоптата КМ с применением современных методов при большинстве НХЛ является обязательным тестом, позволяющим получить важную дополнительную диагностическую информацию, способную критически повлиять на планирование лечебной тактики. Наиболее достоверным следует считать комплексное иммуноморфологическое исследование аспирата и трепанобиоптата КМ (с применением метода ПЦ для аспирата КМ), установление иммунофенотипа экстрамедуллярного компонента опухоли (при его наличии) [27, 83, 87—90]. В лаборатории иммунологии гемопоза и отделе патологической анатомии опухолей ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН разработан комплексный подход к диагностике, включающий детальное гистологическое изучение первичного субстрата НХЛ по парафиновым блокам с подробной иммуногистохимией по свежему материалу (криостатные срезы), цитохимическую и иммуноморфологическую оценку аспиратов КМ, дополненную ИГХ трепанобиоптатов [91].

Рекомендуемая литература

1. Pawade J., Wilkins B.S., Wright D.H. Low-grade B-cell lymphomas of the splenic marginal zone: a clinicopathological and immunohistochemical study of 14 cases. *Histopathology* 1995;27:129—37.
2. Kimby E., Rincon J., Patarroyo M., Mellstedt H. Expression of adhesion molecules CD11/CD18 (Leu-CAMs, beta 2-integrins), CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994;3(4):297—306.
3. Lucio P.J., Faria M.T., Pinto A.M. et al. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 1998;83(2):104—11.
4. Horst E., Meijer C.J., Radaskiewicz T. et al. Expression of a human homing receptor (CD44) in lymphoid malignancies and related stages of lymphoid development. *Leukemia* 1990;4(5):383—9.
5. Angelopoulou M.K., Kontopidou F.N., Pangalis G.A. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 1999;36(2):178—97.
6. Thaler J., Dietze O., Denz H. et al. Bone marrow diagnosis in lymphoproliferative disorders: comparison of results obtained from conventional histomorphology and immunohistology. *Histopathology* 1991;18(6):495—504.
7. Harris N., Jaffe E.S., Diebold J. et al. World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17(12):3835—49.
8. Bain B.J. et al. Bone marrow pathology. L., Blackwell Science; 2001.
9. Parveen T. Bone marrow procedure, examination and reporting. In: Pathology of bone marrow and blood cells. Farhi D.C. et al. (eds.) Lippincott, Williams and Williams; 2004. p. 12—22.
10. Bernhards J., Weitzel B., Werner M. et al. A new histological embedding method by low-temperature polymerisation of methyl methacrylate allowing immunohistochemical studies on semi-thin sections of undecalcified bone marrow biopsies. *Histochemistry* 1992;98(3):145—54.
11. Kreft A., Busche G., Bernhards J., Georgii A. Immunophenotype of hairy-cell leukaemia after cold polymerization of methyl-methacrylate embeddings from 50 diagnostic bone marrow biopsies. *Histopathology* 1997;30(2):145—51.
12. Nathawani B.N., Anderson J.R., Armitage J.O. et al. Marginal zone B-cell lymphoma: a clinical comparison of nodal and mucosa-associated lymphoid tissue types. *J Clin Oncol* 1999;17:2486—92.
13. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A. et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94(6):1848—54.
14. Feller A.C., Diebold J. *Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphoma. Third, Completely Revised and Updated Edition.* Berlin, NY, Springer-Verlag; 2004.
15. Hashimoto M., Masanori H. et al. Lymphoid nodules in human bone marrow. *Acta Pathol Jap* 1957;7:33—52.
16. Sadahira Y., Hata S., Sugihara T., Manabe T. Bone marrow involvement in NPM-ALK-positive lymphoma: report of two cases. *Pathol Res Pract* 1999;195(9):657—61.
17. Krober S.M., Horny H.P., Greschniok A., Kaiserling E. Reactive and neoplastic lymphocytes in human bone marrow: morphological, immunohistological and molecular biological investigation on biopsy specimen. *J Clin Pathol* 1999;52:521—6.
18. Arber D.A., George T.I. Bone marrow biopsy involvement by Non-Hodgkin's lymphoma. Frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1549—57.
19. Wasman J., Rosenthal N., Farhi D. Mantle cell lymphoma: morphologic findings and bone marrow involvement. *Am J Clin Pathol* 1996;106:196—200.
20. Audouin J., Le Tourne A., Molina T. et al. Patterns of bone marrow involvement in 58 patients presenting primary splenic marginal zone lymphoma with or without circulating villous lymphocytes. *Br J Haematol* 2003;122:404—21.
21. Franco V., Florena A.M., Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996;29:571—5.
22. Kent S.A., Variakojis D., Peterson L.C. Comparative study of marginal zone lymphoma involving bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2002;117:698—708.
23. Dogan A., Morice W.G. Bone marrow histopathology in peripheral T-cell lymphomas. *Br J Haematol* 2004;127:140—57.
24. Cheong S.K., Lim Y.C. Frozen bone marrow trephine biopsy—a technical evaluation. *Malays J Pathol* 1990;12(1):51—6.
25. Falini B., Mason D.Y., Stein H. et al. The immunohistological analysis of undecalcified human bone marrow trephine biopsies. Technical and diagnostic aspects. *Haematologica* 1984;69(3):346—76.

26. Чигринова Е.В. Возможности типирования трепанобиоптатов костного мозга при неходжкинских лимфомах. Иммунология гемопоэза. М., Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 2004. с. 103—9.
27. Чигринова Е.В., Павловская А.И., Тупицын Н.Н. Роль иммунофенотипирования в диагностике опухолевого поражения костного мозга при В-клеточных неходжкинских лимфомах. Иммунология гемопоэза. М., Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 2006. с. 91—117.
28. Agnarsson В.А., Kadin М.Е. Ki-1 positive large cell lymphoma. A morphologic and immunologic study of 19 cases. *Am J Surg Pathol* 1988;12(4):264—74.
29. Chott А., Kaserer К., Augustin I. et al. Ki-1-positive large cell lymphoma. A clinicopathologic study of 41 cases. *Am J Surg Pathol* 1990;14(5):439—48.
30. Wong К.Ф., Chang J.K.C., Ng C.S. et al. Anaplastic large Ki-1 lymphoma involving bone marrow: marrow findings and association with reactive hemophagocytosis *Am J Hematol* 1991;37:112—9.
31. Слугин А.И. Крупноклеточные лимфомы у детей (клиника, диагностика, лечение). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2002.
32. Fraga М., Brousset P., Schlaifer D. et al. Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma. Immunohistochemical detection of minimal disease and its prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1995;103(1):82—9.
33. Bayle С., Charpentier А., Duchayne E. et al. Leukemic presentation of small cell variant anaplastic large cell lymphoma: report of four cases. *Br J Haematol* 1999;104(4):680—8.
34. Тупицын Н.Н. Иммунодиагностика гемобластозов. Клиническая онкогематология. М., Медицина; 2001. с. 124—45.
35. Тупицын Н.Н. Иммунологическая диагностика лимфом. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. М., Титул; 2004. с. 246—73.
36. Geisler С., Ralfkaier Е., Hansen М.М. et al. The bone histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1986;62:47—54.
37. Rozmann С., Montserrat E., Rodriguez-Fernandez J.M. et al. Bone marrow histologic pattern- the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis. *Blood* 1984;64:642—8.
38. Mauro F.R., De Rossi G., Burgio V.L. et al. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica* 1994;79(4):334—41.
39. Geisler С.Н., Hou-Jensen К., Jensen О.М. et al. The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia *Eur J Haematol* 1996;57(4):292—300.
40. Keating M.J. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1999;26:107—14.
41. Donher H., Stilgenbauer S., Benner A. et al. Genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000;103:472—8.
42. Argatoff L.H., Connors J.M., Klasa R.J. et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 80 cases. *Blood* 1997;89:2067—78.
43. Berger F., Felman P., Sonet A. et al. Nonfollicular small B-cell lymphomas: A heterogeneous group of patients with distinct clinical features and outcome. *Blood* 1994;83:2829—935.
44. Duggan M.J., Weisenburger D.D., Ye Y.L. et al. Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 1990;66:522—9.
45. Fisher R.I. Mantle-cell lymphoma: Classification and therapeutic implications. *Ann Oncol* 1996;7(6):35—9.
46. Jaffe E.S., Bookman M.A., Longo D.L. Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation- mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 1987;18:877—80.
47. Norton A.J., Matthews J., Pappa V. et al. Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Ann Oncol* 1995;6(3):249—56.
48. Perry D.A., Bast M.A., Armitage J.O., Weisenburger D.D. Diffuse intermediate lymphocytic lymphoma. A clinicopathologic study and comparison with small lymphocytic lymphoma and diffuse small cleaved cell lymphoma. *Cancer* 1990;66:1995—2000.
49. Cohen P.L., Kurtin P.J., Donovan K.A., Hanson C.A. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 1998;101:302—10.
50. Wohlschlaeger C.H., Lange K., Merz H., Feller F.C. Abberant immunophenotypes of mantle cell lymphomas. *Leukemia* 2003;44(2):269—73.
51. Nelson B.P., Variakojis D., Peterson M.D. Leukemic Phase of B-cell lymphomas mimicking chronic lymphocytic leukemia and variants at presentation. *Mod Pathol* 2002;15(11):1111—20.
52. Morice W.G., Hodnefield J.M., Kurtin P.J., Hanson C.A. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with a blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *Am J Clin Pathol* 2004;122(1):122—7.
53. Rozenberg C., Wong E., Petty E. et al. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9638—42.
54. Chen C.C., Raikow R.B., Sonmez-Alpan E., Swerdlow S.H. Classification of small B-cell lymphoid neoplasms using a paraffin section immunohistochemical panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(1):1—11.
55. Williams M., Westermann C., Swerdlow S. Genotypic characterization of centrocytic lymphoma: frequent rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus. *Blood* 1990;76:1387—91.
56. Williams M.E., Swerdlow S.H., Rosenberg C.L., Arnold A. Chromosome 11 translocation breakpoint at the PRAD1/Cyclin D1 gene locus in centrocytic lymphoma. *Leukemia* 1993;7:241—5.
57. Rimokh R., Berger F., Delsol G. et al. Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD gene in intermediate lymphocytic lymphoma and t(11q13)-bearing leukemias. *Blood* 1993;81:3063.
58. Vasef M.A., Medeiros L.J., Koo S. et al. Cyclin D1 immunohistochemical staining is useful in distinguishing mantle cell lymphoma from other low-grade B-cell neoplasms in bone marrow. *Am J Clin Pathol* 1991;108:302—7.
59. Mazza P., Gherlizoni F., Kemna G. et al. Clinicopathological study on non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica* 1987;72:351—7.
60. Dick F., Bloomfield C.D., Brunning R.D. Incidence cytology, and histopathology of non-Hodgkin's lymphoma in the bone marrow. *Cancer* 1974;33:1382—98.
61. Bain B.J. Bone marrow trephine biopsy. *J Clin Pathol* 2001;54:737—42.
62. Lambertenghi-Dellilieri G., Annaloro C., Soligo D. et al. Incidence and histological features of bone marrow involvement in malignant lymphomas. *Ann Hematol* 1992;65(2):61—5.
63. Thiele J., Langohr J., Skorupka M., Fischer R. Reticulin fibre content of bone marrow infiltrates of malignant non-Hodgkin's lymphomas (B-cell type, low malignancy)- a morphometric evaluation before and after therapy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417:485—92.
64. Osborne B.M., Butler J.J. Hypocellular paratrabecular foci of treated small cleaved cell lymphoma in bone marrow biopsy. *Am J Surg Pathol* 1989;13:382—8.
65. Dierlamm J., Pitaluga S., Wlodarska I. et al. Marginal zone b-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* 1996;87:299—307.
66. Hammer R.D., Glick A.D., Greer J.P. et al. Splenic marginal zone lymphoma. A distinct B-cell neoplasm. *Am J Surg Pathol* 1996;20:613—26.
67. Melo J.V., Hegde U., Parreira A. et al. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukemias with large spleens. *J Clin Pathol* 1987;40:642—51.
68. Melo J.V., Robinson D.S.F., Gregory C. et

- al. Splenic lymphoma with «villous» lymphocytes in the peripheral blood: a disorder distinct from hairy cell leukemia. *Leukemia* 1987;1:294—9.
69. Montalban C., Castrillo J.M., Abaira V. et al. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol* 1995;6:355—62.
70. Zinzani P.L., Magagnoli M., Galieni P. et al. Nongastrointestinal low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: analysis of 75 patients. *J Clin Oncol* 1999;17:1254—8.
71. Sheibani K., Burke J.S., Swartz W.G. et al. Monocytoid B-cell lymphoma: clinicopathologic study of 21 cases of a unique type of low-grade lymphoma. *Cancer* 1988;62:1531—8.
72. Traweek S.T., Sheibani K. Monocytoid B-cell lymphoma: the biological and clinical implication of peripheral blood involvement. *Am J Clin Pathol* 1992;97:591—8.
73. Isaacson P.G., Dogan A., Price S.K., Spencer J. Immunoproliferative small-intestinal disease. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1989;13:1023—33.
74. Isaacson P.G., Matutes E., Burke M. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994;84:3828—34.
75. Duong Van Huyen J.P., Molina T., Delmer A. et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1581—92.
76. Thieblemont C., Berger F., Dumontet C. et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. *Blood* 2000;95:802—6.
77. Thieblemont C., Felman P., Gallet-Bouchu E. et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol* 2003;4:95—103.
78. Mollejo M., Menarguez J., Floret E. et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1146—57.
79. Labouyrie E., Chartois-Leaute A.G., Dubus P. et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: morphologic, immunologic and molecular study. Report of three cases. *Ann Pathol* 1996;16(4):285—91.
80. Henrique R., Achten R., Maes B. et al. Guideline for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies. *Virchows Arch* 1999;435:549—58.
81. Meuge-Moraw C., Delacretaz F., Baur A.S. Follicular dendritic cells in bone marrow lymphoproliferative diseases: an immunohistochemical study including a new paraffin-resistant monoclonal antibody, DR53. *Histopathology* 1996;28(4):341—7.
82. Malek S.N., Hatfield A.J., Flinn I.W. Malt Lymphomas. *Curr Treat Option Oncol* 2003;4(4):269—79.
83. Чигринова Е.В. Поражение костного мозга при периферических В-клеточных неходжкинских лимфомах. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2006.
84. Османов Д.Ш. Поражение костного мозга при неходжкинских лимфомах. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2004.
85. Chen P.M., Fan S., Lin S.H. et al. Study of bone marrow cells in non-Hodgkin's lymphoma by DNA analysis. *Leuk Res* 1991;15(12):1097—106.
86. Gong J.Z., Zheng S., Chiarle R. et al. Detection of immunoglobulin kappa light chain rearrangements by polymerase chain reaction: an improved method for detecting clonal B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 1999;155:355—63.
87. Dunphy C.H. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128(9):1004—22.
88. Dunphy C.H. Combining morphology and flow cytometric immunophenotyping to evaluate bone marrow specimens for B-cell malignant neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1998;109(5):625—30.
89. Mazur G., Halon A., Wrobel T. et al. Contribution of flow cytometric immunophenotyping and bone marrow trephine biopsy in the detection of lymphoid bone marrow infiltration in non-Hodgkin's lymphomas. *Neoplasma* 2004;51(3):159—63.
90. Perea G., Altes A., Bellido M. et al. Clinical utility of bone marrow flow cytometry in B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). *Histopathology* 2004;45(3):268—74.
91. Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г. Иммунодиагностика гемобластозов человека. Пособие для врачей М., Издательская группа ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 2003. с. 11—24.
92. Conlan M.G., Bast M., Armitage J.O., Weisenburger D.D. Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. *Nebraska Lymphoma Study Group. J Clin Oncol* 1990;8(7):1163—72.
93. Costes V., Duchayne E., Taib J. et al. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a common growth pattern for different lymphoma subtypes. *Br J Haematol* 2002;119:916—22.
94. Dierlamm J., Wlodarska I., Michaux L. et al. Genetic abnormalities in marginal zone b-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2000;18:1—13.
95. Dong H.Y., Gorczyca W., Liu Z. et al. B-cell lymphomas with coexpression of CD5 and CD10. *Am J Clin Pathol* 2003;119(2):218—30.
96. Farhi D.C., Chai C.C. Pathology of bone marrow and blood cells. Lippincott, Williams and Williams, 2004. p. 117—28.
97. Fricch B., Lewis S.M. et al. Biopsy pathology of bone and bone marrow. NY Raven Press; 1985.
98. Isaacson P.G. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* 1999;36:139—47.
99. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (eds.) World Health Organisation classification of tumours pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC Press; 2001.
100. Kremer M., Spitzer M., Mandl-Weber S. et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab Invest* 2003;83(1):107—14.
101. Macavei I., Galatar N. Bone marrow biopsy (BMB). I. Generalities, material and method, normal structure of bone marrow, pathological conditions. *Morphol Embryol (Bucur)* 1989;35(1):33—40.
102. Mateo M., Mollejo M., Villuendas R. et al. 7q31—32 allelic loss is a frequent finding in a splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol* 1999;154:1583—9.
103. Navone R., Valpreda M., Pich A. Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. *Acta Haemathol* 1985;74(1):19—22.
104. Picker L.J., Medeiros L.J., Weiss L.M. et al. Expression of lymphocyte homing receptor antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 1988;130:496—504.
105. Rywlin A.M., Ortega R.S., Dominguez C.J. Lymphoid nodules of bone marrow, normal and abnormal. *Blood* 1974;43(3):389—400.

# ОСТРЫЙ ЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ У ДЕТЕЙ

М.А. Масчан, Н.В. Мякова

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии МЗ РФ,  
ФГУ Российская детская клиническая больница МЗ РФ, Москва

Достижения последних десятилетий в области терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей являются одной из наиболее ярких страниц современной медицины. Принципиальная возможность излечения подавляющего большинства пациентов и их возвращение к полноценной жизни стали, безусловно, главным результатом серии клинических исследований, выполненных на протяжении четырех десятилетий в США и Европе. Методология проведения исследований, разработанная на модели ОЛЛ, остается ориентиром для разработки программ медикаментозной терапии в клинической онкологии. В настоящем обзоре сделана попытка суммировать современные принципы диагностики и терапии ОЛЛ у детей.

## Эпидемиология

ОЛЛ – самое распространенное злокачественное заболевание у детей. В структуре педиатрической онкологической патологии доля ОЛЛ составляет до 25% всех опухолей и до 75% всех гемобластозов. Заболеваемость ОЛЛ претерпевает существенные географические вариации, составляя в среднем 30–40 случаев на 1 млн населения в год. Характерной особенностью является так называемый младенческий пик – увеличение заболеваемости ОЛЛ до 75 на млн в год в возрасте от 2 до 5 лет. Более низкая заболеваемость ОЛЛ отмечается в странах Африки и Средней Азии, относительно более высокая – в Китае, Японии, США, Европе. Чаше заболевают мальчики (соотношение 1,6:1 для В-линейного и 4:1 для Т-линейного ОЛЛ). Риск развития ОЛЛ у детей ассоциирован с рядом факторов, наиболее значимыми из которых являются [1, 2]:

- мужской пол;
- возраст от 2 до 5 лет;
- высокий социально-экономический статус родителей;
- внутриутробная экспозиция к рентгеновскому облучению (диагностическому);
  - лучевая терапия;
  - синдром Дауна;
  - нейрофиброматоз I типа;
  - синдром Блума;
  - синдром Швахмана – Даймонда;
  - синдром Ниймеген;
  - атаксия-телеангиэктазия;
  - большая масса тела при рождении;
  - естественное вскармливание.

Существование множества факторов, находящихся в слабой ассоциации с риском развития ОЛЛ, свидетельствует в пользу модели ОЛЛ как результата сложного взаимодействия полиморфных генетических систем и элементов окружающей среды.

## Клиническая характеристика ОЛЛ у детей

Клиническая презентация ОЛЛ у детей весьма вариабельна и обусловлена опухолевой инфильтрацией и нарушением функции пораженных органов [3]. Интоксикационный синдром проявляется астенией, лихорад-

кой, недомоганием, потерей массы тела и утратой психомоторных навыков у детей раннего возраста.

Дисфункция костного мозга проявляется анемическим синдромом: бледностью, тахикардией, снижением толерантности к физической нагрузке. Геморрагический синдром может быть обусловлен как тромбоцитопенией, так и коагулопатией, особенно при гиперлейкоцитарных вариантах ОЛЛ, и проявляется пурпурой, носовыми и желудочно-кишечными кровотечениями. Лихорадка может быть обусловлена собственно лейкозом или течением бактериальной, вирусной либо грибковой инфекции, особенно у детей с абсолютной нейтропенией.

Гиперпластический синдром включает увеличение периферических лимфоузлов в виде пальпируемых плотных безболезненных конгломератов. Инфильтрация печени и селезенки приводит к гепатоспленомегалии и может проявляться болями в животе, увеличением объема живота, тошнотой, анорексией. Лейкемическая инфильтрация надкостницы и суставной капсулы, инфаркты кости и опухолевое увеличение объема костного мозга приводят к развитию болей в костях [4]. При этом на рентгенограммах обнаруживаются характерные изменения, особенно в трубчатых костях, возле крупных суставов. Первым проявлением заболевания могут быть патологические переломы трубчатых костей или позвоночника. Артралгии и отек суставов могут быть ошибочно приняты за симптомы ревматоидного артрита или других заболеваний, а поражение костей – за остеомиелит.

Инициальное увеличение яичек у мальчиков отмечается в 5–30% случаев ОЛЛ; это безболезненные, плотные, одно- или двусторонние инфильтраты. Истинная частота поражения яичников у девочек неизвестна, но, по данным некоторых исследований, она составляет от 17 до 35%. Особенно часто это бывает при гиперлейкоцитозе и Т-клеточном варианте ОЛЛ [5].

Известны случаи значительного увеличения почек в результате лейкемической инфильтрации, при этом клинические симптомы поражения почек могут отсутствовать. Редкими осложнениями являются инфильтрация миокарда и выпотной перикардит при обструкции путей лимфооттока между эндокардом и эпикардом.

Расстройства дыхания могут быть связаны с увеличением лимфоузлов средостения (характерным для Т-линейного ОЛЛ), приводящим к развитию «синдрома верхнего средостения» – сдавлению верхних дыхательных путей [6]. Иногда встречаются лейкемическая инфильтрация легочной ткани и/или кровоизлияния в нее.

Поражение глаз при ОЛЛ проявляется выпадением полей зрения, связанным с кровоизлиянием в сетчатку, инфильтрацией сосудов. Слепота может развиваться при поражении зрительного нерва.

Лейкемическое поражение кожи встречается у детей до 1 года в виде синюшных плотных безболезненных инфильтративных элементов (лейкемид).

Таблица 1. Прогностические факторы при ОЛЛ у детей

Фактор	Благоприятное значение	Неблагоприятное значение
Возраст на момент диагноза	>1 года и <10 лет	>1 года и >10 лет
Пол	Женский	Мужской
Инициальный лейкоцитоз	< 50x10 <sup>9</sup> /л	> 50x10 <sup>9</sup> /л
Иммунофенотип	Common ОЛЛ	Pro-B, T-линейный ОЛЛ
Поражение ЦНС	Нет (ЦНС 1)	Да (ЦНС 3), травматичная спинномозговая пункция
Генетические аномалии	Гипердиплоидность (> 50 хромосом, ДНК индекс > 1,16), t(12;21)	Гиподиплоидность (< 46 хромосом), t(9;22), t(4;11)
Ранний ответ на терапию периферическая кровь костный мозг	< 1x10 <sup>9</sup> /л бластных клеток на 7-й день монотерапии преднизолоном < 5% бластов в костном мозге (M1) на 7-й и 15-й день терапии индукции	> 1x10 <sup>9</sup> /л бластных клеток на 7-й день монотерапии преднизолоном > 25% (M3) на 7-й и/или 15-й день индукции или 5–25% (M2) бластов на 15-й день
Статус ремиссии после терапии индукции	Полная ремиссия	Отсутствие ремиссии
Минимальная остаточная болезнь*	<0,01% через 6–8 нед терапии	>0,01% через 6–8 нед терапии

**Примечание.** \*Числовое значение варьирует в зависимости от метода определения МОБ, программы лечения и сроков оценки.

Поражение ЦНС проявляется симптомами внутричерепной гипертензии: рвотой, головными болями, а также парезами черепных нервов.

### Диагностика

Диагноз ОЛЛ устанавливается при обнаружении более 25% лимфобластов в костном мозге. Цитохимическое исследование выявляет популяцию PAS-позитивных клеток, негативных в реакции на миелопероксидазу. Центральная роль в диагностике ОЛЛ принадлежит проточной цитометрии [7]. В минимальную панель антител включают по крайней мере один линейно-специфичный маркер для верификации линейной принадлежности лейкоза (CD3 для Т-ОЛЛ, CD79a/b или CD22 для В-ОЛЛ, MPO для острого миелоидного лейкоза, CD61/41 для острого мегакариоцитарного лейкоза, CD235 для эритролейкемии) и набор линейно-ассоциированных маркеров, позволяющих более точно охарактеризовать стадию дифференцировки [8–10]. Состав панели определяется задачами конкретного исследования и может варьировать от минимального, необходимого в рутинной диагностике, до расширенного, позволяющего идентифицировать мишень для исследования минимальной остаточной болезни (МОБ).

Современная диагностика ОЛЛ должна включать цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование, а также определение ДНК-индекса – цитометрического показателя, отражающего количественные хромосомные аномалии в опухолевых клетках. Развернутое цитогенетическое исследование ОЛЛ – крайне трудоемкий процесс, доступный далеко не каждой клинике. На практике более оправданной представляется целенаправленная идентификация клинически значимых генетических aberrаций, таких как t(9;22) и t(4;11), при помощи стандартной либо мультиплексной полимеразной цепной реакции [11–15].

На этапе диагностики обязательно выполнение спинномозговой пункции с целью выявления клинически скрытого поражения мозговых оболочек. Критерии

поражения ЦНС варьируют в различных протоколах и более подробно рассмотрены ниже.

### Биология ОЛЛ у детей

Лейкемический фенотип как совокупность специфических биологических свойств опухолевого клона является продуктом комплексного генетического дефекта. Согласно одной из принятых моделей лейкемогенеза, злокачественная трансформация рассматривается как ступенчатый процесс последовательного накопления генетических аномалий в опухолевом клоне. Кооперация различных типов генетических дефектов в опухолевых клетках приводит к блоку нормальной дифференцировки, нарушению сопряжения процессов пролиферации и апоптоза, обретению аномальной способности к миграции и тканевой инвазии.

К основным типам генетических аномалий при ОЛЛ относятся количественные аномалии, т.е. нарушения ploидности, и структурные аномалии, к которым относятся транслокации, инверсии, делеции, дупликации и точковые мутации [16, 17]. Хромосомные транслокации являются, как правило, первичными генетическими событиями, формирующимися на ранних этапах лейкемогенеза и определяющими уникальную клинико-морфологическую характеристику субварианта ОЛЛ, в то время как точковые мутации, делеции чаще оказываются вторичными аномалиями, приобретенными в результате клональной эволюции.

Лейкозы, несущие одинаковый первичный генетический дефект, формируют самостоятельную биологическую подгруппу с характерным иммунофенотипом, клиническими особенностями и ответом на терапию. Глобальный анализ при экспрессии генов в образцах с различными первичными генетическими аномалиями подтверждает, по крайней мере, для некоторых подгрупп, четкую биологическую обособленность [18–20].

Данные о наиболее распространенных хромосомных аномалиях, клиническая и прогностическая характе-

ристика соответствующих генетических субвариантов ОЛЛ суммированы в табл. 1.

Сбалансированные транслокации приводят к обмену генетическим материалом между хромосомами. С точки зрения механизма трансформации результатом такого обмена могут стать два принципиально различных события: образование химерного гена, продуктом экспрессии которого является химерный белок, обладающий онкогенным потенциалом. Наиболее характерными примерами таких транслокаций являются  $t(12;21)$  с образованием химерного гена *TEL-AML* и  $t(9;22)$  с образованием химерного гена *BCR-ABL*. Второй тип транслокаций приводит к перемещению структурно интактного гена, продукт которого участвует в регуляции пролиферации и апоптоза, под контроль сильного регуляторного элемента (промотора / энхансера), активного в данной ткани. Результатом такого перемещения являются аномально высокая экспрессия онкогенного белка и, как следствие, aberrантная регуляция фундаментальных процессов жизнедеятельности клетки. Примером таких транслокаций являются хромосомные перестройки  $t(8;14)(q24.1;q32)$  при В-клеточном ОЛЛ, переносящие *MYC*-онкоген под контроль регуляторных элементов в локусе *IGH*, и  $t(1;14)(p32;q11.2)$  при Т-линейном ОЛЛ, переносящие ген *TAL1* под контроль регуляторных элементов в локусе *TCR A/D*.

Формирование хромосомных перестроек — результат ошибок в работе сложных ферментативных систем, контролирующих метаболизм ДНК. Анализ нуклеотидных последовательностей в точках разрыва и ряд экспериментальных работ указывают на вероятную роль в образовании транслокаций при ОЛЛ механизмов, участвующих в *V(D)J*-рекомбинации в процессе лимфопоэза, а также на возможную роль таких ферментов, как топоизомераза II и апоптолитические эндонуклеазы.

Чрезвычайный интерес представляют работы последнего десятилетия, указывающие на пренатальное происхождение большинства случаев ОЛЛ у детей [21–26]. Косвенные указания на внутриутробное происхождение ОЛЛ у детей были получены в исследованиях близнецов: при лейкозах у детей раннего возраста, ассоциированных с  $t(4;11)$ , конкордантность превышает 50% и возраст манифестации заболевания практически совпадает, в то время как при ОЛЛ с  $t(12;21)$  конкордантность составляет около 10%, а возраст манифестации может различаться на несколько лет. За исключением близнецов, развитие семейных случаев ОЛЛ у сиблингов пациентов с ОЛЛ является исключительной редкостью [23, 27]. Эти наблюдения позволили предположить, что конкордантное развитие ОЛЛ у близнецов является следствием общего первичного генетического события, происшедшего внутриутробно и не связанного с наследственной предрасположенностью. Доказательства пренатального формирования первичной генетической аномалии были получены при исследовании образцов крови, взятых у пациентов с ОЛЛ при рождении, задолго до развития клинических проявлений болезни [24, 26]. Химерные транскрипты *TEL-AML* и *MLL-AF4* были обнаружены в значительной части таких образцов, при этом латентный период, т.е. срок до клинической манифестации, составлял до 9,5 года в парах с *TEL-AML* и до 4 лет в парах с *MLL-AF4*. Различный латентный период обусловлен, очевидно, специфическими особенностями механизмов трансформации, природой и скоростью накопления вторичных генетических анома-

лий. Так, для ОЛЛ с  $t(12;21)$  было показано, что наиболее часто встречающейся вторичной аномалией является делеция короткого плеча хромосомы 12. Анализ образцов крови пациентов с транскриптом *TEL-AML* показал, что *del 12p* отсутствовала в образцах при рождении, что доказывает ее вторичную природу [28]. Прямым следствием данных работ стала современная модель развития ОЛЛ у детей, согласно которой первичное генетическое событие, такое как формирование химерного гена *TEL-AML*, происходит внутриутробно вследствие экспозиции к лейкемогенным факторам, или, более вероятно, в результате спонтанных ошибок в процессе репликации и репарации ДНК. Популяция клеток, несущих химерный ген, является прелейкемическим клоном, экспансия которого в постнатальном периоде и обретение вторичных генетических дефектов ведут к проявлению полноценного злокачественного фенотипа и клиническому оформлению болезни. Неполная конкордантность развития ОЛЛ с  $t(12;21)$  у близнецов указывает на то, что эффективность клональной эволюции относительно невысока, образование прелейкемического клона далеко не всегда завершается развитием острого лейкоза и является существенно более частым событием. Доказательства этого положения были получены при исследовании образцов пуповинной крови. В этих работах было показано, что частота выявления химерного гена *TEL-AML* в пуповинной крови составила 1 на 100, что примерно в 100 раз выше частоты развития *TEL-AML*-позитивного ОЛЛ (~ 1 на 12000) [23].

#### Принципы терапии

Основным итогом первых успешных протоколов лечения ОЛЛ у детей стала принципиальная демонстрация излечимости большинства пациентов [29, 30]. Анализ исходных клинических и лабораторных показателей в соотношении с отдаленными результатами терапии позволил сформулировать представление о биологической гетерогенности заболевания и возможности выделения на основании исходных характеристик так называемых групп риска — групп пациентов, характеризующихся достоверно различной вероятностью сохранения ремиссии заболевания при проведении идентичной терапии. Следствием этого представления стала концепция риск-адаптированной терапии, согласно которой интенсивность и, следовательно, токсичность терапии должны соответствовать группе риска, т.е. пациенты с прогностически благоприятными исходными характеристиками должны получать минимально токсичную терапию и не подвергаться риску развития тяжелых осложнений, в то время как пациенты с неблагоприятными формами заболевания получают высокоинтенсивную терапию, что увеличивает шансы на излечение.

Все исследовательские протоколы последних двух десятилетий основаны на идее риск-адаптированной терапии. Прогностическая стратификация, т.е. разделение пациентов на группы риска, построена на ограниченном наборе значимых исходных параметров, обозначаемых как факторы риска. Подходы к стратификации существенно эволюционировали за три десятилетия от использования простых клинических и лабораторных показателей, таких как возраст, инициальный лейкоцитоз, иммунофенотип бластных клеток и ранний ответ на терапию, до оценки таких сложных параметров, как специфические генотипические характеристики лейкемических клеток и кинетика исчезновения остаточной опухолевой популяции [31–36]. В табл. 2 представлены основные па-

Таблица 2. Клиническая, иммунофенотипическая и прогностическая характеристика генетических субвариантов ОЛЛ у детей

Генетическая аномалия	Частота встречаемости, %	Молекулярный продукт	Иммунофенотип	Клиническая характеристика	5-у рEFS, %
Гипердиплоидный кариотип (>50 хромосом)	25–30	—	CD45/CD34±CD10+ CD24+CD33-/±CD13±	Возраст 1–10 лет, низкое число лейкоцитов, благоприятный прогноз, эффективность терапии антиметаболитами, высокая чувствительность к метотрексату	85–90
t (12;21)(p13;q22)	20–25	TEL-AML	CD34±CD19+CD10+ CD24+CD13±CD33±CD9-	Возраст 1–10 лет, благоприятный прогноз, особенно при интенсивном использовании L-аспарагиназы, эффективность терапии антиметаболитами	80–90
t (9;22)(q34;p13.3)	3–5	BCR-ABL	CD34±CD10+CD24+ CD13±CD33±CD9+	Старший возраст, гиперлейкоцитоз, плохой прогноз, возможность использования направленной терапии (иматиниб)	30–40
t (1;19)(q23;p13.3)	5–6	E2A-PBX	CD34-CD19+CD10+CD24+ cyIgμ+sIgμ±CD15+	Высокий лейкоцитоз, инициальный нейролейкоз, благоприятный прогноз при интенсивной многокомпонентной терапии	80–90
t (4;11)(q21;q23)	2 (80% у детей раннего возраста)	MLL-AF4	CD34+CD19+CD10- CD24-CD15+CD65+	Дети до 1 года, гиперлейкоцитоз, инициальный нейролейкоз, плохой прогноз	30–40
t(8;14)(q24;q32)	1–2 (90% при зрелых В-ОЛЛ)	Транспозиция MYC в локус IGH	CD34-CD19+CD10± CD24+cyIgμ+sIgμ+	Зрелый В-ОЛЛ, L3 морфология, объемный экстрамедуллярный компонент, благоприятный прогноз при высокоинтенсивной терапии с включением высоких доз метотрексата, цитарабина и циклофосфамида аналогично лимфоме Беркитта	75–85
Аномалии 1p32	6 (50% Т-ОЛЛ)	Аномалии TAL1	cyCD3+ или sCD3+ CD1a+	Мужской пол, гиперлейкоцитоз, массивный объем в средостении, плохой прогноз	60–70

раметры, используемые при прогностической стратификации.

Следует подчеркнуть, что влияние конкретного параметра на прогноз в значительной степени определяется интенсивностью и составом терапии. С течением времени ряд факторов риска, таких как мужской пол, африканская раса, инициальный нейролейкоз, потеряли самостоятельное негативное значение, что обусловлено применением более интенсивной терапии. Благоприятное значение некоторых биологических характеристик реализуется в наибольшей степени при определенных условиях. Так, оптимальные результаты терапии в группе с t(12;21) достигнуты в программах, построенных на интенсивном использовании L-аспарагиназы. Таким образом, отнесение пациента в группу высокого риска говорит не о принципиальной возможности излечения, но, в большей степени, об интенсивности терапевтического воздействия, необходимой для достижения этой цели.

В большинстве современных протоколов можно выделить три основных этапа терапии: индукцию ремиссии, интенсивную постремиссионную терапию и поддерживающую терапию, суммарная длительность которых составляет от 24 до 36 мес. Попытки уменьшить продолжительность лечения приводят к ухудшению результатов, с другой стороны, продолжение терапии более 3 лет не увеличивает эффективности лечения [37]. Терапевтические элементы, направленные на контроль нейролейкемии, пронизывают все этапы лечения и являются одной из важнейших составляющих успеха. Принципиальные результаты ряда исследовательских протоколов представлены в табл. 3 [38–45].

Индукция ремиссии – первый этап терапии. Целью индукции является уничтожение основной массы опухолевых клеток, восстановление функции костного мозга и других органов. Базовыми препаратами во всех протоко-

лах являются винкристин и кортикостероиды, третьим препаратом – L-аспарагиназа либо препараты антрациклинового ряда, в ряде протоколов в индукцию включают четыре препарата. Индукция тремя препаратами позволяет достичь полной клинико-гематологической ремиссии у 97–98% пациентов. У 1–2% пациентов заболевание оказывается резистентным к терапии, около 1% умирает от ранних осложнений, чаще всего – бактериальных и грибковых инфекций. Несмотря на сходство в построении индукционной терапии, остается ряд спорных вопросов, по-разному решаемых в различных протоколах. Исторически основным кортикостероидом в терапии ОЛЛ являлся преднизолон, однако в ряде протоколов в качестве базового кортикостероида применяется дексаметазон. Основанием этого выбора стала высокая эффективность последнего в отношении профилактики менингеального поражения. Побочные эффекты кортикостероидов, такие как стероидный диабет, асептический некроз кости, психотические реакции, несколько более выражены у дексаметазона, чем у преднизолона. Основанием для рационального выбора кортикостероида в будущем должно стать прямое сравнение эффективности и токсичности препаратов в биологически эквивалентных дозах.

Дозы и сроки введения L-аспарагиназы и антрациклинов, а также выбор конкретного препарата варьируют в разных протоколах. В целом интенсивная индукция с включением четырех препаратов является стандартом для пациентов группы высокого риска. Для пациентов группы промежуточного/низкого риска индукция тремя препаратами представляется необходимой и достаточной. В ряде наиболее успешных протоколов сразу после 4–6 нед индукции следует фаза так называемой ранней интенсификации (вторая фаза протокола I в протоколе группы VFM), включающая дополнительные препараты: циклофосфамид, цитарабин и 6-меркаптопурин.

Таблица 3. Результаты клинических исследований ОЛЛ у детей

Исследование	5-летняя бессобытийная выживаемость, %	Основные выводы
AIEOP-91 (1991–1995)	70,8	Инtrateкальная терапия эффективна в качестве ЦНС-профилактики у пациентов промежуточного риска; высокодозная терапия «блоками» не улучшает прогноз в группе высокого риска
AIEOP-95 (1995–1999)	—	Двойная интенсивная реиндукция (II протокол) улучшает прогноз в группе высокого риска
BFM-86 (1986–1990)	72	Интенсивная реиндукция (II протокол) улучшает результаты терапии во всех группах, включая группу низкого риска; высокие дозы метотрексата (5 г/м <sup>2</sup> ) улучшают результаты терапии Т-ОЛЛ
BFM-90 (1990–1995)	78,0	Краниальное облучение в дозе 12 Гр эффективно в качестве ЦНС-профилактики во всех группах, включая группу высокого риска
BFM-95 (1995–1999)	79,0	Травматичная спинномозговая пункция является неблагоприятным прогностическим фактором
CCG-1800 (1989–1995)	75,0	Отсроченная интенсификация терапии нивелирует прогностическое значение плохого раннего ответа на терапию; двойная отсроченная интенсификация улучшает результаты терапии в группе промежуточного риска
CCG-1922 (1993–1995)	81	Дексаметазон уменьшает частоту ЦНС-рецидивов и улучшает EFS; внутривенное введение меркаптопурина не улучшает исход терапии и неблагоприятно влияет на результаты терапии рецидивов
COALL-92 (1992–1997)	76,9	Применение тиогуанина в поддерживающей терапии ассоциировано с увеличением миелотоксичности и не улучшает результаты терапии
DCLSG ALL-6 (1984–1988)	72	Дексаметазон, тройная инtrateкальная терапия и промежуточные дозы метотрексата (2 г/м <sup>2</sup> ) позволяют отказаться от краниального облучения в группе низкого и промежуточного риска
DCLSG ALL-8 (1991–1996)	73,0	Отказ от краниального облучения не ухудшает результаты терапии; внутривенное введение высоких доз 6-меркаптопурина не улучшает результаты терапии
DFCI 91-01 (1991–1995)	83,0	Интенсивное использование аспарагиназы и дексаметазона улучшает результаты терапии; ПЭГ-аспарагиназа и аспарагиназа <i>E. coli</i> равноэффективны
POG (1986–1994)	70,9	Внутривенное введение метотрексата во время интенсификации имеет преимущество в сравнении с пероральным введением; терапия «блоками» не улучшает прогноз у пациентов высокого риска; интенсивная консолидация с использованием аспарагиназы улучшает прогноз при Т-ОЛЛ
SJCRH 13 (1991–1998)	81,0	Ранняя интенсификация инtrateкальной терапии в соответствии с ЦНС-статусом улучшает результаты лечения
SJCRH 15 (2000)	92 (4-летняя)	Интенсивная риск-адаптированная терапия позволяет излечивать > 90% детей с ОЛЛ; нивелировано неблагоприятное прогностическое значение высокого лейкоцитоза, Т-клеточного иммунофенотипа
МБ-91 (1991–1998)		Терапия со сниженной интенсивностью, основанная на применении дексаметазона и аспарагиназы, позволяет достичь результатов, сопоставимых с таковыми более интенсивной терапии (BFM-90), в стране с ограниченными ресурсами

Важной задачей индукционной терапии является оценка чувствительности опухолевой популяции *in vivo*. Сокращение опухолевой массы в ответ на терапию, определяемое стандартными цитологическими методами или более чувствительными методами оценки МОБ, является интегральным показателем, отражающим чувствительность лейкомической популяции, индивидуальные особенности метаболизма химиопрепаратов, соблюдение предписанной программы лечения и, косвенно, токсичность терапии.

В ряде исследований было продемонстрировано прогностическое значение раннего ответа на терапию [46–50]. В протоколах группы BFM ранний ответ на терапию оценивался на 8-е сутки монотерапии преднизо-

лоном на основании редукции бластоза в периферической крови. Пациенты с количеством бластов менее 1000 на 1 мкл составили группу хорошего ответа (PGR, prednisone good response), при бластозе более 1000 на 1 мкл — группу плохого ответа (PPR, prednisone poor response). В ряде протоколов ранний ответ оценивается по количеству бластов в костном мозге на 7-й и 15-й день индукции. Пациенты с количеством бластов в костном мозге менее 5%, 5–25% и более 25% формируют группы M1, M2 и M3 соответственно. Вне зависимости от критериев оценки хороший ранний ответ (PGR или M1 статус на 15-й день) позволяет выделить группу с 5-летней rEFS более 80%, в то время как плохой ранний ответ (PPR или M3 статус на 15-й день) определяет группу с 5-летней rEFS менее 40%.

Статус ремиссии через 4–6 нед терапии также является важнейшим фактором прогноза. Вероятность долгосрочной бессобытийной выживаемости пациентов, не достигших ремиссии на этом сроке, не превышает 30%. Группа пациентов, достигших ремиссии, более гетерогенна. В этой группе дальнейшая оценка ответа на терапию и прогностическая стратификация стали возможны при помощи методов мультипараметрической проточной цитометрии и молекулярно-биологического анализа.

В соответствии с результатом индукционной терапии уточняется прогностическая стратификация, пациенты с плохим ранним ответом на терапию переводятся в группу высокого риска, пациенты, не достигшие ремиссии к контрольному сроку, становятся кандидатами на выполнение аллогенной трансплантации вне зависимости от исходных прогностических факторов.

По достижении клинико-гематологической ремиссии наступает этап постремиссионной терапии, который в разных протоколах обозначается как интенсификация или реиндукция. Эффективность повторения интенсивной терапии, сходной по набору препаратов, дозам и режиму введения с терапией индукции, через 3 мес от начала лечения была впервые убедительно продемонстрирована в протоколе BFM 76 и подтверждена многократно в исследованиях CCG и других кооперативных групп. Один или два блока «отсроченной интенсификации» улучшают результаты терапии у пациентов высокого и промежуточного риска, включая пациентов с плохим ранним ответом [51–56].

В ряде работ были получены данные о роли конкретных препаратов и режимов введения для определенных биологических подгрупп: интенсивное применение L-аспарагиназы улучшает прогноз пациентов с Т-линейным ОЛЛ и пациентов с t(12;21). Важную роль в терапии Т-ОЛЛ играет использование высоких доз метотрексата ( $5 \text{ г/м}^2$ ), что обусловлено улучшенным накоплением активных форм препарата, полиглутаматов метотрексата, в бластных клетках.

За интенсивной фазой терапии следует этап поддерживающей терапии. Механизм противолейкемического действия низкодозной поддерживающей терапии остается невыясненным. Согласно одной из современных гипотез, эффект низкодозной «метрономной» терапии реализуется опосредованно через антиангиогенное действие и угнетение стромальных элементов. Основными препаратами на этом этапе являются пуриновые антиметаболиты и метотрексат. В большинстве протоколов применяется 6-меркаптопурин в дозе  $50\text{--}75 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ , препарат назначается перорально во второй половине суток. Доза препарата подбирается индивидуально, ориентиром для модификации дозы служит уровень лейкоцитов, отражающий системную экспозицию к препарату. Стандартной рекомендацией является поддержание абсолютного числа лейкоцитов в диапазоне  $2\text{--}3 \times 10^9/\text{л}$ . Следует избегать чрезмерно интенсивной терапии, приводящей к миелосупрессии и, как следствие, к перерывам в терапии [57]. Исследование тиогуанина (6-ТГ) в качестве альтернативы 6-меркаптопурину показало, что при равной или несколько большей терапевтической эффективности применение 6-ТГ ассоциировано с избыточным числом осложнений, таких как тромбоцитопения и веноокклюзивная болезнь печени. Метотрексат вводится, как правило, еженедельно, путь введения и доза варьируют в различных протоколах. Основная роль метотрексата заключается в облегчении метаболической активации меркаптопу-

рина в клетках. Важную роль в адекватном проведении поддерживающей терапии играет генетический полиморфизм тиопуринометилтрансферазы (ТРМТ) – фермента, участвующего в инактивации пуриновых аналогов [58]. Носители вариантных аллелей ТРМТ нуждаются в существенной редукции доз препаратов для избежания избыточной миелосупрессии и перерывов в терапии. Залогом успеха поддерживающей терапии является ее непрерывность, что подтверждено рядом исследований, согласно которым выполнение поддерживающей терапии в объеме менее 80% от требуемого (при вынужденных перерывах из-за осложнений или неадекватной дозировки) является неблагоприятным прогностическим фактором для развития рецидива [57, 59–62].

Во многих протоколах продленная поддерживающая терапия антиметаболитами прерывается короткими пульсами дексаметазона в комбинации с винкристином; эффективность этого терапевтического элемента была показана в протоколах CCG для пациентов низкого риска.

Длительность поддерживающей терапии составляет, как правило, от 18 до 30 мес, в зависимости от длительности предшествующего этапа лечения.

### Нейролейкоз

Способность опухолевых клеток к инфильтрации мозговых оболочек является фундаментальной биологической характеристикой ОЛЛ. Частота инициального поражения ЦНС при ОЛЛ у детей составляет 5%, достигая 25% в подгруппах высокого риска, таких как пациенты с Т-клеточным иммунофенотипом, пациенты с гиперлейкоцитозом, дети первого года жизни [63].

Масштаб проблемы был в полной мере осознан в конце 1960-х годов, когда достижение полной клинико-гематологической ремиссии стало возможным у большинства пациентов. При продолжении наблюдения у значительного числа пациентов (до 80%, по данным некоторых исследований) регистрировался ЦНС-рецидив. Это наблюдение дало начало развитию представлений об оккультной нейролейкемии, т.е. об изначальном существовании клинически скрытого поражения мозговых оболочек у всех пациентов с ОЛЛ. Постулировалось, что недостаточная эффективность системной терапии обусловлена ограниченной проницаемостью гематоэнцефалического барьера для химиопрепаратов. Прямым следствием этих представлений стал тезис о необходимости проведения специфической терапии, направленной на контроль нейролейкоза, всем пациентам независимо от инициального ЦНС-статуса. Справедливость этого положения проверена временем, однако вопрос об оптимальных подходах к профилактике и терапии нейролейкоза остается предметом интенсивных дискуссий.

Исторически первым удачным опытом контроля поражения ЦНС было применение краниального облучения в дозе 24 Гр [63, 64]. Высокая эффективность этой меры была оплачена букетом тяжелых отдаленных побочных эффектов, таких как отставание в росте, психическом развитии, эндокринные дисфункции и вторичные опухоли головного мозга. Вторым важнейшим компонентом ЦНС-направленной терапии стало введение химиопрепаратов в спинномозговой канал (интратекальная терапия). Базовым препаратом для интратекальной терапии остается метотрексат, в качестве дополнительных препаратов используют цитарабин и кортикостероиды в рамках так называемой тройной интратекальной терапии [65].

Третьим методом улучшения контроля нейролейкемии является интенсификация системной терапии для пациентов высокого риска с включением терапевтических элементов, обладающих высокой активностью в отношении менингеального поражения, таких как высокие дозы метотрексата и цитарабина, продленная терапия L-аспарагиназой, применение дексаметазона в качестве основного кортикостероида [66, 67].

Очевидная необходимость дезэскалации терапии была последовательно реализована в исследовательских протоколах 1980–90-х годов. Основой для уменьшения токсичности лечения стало приложение принципов риска-адаптированной терапии, т.е. выделение групп пациентов с различной вероятностью развития нейрорецидива и модификация терапии в соответствии с группой риска. В большинстве современных протоколов пациенты подразделяются на 3 группы в соответствии с результатами первичного цитологического исследования спинномозговой жидкости. Пациенты с цитозом менее 5 в 1 мкл и отсутствием морфологически идентифицируемых бластов в цитопрепарате обозначаются как ЦНС-1, с цитозом менее 5 в 1 мкл и наличием морфологически идентифицируемых бластов в цитопрепарате — как ЦНС-2, с цитозом более 5 в 1 мкл и наличием морфологически идентифицируемых бластов в цитопрепарате — как ЦНС-3. Особую группу составляют пациенты с травматичной первичной спинномозговой пункцией. В ряде работ было убедительно показано, что травматичное выполнение диагностической спинномозговой пункции оказывает значимое неблагоприятное влияние на частоту нейрорецидивов и бессобытийную выживаемость [68]. Этот эффект обусловлен не только бластной контаминацией ликворного пространства, но, в большей степени, сложностью проведения дальнейшей интратекальной терапии из-за формирования спаек и ограничения распространения химиопрепаратов в спинномозговой жидкости.

Оптимизация ЦНС-направленной терапии достигается комбинацией базовых элементов и их дифференцированным приложением в соответствии с группой риска и идеологией конкретного исследования. Так, группа VFM, принципиально сохранив краниальное облучение для большинства пациентов, продемонстрировала возможность снижения дозы краниального облучения до 18 Гр, а затем до 12 Гр без ущерба эффективности профилактики нейролейкоза. Альтернативный подход исповедуют исследователи таких групп, как SJCRH и DLSG, показавшие, что интенсификация интратекальной терапии с включением трех препаратов позволяет в рамках интенсивной системной терапии полностью отказаться от краниального облучения, сохранив при этом чрезвычайно низкую частоту нейрорецидивов и высокую общую и бессобытийную выживаемость [69–72].

### Минимальная остаточная болезнь

Под МОБ понимают популяцию опухолевых клеток, персистирующую в организме после достижения клинико-гематологической ремиссии. По определению, объем остаточной массы лейкоэмических клеток лежит за пределом чувствительности световой микроскопии.

Существует несколько принципиально различных методов выявления МОБ. Каждый из этих методов обладает определенными преимуществами и недостатками, и выбор метода диктуется клинической ситуацией и задачей исследования [73–77]. Мишенью при исследовании

МОБ является клоноспецифичная характеристика лейкоэмических клеток, позволяющая достоверно выявить и количественно охарактеризовать небольшую опухолевую популяцию на фоне избытка нормальных форменных элементов крови или костного мозга. Материалом для исследования служит, как правило, костный мозг. Важным исключением являются Т-ОЛЛ, при котором существует абсолютная корреляция между уровнем МОБ в костном мозге и периферической крови. При выборе метода определения МОБ необходимо учитывать такие характеристики, как чувствительность, универсальность, т.е. применимость к значительной части образцов, а также трудоемкость и стоимость исследования. Наиболее распространенными методами являются проточная цитометрия, молекулярно-биологическая детекция продукта реарранжировки генов иммуноглобулинов/ Т-клеточных рецепторов либо продукта специфических хромосомных перестроек. Подробное описание методов выявления МОБ выходит за рамки настоящего обзора, мы ограничимся лишь краткой характеристикой и суммируем принципиальные результаты их клинического применения.

Проточная цитометрия использует в качестве мишени аберрантный лейкоэмический иммунофенотип, представляющий собой характерный профиль экспрессии поверхностных антигенов, не встречающийся в нормальном костном мозге. Чувствительность метода достигает  $1:10^4$ , адекватную мишень для контроля МОБ удается выявить у 80% пациентов. К преимуществам данного метода можно отнести относительную доступность и возможность дистанционного анализа данных в референс-лаборатории [78].

Выявление продуктов реарранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора в качестве мишени использует уникальную последовательность нуклеотидов, образующуюся в результате перестройки в указанных локусах. Преимуществом данного метода является высокая чувствительность, достигающая  $1:10^5$ , и возможность применения у подавляющего большинства (до 98%) пациентов. К недостаткам относят трудоемкость, обусловленную необходимостью детального молекулярно-биологического анализа первичного образца и определения уникальной мишени для каждого пациента.

Общей проблемой при использовании аберрантного иммунофенотипа и продукта реарранжировки генов Т- и В-клеточных рецепторов в качестве маркера МОБ является нестабильность мишени, которая может привести к ложноотрицательным результатам и делает необходимым одновременное исследование нескольких маркеров.

Молекулярно-биологическое выявление химерных генов — наиболее чувствительный метод, предел чувствительности которого может достигать  $1:10^6$ , в качестве мишени используется химерный транскрипт, являющийся продуктом экспрессии химерных генов, таких как *BCR-ABL*, *TEL-AML* и др. [79]. Химерный транскрипт является абсолютно стабильной мишенью; единственным серьезным недостатком метода является отсутствие адекватного маркера у 65% пациентов с ОЛЛ. Альтернативным маркером могут служить гены, характеризующиеся аномально высокой экспрессией в лейкоэмических клетках, такие как *WT1* и *PRAME*. Парадоксально, но высокая чувствительность может усложнить клиническое применение метода, так как обнаружение экстремально малых количеств МОБ не всегда коррелирует с развитием рецидива

заболевания. В частности, в некоторых работах показана возможность персистенции транскрипта TEL-AML на сроках до 8 лет от начала заболевания.

Результаты завершенных клинических исследований различных методов контроля МОБ в целом совпадают, что позволяет очертить область реального применения данной технологии [80–83].

Наибольшее значение имеет оценка МОБ по завершении первого этапа терапии. В серии крупных исследований было убедительно показано, что статус МОБ по завершении 4–6 нед интенсивной терапии является наиболее значимым прогностическим фактором, позволяющим выявить группу с низкой вероятностью рецидива (<5%) и группу с вероятностью рецидива, превышающей 75%. Как и ранний ответ на терапию, исследование МОБ является интегральным отражением биологических особенностей опухоли, ее чувствительности к проводимой терапии, а также индивидуальных вариаций метаболизма химиопрепаратов. В большинстве современных протоколов окончательное определение группы риска проводится в соответствии со статусом МОБ на исходе первого этапа терапии. Дополнительный контроль МОБ на более отдаленных сроках позволяет выявить группу пациентов, которым необходима максимальная интенсификация терапии, вплоть до выполнения пересадки кроветворных стволовых клеток в первой ремиссии.

Более спорным клиническим приложением МОБ является мониторинг пациентов в полной ремиссии на этапе поддерживающей терапии и после ее завершения. Эффективность такого мониторинга определяется чувствительностью метода. Как было указано выше, обнаружение незначительного уровня МОБ при помощи сверхчувствительных методов далеко не всегда ассоциировано с развитием рецидива. При использовании менее чувствительных качественных и количественных методов персистенция либо прогрессивное нарастание уровня МОБ достоверно предсказывает развитие рецидива. Теоретически раннее выявление рецидива заболевания предоставляет врачу больше возможностей для эффективного терапевтического воздействия и позволяет предотвратить жизнеугрожающие осложнения развернутого рецидива, однако убедительных практических доказательств этого положения пока не получено. Принимая во внимание нежелательность лишних инвазивных манипуляций, мониторинг МОБ у пациентов в ремиссии следует ограничить рамками исследовательских протоколов. Можно предположить, что этот подход найдет свое применение в группе пациентов с высокой вероятностью раннего рецидива, для которых упреждающая диагностика даст выигрыш во времени, необходимый для организации неродственной трансплантации костного мозга.

Важную роль играет исследование МОБ у пациентов, подлежащих трансплантации костного мозга. В ряде работ было убедительно показано, что выявление уровня МОБ > 0,1% перед трансплантацией ассоциировано с колоссальным риском рецидива заболевания (>80%). Согласно мнению некоторых исследователей, пациенты, у которых стандартная предтрансплантационная терапия не позволяет достичь адекватного сокращения опухолевой массы, являются фактически инкурабельными и им должна быть предоставлена возможность включения в исследования новых препаратов I фазы. У пациентов после транспланта-

ции мониторинг МОБ позволяет в части случаев своевременно модифицировать иммуносупрессивную терапию и выполнить инфузию донорских лимфоцитов с целью предотвращения развернутого рецидива заболевания.

Важным практическим приложением технологий мониторинга МОБ является клиническое исследование новых противоопухолевых препаратов. Принимая во внимание хорошие результаты стандартной терапии, внедрение в терапию новых препаратов представляет существенные организационные и этические трудности. Демонстрация эффективности нового препарата в группе пациентов с первичным ОЛЛ на основании стандартных критериев оценки, таких как общая и бессобытийная выживаемость, потребует нереалистично большой выборки и длительных сроков наблюдения. Использование МОБ в качестве суррогатного маркера эффективности терапии представляется перспективным и, возможно, позволит в более короткие сроки оценить потенциал новых медикаментов в лечении ОЛЛ у детей.

#### **Rh-позитивный ОЛЛ**

Особую сложность представляет терапия прогностически неблагоприятных вариантов ОЛЛ у детей, таких как Rh-позитивный лейкоз и ОЛЛ у детей раннего возраста.

На долю Rh-позитивного ОЛЛ у детей приходится не более 4% всех случаев заболевания. Эта группа больных является наиболее неблагоприятной в отношении всех основных критериев эффективности терапии, включая частоту достижения ремиссии, общую и бессобытийную выживаемость. Так, частота выхода в ремиссию составляет 82%, общая выживаемость — около 40%, бессобытийная выживаемость — около 30%. В большинстве современных протоколов диагноз Rh-позитивного ОЛЛ автоматически определяет пациента в группу высокого риска и является показанием к аллогенной трансплантации стволовых клеток в первой ремиссии, включая трансплантацию от неродственного донора [84–86].

В отличие от взрослых пациентов, дети с Rh-позитивным ОЛЛ представляют собой гетерогенную группу в отношении чувствительности к химиотерапии [87, 88]. Анализ большой группы пациентов, получавших терапию в рамках различных национальных протоколов, показал, что у пациентов с Rh-позитивным ОЛЛ, не несущих прогностически неблагоприятных характеристик, бессобытийная выживаемость составляет около 50%. Исследование МОБ подтвердило существование небольшой группы пациентов, достигших молекулярной ремиссии к моменту окончания интенсивной фазы терапии. Существуют веские основания полагать, что в группе МОБ-негативных пациентов тактика постремиссионной терапии может быть пересмотрена, особенно для пациентов, не имеющих родственного совместимого донора. Принимая во внимание высокий риск трансплантационной летальности при пересадках от альтернативного донора, трансплантацию следует отложить на случай развития рецидива заболевания. Для остальных пациентов аллогенная трансплантация остается оптимальным способом сохранения ремиссии [89].

Особого внимания заслуживает вопрос о роли иматиниба мезилата (гливека) в терапии Rh-позитивного ОЛЛ. Первые опыты показали, что препарат обладает высокой активностью при Rh-позитивном ОЛЛ, однако при монотерапии гливеком клональная эволюция закономер-

но приводит к развитию вторичной резистентности и рецидива. Это клиническое наблюдение, а также данные о синергизме иматиниба с рядом традиционных химиопрепаратов *in vitro* сделали очевидной необходимость включения гливека в программы комбинированной терапии Ph-позитивного ОЛЛ. Первые работы, выполненные у взрослых пациентов, продемонстрировали высокую эффективность комбинированной терапии, вероятность достижения гематологической ремиссии 100%, высокую частоту достижения молекулярной ремиссии к моменту выполнения трансплантации, общую и безрецидивную выживаемость более 60% при сроке наблюдения 2 года [90, 91]. Эти данные свидетельствуют о целесообразности включения гливека в комбинированную терапию Ph-позитивного ОЛЛ, однако вопрос об оптимальном месте препарата требует более масштабного изучения.

Центральной неразрешенной проблемой остается возможность отказа от трансплантации в группе пациентов, достигших МОБ-негативности на фоне комбинированной терапии.

### ОЛЛ у детей раннего возраста

Пациенты в возрасте до 12 мес составляют 3–5% от всех детей с ОЛЛ. Ряд специфических клинических и биологических характеристик, а также неудовлетворительные результаты стандартной терапии делают данную группу пациентов объектом особого внимания исследователей [92].

Центральной биологической характеристикой ОЛЛ у детей младшего возраста является высокая частота перестроек с вовлечением гена *MLL*, расположенного в регионе 11q23. Реаранжировки гена *MLL* встречаются у 70–80% пациентов, среди них до 70% несут химерный ген *MLL-AF4* — продукт транслокации (4;11). Иммунофенотипически бластная популяция в большинстве случаев соответствует ранним пре-B-лимфоцитам, лишь у 5% пациентов выявляется T-клеточный иммунофенотип. Для пациентов с перестройкой 11q23 характерны коэкспрессия миелоидных маркеров CD15 и CD65 и отсутствие экспрессии CD10.

Характерными клиническими чертами являются инициальный гиперлейкоцитоз и поражение ЦНС: более чем у 60% пациентов уровень лейкоцитов на момент постановки диагноза превышает  $50 \times 10^9/\text{л}$ , а нейролейкоз, по данным разных авторов, выявляется у 10–25% пациентов.

Исторически пациенты младшего возраста составляли прогностически наиболее неблагоприятную группу [93–95]. Результаты терапии в рамках основных терапевтических протоколов 1980–90-х годов нельзя признать удовлетворительными. Пятилетняя бессобытийная выживаемость, по данным разных групп, составляет от 17 до 54%. Наиболее успешные программы основаны на интенсивной химиотерапии с включением высоких доз метотрексата и цитарабина, а также на применении дексаметазона в качестве базового кортикостероида. Частота достижения клинико-гематологической ремиссии в группе пациентов первого года жизни составляет 89–94%, что лишь немного ниже аналогичного показателя для больных ОЛЛ в целом, однако высокая частота ранних рецидивов и их резистентность к терапии второй линии резко ухудшают отдаленные результаты лечения. Причинами неэффективности стандартной химиотерапии являются особенности биологии заболевания, проявляющиеся первичной устойчивостью к ряду химиопрепаратов, а также особенности метаболизма лекарствен-

ных веществ у детей раннего возраста, которые могут приводить как к недостаточной экспозиции к химиопрепаратам, так и к избыточной их токсичности [95]. Единного универсального подхода к дозированию химиопрепаратов у детей первого года жизни нет, и формулирование рациональных рекомендаций требует детальных фармакокинетических исследований.

Неблагоприятными прогностическими факторами для пациентов младшего возраста являются плохой ранний ответ на терапию, возраст менее 3 мес и перестройка 11q23. Значение *MLL*-статуса подчеркивается результатами недавних исследований, показавших, что при интенсификации терапии 5-летняя бессобытийная выживаемость в группе без перестройки гена *MLL* достигает 94%, в то время как при аналогичной терапии бессобытийная выживаемость в группе с реаранжировкой *MLL* составила 40% [96, 97].

Высокая частота инициального поражения ЦНС делает актуальным вопрос о методах терапии и профилактики нейролейкоза. Традиционно основой ЦНС-терапии у пациентов раннего возраста было краниальное облучение, однако анализ отдаленных результатов лечения показал, что, несмотря на эффективный контроль нейролейкоза, существенного влияния на частоту ранних рецидивов, а также на общую и бессобытийную выживаемость лучевая терапия не оказывает. Тяжелые последствия краниального облучения особенно выражены у детей до 1 года. Такие осложнения, как задержка роста, патология эндокринной системы, отставание в психомоторном развитии, а также риск формирования вторичных опухолей головного мозга стали основанием для полного отказа от краниального облучения в современных протоколах. Контроль нейролейкемии достигается применением интратекальной терапии и интенсификацией системной терапии с включением высоких доз антиметаболитов.

Одним из наиболее дискутируемых вопросов остаются показания к выполнению аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [98–100]. Безусловно, ТГСК как метод радикальной интенсификации терапии представляется логичным выбором для пациентов высокого риска, однако убедительных доказательств эффективности ТГСК в данной группе пациентов до настоящего момента не получено, равно как не существует и веских доказательств обратного. Так, анализ небольших групп пациентов, получавших терапию в рамках стандартных протоколов, не выявил преимуществ трансплантации в сравнении с интенсивной химиотерапией. С другой стороны, ретроспективный анализ результатов трансплантаций, выполненных в крупных специализированных центрах, показал высокую противолейкемическую эффективность: 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 76% для пациентов, которым трансплантация выполнена в первой полной ремиссии, независимо от реаранжировки гена *MLL*.

Вероятно, часть острых вопросов, касающихся оптимальной тактики ведения пациентов раннего возраста с ОЛЛ, будет разрешена на основании результатов двух крупных мультицентровых исследований: международного Interfant и североамериканского протокола в рамках COG.

В настоящее время показанием для трансплантации в первой ремиссии от родственного совместимого донора является, на наш взгляд, выявление перестройки гена *MLL*. Показаниями для выполнения транспланта-

Таблица 4. Поздние осложнения терапии ОЛЛ у детей

Осложнение	Причина /факторы риска	Возможные пути преодоления
Задержка роста	Краниальное облучение, кортикостероиды	Исключение /снижение дозы краниального облучения, терапия гормоном роста (?)
Эндокринопатии	Краниальное облучение	Исключение /снижение дозы краниального облучения, своевременная заместительная гормональная терапия
Задержка психического развития и снижение интеллекта	Краниальное облучение, интенсивная интратекальная терапия, социальная депривация	Исключение /снижение дозы краниального облучения, оптимизация интратекальной терапии, программы психологической поддержки/развития
Остеопороз	Кортикостероиды, подростковый возраст, женский пол, ограничение физической нагрузки	Модификация дополнительных факторов риска (кальций, витамин D), терапия: (бисфосфонаты (?), аналоги паратгормона(?), контролируемая физическая нагрузка
Асептический некроз костей	Кортикостероиды, подростковый возраст, женский пол	Оптимизация режимов введения кортикостероидов, ранняя МРТ-диагностика, агрессивная физиотерапия, ортопедическое пособие
Кардиопатия	Антрациклины	Ограничение кумулятивной дозы антрациклинов, применение кардиопротекторов (дексразоксан (?))
Вторичные опухоли ЦНС	Краниальное облучение, полиморфизм ТПМТ, ранний возраст	Исключение краниального облучения
Вторичный лейкоз	Краниальное облучение, применение алкилирующих агентов, эпиподофиллотоксинов	Исключение краниального облучения, отказ от применения эпиподофиллотоксинов
Иммунодефицит	Интенсивная полихимиотерапия, ранний возраст	Программа ревакцинации для избранных пациентов

*Примечание.* (?) – безопасность и эффективность терапии не изучены.

ции от альтернативного донора являются плохой ранний ответ на терапию и/или сохранение высокого уровня ИОБ по завершении индукции/консолидации.

#### **Сопроводительная терапия**

В лечении ОЛЛ применяются противоопухолевые препараты с низким терапевтическим индексом, лечебный эффект которых неотделим от токсического воздействия. Краеугольным камнем успеха в лечении ОЛЛ у детей остается сопроводительная терапия – комплекс мер, направленных на минимизацию нежелательных последствий химиотерапии и предотвращение жизнеугрожающих осложнений основного заболевания [101]. Основными показателями качества сопроводительной терапии являются ранняя (индукционная) летальность и смерть в ремиссии. В современных западных протоколах эти показатели составляют суммарно около 3–4%, в то время как в развивающихся странах доля пациентов, умерших от осложнений в процессе лечения, составляет до 15%, что оказывает огромное влияние на результаты терапии в целом.

В области профилактики ранних метаболических осложнений стандартом являются адекватная внутривенная гидратация, защелачивание мочи, коррекция электролитных нарушений, назначение аллопуринола для профилактики уратной нефропатии. Для пациентов с высоким риском развития синдрома лизиса опухоли обязателен доступ к методам экстакорпоральной поддержки. Важным достижением последних лет стало внедрение в клиническую практику рекомбинантной урат-оксидазы (Rasburicase) – препарата, эффективно предотвращающего развитие уратной нефропатии и острой почечной недостаточности у абсолютного большинства пациентов [102, 103].

Основная причина летальности в группе пациентов, достигших ремиссии, – инфекционные осложне-

ния, поэтому профилактика и лечение инфекций являются, безусловно, важнейшими элементами сопроводительной терапии. Базовые принципы антимикробной терапии детей с ОЛЛ включают универсальную профилактику пневмоцистной пневмонии триметоприм/сульфаметоксазолом на протяжении всего периода лечения; эмпирическую антимикробную терапию в соответствии с этапом лечения, уровнем и характером медикаментозной иммуносупрессии. Важнейшим условием успешной терапии нейтропенических инфекций является создание четких, обязательных к исполнению стандартов эмпирической терапии и круглосуточный доступ пациентов к оказанию стационарной помощи, включая отделения интенсивной терапии [104]. Современные противогрибковые препараты, такие как вориконазол, каспофунгин и липидные формы амфотерицина В, позволяют эффективно контролировать грибковую инфекцию, не прерывая противоопухолевую терапию и сводя на нет негативное влияние инвазивных микозов на исход лечения. Возможно, наибольшее значение для профилактики инфекций имеет обучение пациентов и их родителей элементарным принципам гигиены, таким как мытье рук и тщательный уход за полостью рта во время мукотоксической терапии.

Тактика трансфузионной поддержки у пациентов с ОЛЛ в целом соответствует стандартам, принятым в онкогематологии. Следует дополнительно подчеркнуть необходимость лейкодеплеции и  $\gamma$ -облучения компонентов крови, а также совершенствования обследования доноров на гемотрансмиссивные инфекции, в частности вирусные гепатиты. Внедрение тестирования на основе ПЦР в диагностику вирусных гепатитов позволило в развитых странах снизить частоту трансфузионных гепати-

тов до 1 на 300 000 трансфузий – цифры, фантастические для современной России.

#### Поздние осложнения

Цель современной терапии ОЛЛ у детей – не только биологическое выздоровление, т.е. полная эрадикация опухоли, но и полноценная социальная адаптация, важным условием которой является соматическое здоровье. Достижение предельной эффективности терапии, отраженной в показателях долгосрочной общей и бессобытийной выживаемости, превышающих 90%, смещает акцент будущих исследований в сторону снижения частоты инвалидизирующих последствий лечения [105–108]. Наиболее значимые поздние осложнения, их этиология и возможные пути преодоления суммированы в табл. 4.

#### Перспективы

Излечение ОЛЛ у 90% пациентов стало возможным благодаря последовательной оптимизации режимов программной химиотерапии, в состав которой входят 7 основных химиопрепаратов, внедренных в практику более 25 лет назад. Представляется, что предел эффективности стандартной химиотерапии достигнут, и прогресс в области терапии ОЛЛ у детей будет связан с

появлением нового поколения препаратов, разработанных исходя из расшифрованных молекулярных механизмов развития конкретного клинико-биологического варианта ОЛЛ. Можно предположить, что анализ профиля экспрессии ограниченного набора значимых генов на микрочипах позволит уже на ранних этапах диагностики предсказывать чувствительность опухолевых клеток к определенному набору химиопрепаратов, а также выявлять индивидуальные особенности метаболизма лекарственных препаратов, требующие коррекции доз и режимов введения. Внедрение в практику простых и надежных методов оценки остаточной опухолевой популяции позволит на первом этапе терапии достоверно выявлять группу пациентов высокого риска, требующих максимальной интенсификации терапии, включая выполнение ТГСК. Совершенствование режимов трансплантации сделает эту процедуру более безопасной и доступной.

Следует подчеркнуть, что высокие технологии и новые препараты в ближайшем будущем не отменят необходимость развития элементарной инфраструктуры и соблюдения простейших принципов сопроводительной терапии.

### Л и т е р а т у р а

- Shu X.O. Epidemiology of childhood leukemia. *Curr Opin Hematol* 1997;4(4):227–32.
- Spector L.G., Ross J.A., Robinson L.L. Epidemiology and Etiology. In: *Childhood leukemias*, C.-H. Pui (ed.), 2nd ed. Cambridge University Press, 2006.
- Pui C.-H. Acute lymphoblastic leukemia. In: *Childhood leukemias*. C.-H. Pui (ed.), 2nd ed. Cambridge University Press, 2006.
- Jonsson O.G., Sartain P., Ducore J.M., Buchanan G.R. Bone pain as an initial symptom of childhood acute lymphoblastic leukemia: association with nearly normal hematologic indexes. *J Pediatr* 1990;117(2 Pt 1):233–7.
- Gajjar A., Ribeiro R.C., Mahmoud H.H. et al. Overt testicular disease at diagnosis is associated with high risk features and a poor prognosis in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1996;78(11):2437–42.
- Chicot R.R., Coccia P., Sather H.N. et al. Mediastinal mass in acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1984;12(1):9–16.
- Riley R.S., Massey D., Jackson-Cook C. et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16(2):245–99.
- Basso G., Buldini B., De Zen L., Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86(7):675–92.
- Farhi D.C., Rosenthal N.S. Acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lab Med* 2000;20(1):17–28.
- Ludwig W.D., Raghavachar A., Thiel E. Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1994;7(2):235–62.
- Reddy K.S., Perkins S.L. Advances in the diagnostic approach to childhood lymphoblastic malignant neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004;122 (Suppl):S3–18.
- Mrozek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18(2):115–36.
- Harrison C.J., Feroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2002;6(2):91–113.
- Pui C.H., Crist W.M., Look A.T. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76(8):1449–63.
- Nasedkina T.V., Zharinov V.S., Isaeva E.A. et al. Clinical screening of gene rearrangements in childhood leukemia by using a multiplex polymerase chain reaction-microarray approach. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5620–9.
- Raimondi S.C. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;81(9):2237–51.
- Johansson B., Mertens F., Mitelman F. Clinical and biological importance of cytogenetic abnormalities in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Ann Med* 2004;36(7):492–503.
- Carroll W.L., Bhojwani D., Min D.J. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46(5):570–8.
- van Delft F.W., Bellotti T., Luo Z. et al. Prospective gene expression analysis accurately subtypes acute leukaemia in children and establishes a commonality between hyperdiploidy and t(12;21) in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;130(1):26–35.
- Moos P.J., Raetz E.A., Carlson M.A. et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3118–30.
- Teuffel O., Betts D.R., Dettling M. et al. Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins. *Leukemia* 2004;18(10):1624–9.
- Taub J.W., Ge Y. The prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004;45(1):19–25.
- Greaves M.F., Maia A.T., Wiemels J.L., Ford A.M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003;102(7):2321–33. Epub 2003 Jun 5.
- Yagi T., Hibi S., Tabata Y. et al. Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(1):264–8.
- Wiemels J.L., Cazzaniga G., Daniotti M. et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999;354(9189):1499–503.
- Gale K.B., Ford A.M., Repp R. et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(25):13950–4.
- Greaves M.F., Maia A.T., Wiemels J.L., Ford A.M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003;102(7):2321–33. Epub 2003 Jun 5.
- Kempski H.M., Sturt N.T. The TEL-AML1 fusion accompanied by loss of the untranslocated TEL allele in B-precursor acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Leuk Lymphoma*

- 2000;40(1–2):39–47.
29. Pui C.H., Sandlund J.T., Pei D. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004;104(9):2690–6.
30. Rivera G.K., Pinkel D., Simone J.V. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med* 1993;329(18):1289–95.
31. Maurus R., Boilletot A., Otten J. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children with the BFM protocol: a cooperative study and analysis of prognostic factors. *Haematol Blood Transfus* 1987;30:466–70.
32. Pammond D., Sather H., Nesbit M. et al. Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986;14(3):124–34.
33. Ludwig W.D., Harbott J., Bartram C.R. et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Recent Results Cancer Res* 1993;131:269–82.
34. Pui C.H., Behm F.G., Singh B. et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 1990;75(1):198–202.
35. Shuster J.J., Falletta J.M., Pullen D.J. et al. Prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1990;75(1):166–73.
36. Crist W., Boyett J., Jackson J. et al. Prognostic importance of the pre-B-cell immunophenotype and other presenting features in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1989;74(4):1252–9.
37. Miller D.R., Leikin S.L., Albo V.C. et al. Three versus five years of maintenance therapy are equivalent in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1989;7(3):316–25.
38. Maloney K.W., Shuster J.J., Murphy S. et al. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986–1994. *Leukemia* 2000;14(12):2276–85.
39. Silverman L.B., Declerck L., Gelber R.D. et al. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981–1995). *Leukemia* 2000;14(12):2247–56.
40. Kamps W.A., Veerman A.J., van Wering E.R. et al. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984–1991. *Leukemia* 2000;14(12):2240–6.
41. Harms D.O., Janka-Schaub G.E. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 2000;14(12):2234–9.
42. Gaynon P.S., Trigg M.E., Heerema N.A. et al. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983–1995. *Leukemia* 2000;14(12):2223–33.
43. Schrappe M., Reiter A., Zimmermann M. et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia* 2000;14(12):2205–22.
44. Карачунский А.А., Самочатова Е.В., Штакельберг А., Румянцев А.Г. Сравнение протоколов ALL-BFM-90 ALL-MB-91 для лечения острого лимфобластного лейкоза у детей. *Педиатрия* 1995;(2):10.
45. Schrappe M., Camitta B., Pui C.H. et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(12):2193–4.
46. Dordelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94(4):1209–17.
47. Asselin B.L., Kreissman S., Coppola D.J. et al. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21(1):6–12.
48. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Breneman J.C. et al. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia--the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996;14(2):389–98.
49. Miller D.R., Coccia P.F., Bleyer W.A. et al. Early response to induction therapy as a predictor of disease-free survival and late recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1989;7(12):1807–15.
50. Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.D. et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994;84(9):3122–33.
51. Hutchinson R.J., Gaynon P.S., Sather H. et al. Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group Trial 1881. *J Clin Oncol* 2003;21(9):1790–7.
52. Nachman J.B., Sather H.N., Sensel M.G. et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med* 1998;338(23):1663–71.
53. Silverman L.B., McLean T.W., Gelber R.D. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80(12):2285–95.
54. Nachman J., Sather H.N., Gaynon P.S. et al. Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significance of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997;15(6):2222–30.
55. Arico M., Valsecchi M.G., Conter V. et al. Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. *Blood* 2002;100(2):420–6.
56. Lange B.J., Bostrom B.C., Cherlow J.M. et al. Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 2002;99(3):825–33.
57. Relling M.V., Hancock M.L., Boyett J.M. et al. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;93(9):2817–23.
58. Relling M.V., Hancock M.L., Rivera G.K. et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(23):2001–8.
59. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12 000 randomised children. *Childhood ALL Collaborative Group. Lancet* 1996;347(9018):1783–8.
60. Gale R.P., Butturini A. Maintenance chemotherapy and cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1991;338(8778):1315–8.
61. Schmiegelow K. Prognostic significance of methotrexate and 6-mercaptopurine dosage during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1991;8(4):301–12. Erratum: *Pediatr Hematol Oncol* 1992;9(2):following 198.
62. Koren G., Ferrazini G., Sulh H. et al. Systemic exposure to mercaptopurine as a prognostic factor in acute lymphocytic leukemia in children. *N Engl J Med* 1990;323(1):17–21.
63. Pinkel D., Woo S. Prevention and treatment of meningeal leukemia in children. *Blood* 1994;84(2):355–66.

64. Aur R.J., Simone J., Hustu H.O. et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of Childhood lymphocytic leukemia. *Blood* 1971;37(3):272–81.
65. Sullivan M.P., Chen T., Dyment P.G. et al. Equivalence of intrathecal chemotherapy and radiotherapy as central nervous system prophylaxis in children with acute lymphatic leukemia: a pediatric oncology group study. *Blood* 1982;60(4):948–58.
66. Jones B., Freeman A.I., Shuster J.J. et al. Lower incidence of meningeal leukemia when prednisone is replaced by dexamethasone in the treatment of acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1991;19(4):269–75.
67. Tubergen D.G., Gilchrist G.S., O'Brien R.T. et al. Prevention of CNS disease in intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: comparison of cranial radiation and intrathecal methotrexate and the importance of systemic therapy: a Childrens Cancer Group report. *J Clin Oncol* 1993;11(3):520–6.
68. Gajjar A., Harrison P.L., Sandlund J.T. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(10):3381–4.
69. Dutch Childhood Oncology Group; te Loo D.M., Kamps W.A., van der Does-van den Berg A. et al. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 2006;24(15):2332–6.
70. Pui C.H., Mahmoud H.H., Rivera G.K. et al. Early intensification of intrathecal chemotherapy virtually eliminates central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92(2):411–5.
71. Kamps W.A., Bokkerink J.P., Hakvoort-Cammel F.G. et al. BFM-oriented treatment for children with acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation and treatment reduction for standard risk patients: results of DCLSG protocol ALL-8 (1991–1996). *Leukemia* 2002;16(6):1099–111.
72. Relling M.V., Rubnitz J.E., Rivera G.K. et al. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999;354(9172):34–9.
73. Szczepanski T., Orfao A., van der Velden V.H. et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001;2(7):409–17.
74. van der Velden V.H., Hochhaus A., Cazzaniga G. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17(6):1013–34.
75. Szczepanski T., Flohr T., van der Velden V.H. et al. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15(1):37–57.
76. San Miguel J.F., Ciudad J., Vidrales M.B. et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;32(3):175–85.
77. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003;121(6):823–38.
78. Campana D., Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15(1):1–19.
79. van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901–28.
80. 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 leukemia. *Blood* 2002;100(1):52–8.
81. 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.
82. Biondi A., Valsecchi M.G., Seriu T. et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM group. *Leukemia* 2000;14(11):1939–43.
83. van Dongen J.J., Seriu T., Panzer-Grumayer E.R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731–8.
84. Uckun F.M., Nachman J.B., Sather H.N. et al. Poor treatment outcome of Philadelphia chromosome-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia despite intensive chemotherapy. *Leuk Lymphoma* 1999;33(1–2):101–6.
85. Uckun F.M., Nachman J.B., Sather H.N. et al. Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary intensive therapies: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 1998;83(9):2030–9.
86. Cazzaniga G., Lanciotti M., Rossi V. et al. Prospective molecular monitoring of BCR/ABL transcript in children with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *Br J Haematol* 2002;119(2):445–53.
87. Arico M., Valsecchi M.G., Camitta B. et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342(14):998–1006.
88. Schrappe M., Arico M., Harbott J. et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* 1998;92(8):2730–41.
89. Jones L.K., Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol* 2005;130(4):489–500.
90. Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H. et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344(14):1038–42. Erratum: *N Engl J Med* 2001;345(3):232.
91. Thomas D.A., Faderl S., Cortes J. et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004;103(12):4396–407.
92. Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui C.H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000;96(1):24–33.
93. Chessells J.M., Harrison C.J., Watson S.L. et al. Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987–1999. *Br J Haematol* 2002;117(2):306–14.
94. Ferster A., Benoit Y., Francotte N. et al. Treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Children Leukemia Cooperative Group--EORTC. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Blood* 2000;95(8):2729–31.
95. Ramakers-van Woerden N.L., Beverloo H.B., Veerman A.J. et al. In vitro drug-resistance profile in infant acute lymphoblastic leukemia in relation to age, MLL rearrangements and immunophenotype. *Leukemia* 2004;18(3):521–9.
96. Kosaka Y., Koh K., Kinukawa N. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104(12):3527–34.
97. Nagayama J., Tomizawa D., Koh K. et al. Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood* 2006;107(12):4663–5. Epub 2006 Feb 14.
98. Jacobsohn D.A., Hewlett B., Morgan E. et al. Favorable outcome for infant acute lymphoblastic leukemia after hematopoietic stem cell transplantation.

- Biol Blood Marrow Transplant 2005;11(12):999–1005.
99. Pui C.H., Gaynon P.S., Boyett J.M. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359(9321):1909–15.
100. Sanders J.E., Im H.J., Hoffmeister P.A. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105(9):3749–56.
101. Supportive care of children with cancer: Current therapy and guidelines from the Children's Oncology Group The Johns Hopkins University Press. A.J. Altman (ed.). 3rd ed. 2004.
102. Macfarlane R.J., McCully B.J., Fernandez C.V. Rasburicase prevents tumor lysis syndrome despite extreme hyperleukocytosis. *Pediatr Nephrol* 2004;19(8):924–7.
103. Bosly A., Sonet A., Pinkerton C.R. et al. Rasburicase (recombinant urate oxidase) for the management of hyperuricemia in patients with cancer: report of an international compassionate use study. *Cancer* 2003;98(5):1048–54.
104. Hughes W.T., Armstrong D., Bodey G.P. et al. 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1997;25(3):551–73.
105. Leung W., Hudson M., Zhu Y. et al. Late effects in survivors of infant leukemia. *Leukemia* 2000;14(7):1185–90.
106. Walter A.W., Hancock M.L., Pui C.H. et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3761–7.
107. Bhatia S. Late effects among survivors of leukemia during childhood and adolescence. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31(1):84–92.
108. Shusterman S., Meadows A.T. Long term survivors of childhood leukemia. *Curr Opin Hematol* 2000;7(4):217–22.

## ЛЕЧЕНИЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

А.В. Попа, С.А. Маякова

Институт детской онкологии и гематологии РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN

A.V. Popa, S.A. Mayakova

Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*The results of treatment in children with acute myeloid leukemia (AML) have considerably improved in the past 15 years. Whether cranial irradiation, maintenance therapy, and hematopoietic stem cell transplantation should be used during the first remission remains unclear. This paper presents the history of development of AML treatment in children, the potentialities of current chemotherapy, and indications for allogeneic and autologous hemopoietic stem cell transplantation in accordance with the data obtained by different groups of investigators, including ones from Russia. The Institute of Pediatric Oncology and Hematology (IPOH), Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, has developed and introduced an IPOH AML protocol in 2002. From July 2002 to January 2006, 40 patients were enrolled in this study and stratified into 3 risk groups: 1) a standard risk group ( $n = 10 - 28.6\%$ ); 2) an intermediate risk group ( $17 - 48,6\%$ ), and 3) a high risk group ( $n = 8 - 22.9\%$ ). Three-year relapse-free survival was  $40 \pm 12\%$ .*

**Key words:** acute myeloid leukemia in children, treatment

Результаты лечения детей, больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), за последние 15 лет существенно улучшились благодаря, в первую очередь, применению системной терапии.

Первые попытки создания рандомизированного протокола для лечения детей с ОМЛ были предприняты в США Научно-исследовательским детским госпиталем им. Св. Иуды в 1968 г. В исследование были включены 58 детей, и только один больной прожил 5 лет [1]. По данным голландских исследователей, из 57 детей, больных ОМЛ, лечившихся по протоколам, предназначенным для детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), ни один больной не выжил [2]. Во Франции и Великобритании дети с ОМЛ получали лечение согласно протоколам, предназначенным для взрослых больных, и также с плачевными результатами. В начале 1970-х годов был создан первый протокол группы CCG-102, состоявший из 4–7 курсов химиотерапии с интервалами между курсами 14 дней и поддерживающей терапии. Каждый курс химиотерапии состоял из винкристина, преднизолона, цитозинарабинозида (Ага-С), 6-тиогуанина (6-ТГ) и циклофосфамида. Поддерживающая терапия длилась от 3 до 5 лет и заключалась в ежедневном приеме 6-ТГ и четырехдневном назначении Ага-С в сочетании с циклофосфаном каждые 28 дней. Шестилетняя безрецидивная выживаемость (БРВ) составила всего 14% [3], несмотря на это

протокол CCG-102 решил одну из главных задач – был разработан режим химиотерапии. С этого времени интервал от 14 до 21 дня между курсами химиотерапии при лечении детей с ОМЛ стал стандартным. Ни профилактика лейкозного поражения ЦНС, ни различные виды трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) не были включены в это исследование. Более успешные результаты (6-летняя бессобытийная выживаемость – БСВ – 38%) были получены в Европе и США в середине 1970-х годов после применения протоколов терапии, основанных на применении антиметаболитов и антрациклиновых антибиотиков: 7+3 (Ага-С и даунорубомицин) или DAT (даунорубомицин, Ага-С, 6-ТГ) [4–6]. Следовательно, в 1970-х годах было показано, что основными препаратами для лечения детей с ОМЛ являются Ага-С (200 мг/м<sup>2</sup>/сут), даунорубомицин (60 мг/м<sup>2</sup>/сут) и 6-ТГ (50 мг/м<sup>2</sup>/сут), а интервалы между курсами химиотерапии должны быть не более 21 дня.

Группа исследователей BFM из Германии (Берлин – Франкфурт – Мюнстер) в протоколах AML-BFM 83 и AML-BFM 87 индукции ремиссии предложила увеличить суммарную дозу даунорубомицина до 180 мг/м<sup>2</sup>, сохраняя невысокие дозы Ага-С 100 – 200 мг/м<sup>2</sup>/сут в 1–8-й дни, и добавить этопозид в суммарной дозе 500 мг/м<sup>2</sup>. Полная ремиссия была достигнута в 76,4% случаев в протоколе AML-BFM 83 и 74,9% в протоколе AML-BFM 87.

Таблица 1. Стратификация детей с ОМЛ на различные группы риска согласно результатам протокола AML-BFM 83 [13]

Вариант ОМЛ	Группа риска I 6-летняя БСВ > 80% (стандартный риск)	Группа риска II 6-летняя БСВ < 45% (высокий риск)
FAV M1	Палочки Ауэра есть	Палочек Ауэра нет
FAV M2	Л. < 20×10 <sup>9</sup> /л	Л. > 20×10 <sup>9</sup> /л
FAV M3	Все *	—
FAV M4	Эозинофилы в пунктате костного мозга 3%	—
FAV M5	—	Все
FAV M6	Все *	—
FAV M7	—	Все *
Дополнительный фактор для группы риска II: время достижения ремиссии		> 10 нед

*Примечание.* \* Малое количество больных.

Терапия консолидации ремиссии состояла из 8-недельного (AML-BFM 83) и 6-недельного (AML-BFM 87) курсов химиотерапии (Ага-С 75 мг/м<sup>2</sup>/сут №32 и 24 соответственно, даунорубомицин 30 мг/м<sup>2</sup> №4 в суммарной дозе 120 мг/м<sup>2</sup>, 6-ТГ 60 мг/м<sup>2</sup> ежедневно, циклофосфан 500 мг/м<sup>2</sup> №2, винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup>/сут №4). После консолидации ремиссии проводилась поддерживающая терапия до 24 мес от начала лечения, состоявшая из 4-дневных курсов Ага-С (40 мг/м<sup>2</sup>/сут) каждые 28 дней, ежедневного приема 6-ТГ (40 мг/м<sup>2</sup>/сут) и доксорубина (25 мг/м<sup>2</sup>/сут) 1 раз в 56 дней. Даунорубомицин назначался до достижения суммарной дозы антрациклинов 400 мг/м<sup>2</sup>. Пятилетняя БСВ детей с ОМЛ, получивших лечение по протоколу AML-BFM 83, составила 47±4% [7].

Следует отметить, что основным в исследовании AML-BFM 87 был вопрос о необходимости краниального облучения и возможности замены его на 2 курса химиотерапии, содержащей высокие дозы Ага-С. Поэтому в протоколе AML-BFM 87 после консолидации в терапию были добавлены 2 курса ранней интенсификации, состоявшие из высоких доз Ага-С (3000 мг/м<sup>2</sup>) и этопозида (суммарная доза 500 мг/м<sup>2</sup>) — НАЕ. Профилактическое краниальное облучение в дозе 18 Гр проводилось в начале поддерживающей терапии. Больные без инициального поражения ЦНС делились на 2 группы: получивших краниальное облучение и без облучения ЦНС. Поддерживающая терапия была такой же, как и в протоколе AML-BFM 83, за исключением доксорубина, и была короче — до 18 мес от начала лечения. Первые результаты показали, что отказ от облучения ЦНС привел к существенному увеличению рецидивов с лейкозным поражением ЦНС и костного мозга. Детальный анализ вероятности развития рецидивов в рандомизированных и нерандомизированных группах пациентов продемонстрировал необходимость проведения краниального облучения с целью профилактики лейкозного поражения ЦНС. Для пациентов, не подвергшихся рандомизации, вероятность развития рецидивов в группе, которой было проведено облучение ЦНС, была значительно меньше, чем в группе больных, которым краниальное облучение не проводилось: 29±5 и 50±6% соответственно ( $p=0,001$ ) и в рандомизированных группах — 33±14 и 56±12% соответствен-

но ( $p=0,12$ ). Полная ремиссия была достигнута у 75% детей, 5-летняя БСВ, БРВ и общая выживаемость (ОВ) составили 41±3, 49±3 и 55±3 соответственно [8].

Результаты доклинических исследований идарубицина *in vitro*, показавшие его большую эффективность, а также сокращение выраженности множественной лекарственной резистентности по сравнению с даунорубицином [9, 10], позволили в протоколе AML-BFM 93 провести рандомизированное исследование между курсами индукции ремиссии ADE и AIE (Ага-С, идарубин, этопозид). Кроме того, больным, относившимся к группе высокого риска, проводилась вторая рандомизация: после окончания ADE на 21-й день начиналась терапия НАМ (высокие дозы Ага-С и митоксантрон) с последующим 6-недельным курсом консолидации, в другой группе — 6-недельный курс консолидации с последующим курсом НАМ. В дальнейшем всем больным осуществлялись курсы химиотерапии НАЕ и поддерживающая терапия до 18 мес, считая от начала терапии индукции ремиссии. Полная ремиссия была достигнута у 82% больных, пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ составили 502, 613 и 572% соответственно. Была отмечена достоверная разница в ответе на терапию к 15-му дню между больными, получившими ADE и AIE: в пунктате костного мозга количество бластов более 5% было соответственно в 31 и 17% случаев,  $p=0,01$  [11]. В то же время не было выявлено значимой разницы в пятилетней БСВ между больными, получившими ADE или AIE: 574 и 604% соответственно ( $p=0,55$ ) [11, 12]. Практически одинаковые БСВ, БРВ и ОВ были получены в обеих группах больных при использовании второй рандомизации (НАМ после ADE или после 6-недельной консолидации) — 495 и 415%; 566 и 496%; 575 и 545% соответственно. Несколько лучшая БСВ была в группе больных, получивших индукцию ремиссии ADE + НАМ, чем ADE + 6-недельный курс консолидации.

Заметное улучшение выживаемости больных ОМЛ при применении протокола AML-BFM 93 по сравнению с предыдущими исследованиями в большей степени было связано с улучшением сопроводительной терапии и снижением уровня ранней смертности.

Следует отметить, что группа BFM в исследованиях AML-BFM 83 и AML-BFM 87 впервые определила гемато-

логические и морфологические признаки прогноза ОМЛ у детей (табл. 1) [13]. К сожалению, в исследовании было включено недостаточное количество детей с FAB М6 (7 детей) и FAB М7 (3 ребенка), поэтому адекватно оценить прогноз у этих пациентов не представлялось возможным.

Итак, группа VFM на основании данных собственных исследований доказала необходимость краниального облучения у всех детей, больных ОМЛ, а повышение выживаемости больных было связано не только с интенсификацией химиотерапии, но и с адекватной сопроводительной терапией.

В исследовании группы из Великобритании MRC AML 9 было показано отсутствие эффективности поддерживающей терапии больным ОМЛ после проведения интенсивной консолидирующей терапии, поэтому в последующих исследованиях ими поддерживающая терапия не применялась.

Одной из задач последующего исследования MRC AML 10 было сравнение двух режимов индукции ремиссии, состоявших или из двух курсов химиотерапии DAT 3+10 или ADE 10+3+5 (Ага-С, даунорубомицин и этопозид). Другой задачей было выявление роли ТГСК после интенсивной консолидирующей терапии. Алло-ТГСК была проведена всем больным, имевшим полностью совместимого родственного донора. Больных, у которых не было совместимого донора, разделяли на 2 группы: 1-й проводилась ауто-ТГСК после двух интенсивных курсов консолидации ремиссии (забор костного мозга производился после 3-го курса химиотерапии); 2-й после окончания консолидации ремиссии лечение не проводилось. Суммарная доза антрациклинов и Ага-С в обеих группах была одинаковой — 550 и 10,6 г/м<sup>2</sup>, а этопозид различалась — 500 и 1500 мг/м<sup>2</sup>.

В результате лечения детей с ОМЛ согласно протоколу MRC AML 10 ремиссия была достигнута у 93% больных, при этом ранняя смертность составила лишь 4%, а пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ — 49, 53 и 58% соответственно. Не было получено достоверной разницы в количестве полных ремиссий при применении различных курсов индукции. Недостаточно выше были БСВ, БРВ и ОВ у больных, получавших индуктивную химиотерапию, которая состояла из двух курсов ADE, по сравнению с DAT. ОВ была несколько выше у больных, подвергшихся ауто-ТГСК (70%), по сравнению с больными, которым терапия была остановлена после проведения двух курсов интенсификации (58%). Достоверно снижалась вероятность развития рецидива после проведения ауто-ТГСК — 31 и 52% соответственно ( $p=0,03$ ). Десятилетняя БРВ также была значительно лучше у больных после ауто-ТГСК: 68 и 44% соответственно ( $p=0,02$ ) [14]. Десятилетняя ОВ больных, получивших алло-ТГСК, была недостаточно выше, чем пациентов, нуждавшихся в алло-ТГСК, но не подвергшихся ей в связи с отсутствием полностью совместимого родственного донора — 68 и 59% соответственно ( $p=0,3$ ) [14].

В отличие от VFM в данном исследовании детей с ОМЛ разделяли на 3 группы риска, основываясь на результатах кариотипа и ответа на первый курс химиотерапии.

В следующем исследовании группы MRC — MRC AML 12 — в индукции ремиссии проводилось сравнение двух курсов химиотерапии MAE (митоксантрон, Ага-С, этопозид) и двух курсов ADE. Кроме того, на основании результатов, полученных в предыдущих исследованиях, больные ОМЛ были стратифицированы на группы низкого и высокого риска. В группе низкого рис-

ка исследовалась длительность консолидирующей терапии — 2 или 3 курса. В группе высокого риска больным, у которых не было полностью совместимого родственного донора, проводили терапию, аналогичную терапии пациентов с низким риском, а детям с ОМЛ, у которых был полностью совместимый родственный донор, проводилась алло-ТГСК сразу после первого или второго курса консолидации. Данный протокол должен был решить следующие задачи: оценить возможность снижения дозы антрациклинов за счет замены даунорубомицина на митоксантрон в индукции ремиссии; определить необходимое количество курсов химиотерапии для лечения детей с низким и высоким риском без проведения алло-ТГСК; установить значение и место алло-ТГСК у детей с ОМЛ, относящихся к группе высокого риска.

Полная ремиссия была достигнута у 92% больных, 4% детей не достигли ремиссии в связи с рефрактерностью к проведенной терапии и 4% больных умерли в течение 14 дней от начала лечения. Пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ были 56, 61 и 66% соответственно. Практически одинаковое количество полных ремиссий было у больных, получавших даунорубомицин и митоксантрон в терапии индукции — 90 и 92% соответственно ( $p=0,3$ ); также не было различий в резистентности к проведенному лечению и ранней смертности в обеих группах. Пятилетняя БРВ была значимо выше в группе детей с ОМЛ, получавших терапию индукции ремиссии с митоксантроном, чем с даунорубомицином — 68 и 59% соответственно ( $p=0,04$ ), а ОВ не различалась — 70 и 64% ( $p=0,1$ ). Кроме того, не было достоверной разницы в 5-летней ОВ и БРВ между больными, получившими 4 или 5 курсов химиотерапии: 81 и 78% ( $p=0,5$ ); 65 и 66% ( $p=0,8$ ). Вероятность развития рецидива также была одинаковой.

Алло-ТГСК от родственного полностью совместимого донора была проведена только 35 больным, включенным в данное исследование. Пациентов, лечившихся по протоколу MRC AML 10 и MRC AML 12 и подвергшихся алло-ТГСК, объединили в одну группу, учитывая небольшое количество больных и одинаковую вероятность развития рецидива при применении обоих протоколов. Как оказалось, вероятность развития рецидива после проведения алло-ТГСК была достоверно ниже, но этот результат нельзя интерполировать на БРВ и ОВ из-за большого числа неудач при достижении повторных ремиссий.

Таким образом, исследования MRC AML 10 и MRC AML 12 доказали необходимость включения в индуктивный курс лечения этопозид и митоксантрон. Также было показано, что 5 курсов химиотерапии не улучшали выживаемость больных по сравнению с проведением 4 курсов. Применение алло-ТГСК от полностью совместимого донора во время первой ремиссии нецелесообразно [14].

Как и группа MRC, группа LAME (Франция) для лечения детей с ОМЛ применяла протоколы для взрослых больных ОМЛ до 1989 г. Начиная с 1989 г. был внедрен первый французский протокол для лечения детей с ОМЛ. Протоколы LAME 89 и LAME 91 состоят из терапии индукции ремиссии (Ага-С 200 мг/м<sup>2</sup> в виде 24-часовой инфузии с 1-го по 7-й дни и митоксантрона 12 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–5-й дни), консолидации I (этопозид 100 мг/м<sup>2</sup> 1–4-й дни, 24-часовой инфузии Ага-С 1–4-й дни и даунорубомицина 40 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–4-й дни), консолидации II (четырёхкратная часовая инфузия Ага-С 1 г/м<sup>2</sup>/сут каждые 12 ч 1–2-й дни, аспарагиназа 6000 МЕ/м<sup>2</sup>/сут 3–10-й дни, ам-

сакрин 150 мг/м<sup>2</sup>/сут 4–6-й дни). Поддерживающая терапия назначалась до 18 мес от начала лечения и состояла из ежедневного приема 6-меркаптопурина (25 мг/м<sup>2</sup>/сут) и ежемесячного подкожного введения Ага-С (25 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 ч в течение 4 дней). Профилактика лейкозного поражения ЦНС путем пятикратного эндолюмбального введения метотрексата, Ага-С и преднизолона проводилась только детям, имевшим FAV M4 и M5 морфоцитохимические варианты ОМЛ и инициальное количество лейкоцитов более 50×10<sup>9</sup>/л. Краниальное облучение в суммарной очаговой дозе (СОД) 24 Гр осуществлялось только пациентам с инициальным вовлечением ЦНС в лейкозный процесс. Алло-ТГСК проводилась всем больным, у которых был полностью совместимый родственник донор, после индукции ремиссии и восстановления костного мозга. В протоколе LAME 91 была поставлена задача решить вопрос о необходимости поддерживающей терапии. В связи с этим в результате рандомизации часть больных не получала поддерживающую терапию, а другим больным проводилась поддерживающая терапия до 22 мес от начала лечения.

Полная ремиссия была достигнута у 90% детей с ОМЛ при индукционной смертности 5%, БСВ, БРВ и ОВ составили 48, 53 и 60% соответственно. Результаты применения алло-ТГСК диаметрально отличались от полученных в исследованиях MRC. У больных, подвергнутых алло-ТГСК или получавших только химиотерапию, БРВ не различалась и составляла 57 и 52% соответственно ( $p=0,18$ ). В то же время ОВ существенно различалась и составила 70,5 и 55,4% ( $p=0,006$ ) [15]. Следовательно, вероятность развития рецидива в результате применения алло-ТГСК не уменьшалась, но смертность, связанная с алло-ТГСК, существенно сократилась.

Не было получено достоверной разницы в БРВ у больных, получавших и не получавших поддерживающую терапию – 51 и 62% соответственно ( $p=0,25$ ), однако ОВ была значительно ниже в группе детей с поддерживающей терапией, чем у больных, которым поддерживающая терапия не проводилась, – 59 и 77,6% соответственно ( $p=0,05$ ). Увеличение ОВ в группе больных, не получавших поддерживающую терапию, обусловлено более высокой частотой достижения повторных ремиссий у пациентов при развитии рецидива заболевания [15].

Исходя из полученных результатов протоколов ALME 89 и LAME 91, в 1997 г. был предложен новый протокол LAME SP. Индуктивная химиотерапия стала более интенсивной и состояла из двух частей, при этом вторая часть начиналась с 15–21-го дня от начала первой независимо от уровня лейкоцитов в крови. Первая часть индукции ремиссии состояла из 24-часовой инфузии Ага-С (200 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–4-й дни) и митоксантрона (12 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–3-й дни), а вторая – также из длительной инфузии Ага-С (1–3-й дни) и митоксантрона (1–2-й дни) в той же дозе. Поддерживающая терапия и алло-ТГСК не проводились. Полная ремиссия была достигнута у 84% пациентов, индукционная смертность составила 3%, БСВ, БРВ и ОВ – 54,8, 61,6 и 71,9% соответственно [15].

Из результатов, полученных группой LAME, можно сделать вывод об отсутствии преимущества поддерживающей терапии.

С 1979 по 1995 гг. группой CCG (США) было проведено 3 исследования: CCG 251, CCG 213 и CCG 2891. В протоколе CCG 251, как и в протоколах LAME 89/91, ос-

новной целью было определить значение ранней алло-ТГСК путем сравнения результатов терапии больных, получавших после терапии индукции только химиотерапию в связи с отсутствием полностью совместимого родственного донора, и алло-ТГСК. Постиндуктивная терапия у пациентов, которым не проводилась алло-ТГСК, состояла из краниального облучения (СОД 18 Гр) с последующими 3-недельными курсами 6-ТГ (1–4-й день), Ага-С (50 мг/м<sup>2</sup>/сут подкожно на 5-й день) и метотрексат эндолюмбально на 5-й день. В дальнейшем проводилась длительная поддерживающая терапия (до двух лет от ее начала). Полная ремиссия была достигнута у 77% включенных в исследование больных, индукционная смертность составила 12%. 5-летняя БСВ, БРВ и ОВ больных ОМЛ, не подвергшихся алло-ТГСК, – 29, 37 и 34% соответственно. У 22% (89 из 371) детей был полностью совместимый донор, 84 была проведена алло-ТГСК. Восьмилетняя ОВ этой группы пациентов была 47% ( $p<0,05$ ) [16].

Учитывая недостаточно высокую частоту достижения полных ремиссий в протоколе CCG 251, в протоколе CCG 213 была усилена терапия индукции ремиссии. Кроме того, индуктивное лечение было разделено на два рукава. Один рукав состоял из более высокой (по сравнению с CCG 251) дозы Ага-С (200 мг/м<sup>2</sup>/сут) и даунорубомицина (45 мг/м<sup>2</sup>/сут) в режиме 7+3. Индукция ремиссии в другом рукаве состояла из 5 препаратов (DENVER): Ага-С 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–4-й дни), даунорубин 20 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–3-й дни), этопозид 150 мг/м<sup>2</sup>/сут (0 и 3-й дни), 6-ТГ 50 мг/м<sup>2</sup> (каждые 12 ч) и дексаметазон 6 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–4-й дни) [17]. В зависимости от ответа на первый курс лечения дети получали 2 или 3 курса 7+3 или DENVER. Больные, достигшие ремиссии и имевшие полностью совместимого или не полностью совместимого по одному локусу родственного донора, подвергались алло-ТГСК. Остальным пациентам проводилась консолидирующая терапия, состоявшая из трех курсов: Capizzi II (Ага-С 3 г/м<sup>2</sup> каждые 12 ч 1–2-й дни и L-аспарагиназа 6000 МЕ/м<sup>2</sup> на 24-й час от начала инфузии Ага-С), с 8 по 11-й день курс повторялся; курса химиотерапии PATCO (винкристин, преднизолон, Ага-С, 6-ТГ и циклофосфан) [3] и одного курса DENVER. После консолидирующей терапии была вторая рандомизация: согласно одному направлению, больным прекращалось лечение, другому – проводилась поддерживающая терапия PATCO в течение 18 мес. Количество полных ремиссий не зависело от проводимой химиотерапии и составило в обоих рукавах рандомизации 77%. По результатам протокола CCG 213 5-летняя БСВ, БРВ и ОВ составили 29, 37 и 37% соответственно. Полностью совместимого или частично несовместимого родственного донора имели 113 детей, алло-ТГСК была проведена 75 больным. У больных, подвергшихся алло-ТГСК, были более высокие БРВ и ОВ, чем у больных, не имевших HLA-совместимого донора и не получивших алло-ТГСК: 46 и 38%, ( $p=0,06$ ), 52 и 46% ( $p=0,13$ ) [16].

В следующем протоколе – CCG 2891 – индуктивная терапия была изменена по составу лекарств: Ага-С 200 мг/м<sup>2</sup>/сут в виде 24-часовой инфузии (1–5-й дни), 6-ТГ 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (1–5-й дни), этопозид 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (1–5-й дни) и даунорубомицин 20 мг/м<sup>2</sup>/сут в виде длительной инфузии (1–5-й дни) (DCTER) [18, 19]. При этом проводилось разделение больных на 2 группы: одна группа (при количестве бластов в пунктате костного мозга менее 5% на 14-й день лечения) получала лечение в стандартном

режиме, т. е. второй курс индукции начинался после восстановления кроветворной функции костного мозга, а другой группе проводилась терапия в интенсивном режиме — на 7-й день от окончания первого курса независимо от данных анализа периферической крови и количества бластов в пунктате костного мозга. Интенсивный режим индукции ремиссии получали также пациенты с количеством бластов в пунктате костного мозга — более 5% на 14-й день от начала лечения. Все пациенты, достигшие ремиссии и имевшие полностью совместимого или частично несовместимого родственного донора, отбирались для проведения алло-ТГСК. Остальные больные были разделены на 2 группы: одной группе проводилась ауто-ТГСК с очисткой костного мозга 4-гидроксициклофосфамидом, а другой — интенсивная консолидирующая терапия, состоявшая из цикла Capizzi II, двух циклов RATCO и одного цикла DENVER. Краниальное облучение ЦНС не применялось. Профилактика лейкозного поражения ЦНС проводилась посредством эндолумбального введения Ага-С в начале каждого курса DCTER. Пациентам с инициальным лейкозным поражением ЦНС эндолумбальное введение Ага-С производилось 2 раза в неделю 6 раз. Полная ремиссия была достигнута у 77% больных, при этом частота полных ремиссий у детей, получивших индукцию ремиссии в стандартном режиме, была достоверно ниже, чем у больных, включенных в группу интенсивного режима индуктивной химиотерапии: 72 и 80% соответственно ( $p=0,011$ ). Высокая 3-летняя БСВ, БРВ (результаты промежуточного исследования) была в группе больных, получивших более интенсивный режим индуктивной химиотерапии: 39 и 51% соответственно. Результаты, полученные при промежуточном анализе, дали право в дальнейшем закрыть крыло стандартной (не интенсивной) терапии в этом протоколе. Пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ составила 34, 44 и 47% соответственно [16]. Из 653 больных, достигших ремиссии, у 181 ребенка был определен НЛА-совместимый донор. Алло-ТГСК подверглись 138 больных. Среди больных, подвергшихся алло-ТГСК, 6-летняя БРВ была 67% в группе больных, получивших интенсивную терапию, а у больных, получивших стандартное лечение, — 42% ( $p=0,005$ ).

Следовательно, основным достижением исследований ССГ было доказательство необходимости использования интенсивного индуктивного режима химиотерапии.

В России с 1976 г. было начато лечение по программе 7+3, состоявшей из 6 циклов химиотерапии Ага-С 100 мг/м<sup>2</sup>/сут и даунорубомицина 30 мг/м<sup>2</sup>/сут: 2 цикла индукции ремиссии и 4 цикла консолидирующего лечения с последующим продолжением лечения в виде 6 циклов 5+2 1 раз в 2 мес. Пятилетняя БСВ составила 25% [21]. В НИИ ДОГ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (с 1991 по 1997 г.) проводилась терапия по модифицированной программе AML-BFM 87. Модификация состояла в отсутствии курсов ранней интенсификации в протоколе лечения. В исследование было включено 32 ребенка. Полная ремиссия была достигнута у 87% детей, а 5-летняя БСВ составила 42%. С 1997 по 2002 г. в протокол были включены курсы ранней интенсификации и ауто-ТГСК для детей с высоким риском развития рецидива согласно критериям исследования группы BFM. Помимо признаков, полученных в исследованиях группы BFM, к неблагоприятным признакам были также отнесены экспрессия В-клеточных и эритроидных антигенов на поверхности

бластных клеток [21, 22]. Пятилетняя БСВ детей, лечившихся по протоколу с использованием курсов ранней интенсификации, составила 42%. На основании предшествующего исследования в 2002 г. был разработан и внедрен в практику в трех клиниках РФ новый протокол — НИИ ДОГ ОМЛ 2002. Основная идея протокола базировалась на адекватной стратификации больных на группы риска и соответственно риск-адаптированной терапии.

В группу стандартного риска были включены 10 (28,6%) больных ОМЛ с t(8;21) или inv(16) и без экспрессии В-клеточных антигенов. Морфологические варианты не учитывались.

В группу среднего риска вошли 17 (48,6%) больных ОМЛ с морфологическими вариантами М1, М2 или М4, без изменений кариотипа, с трисомиями хромосом 8 или 21, транслокацией t(3;5), а также пациенты, соответствующие критериям стандартного риска, но с экспрессией В-клеточных или эритроидных маркеров на поверхности бластных клеток.

В группу высокого риска были включены 8 (22,9%) детей с морфологическими вариантами М0 и М5, независимо от особенностей кариотипа; с мультилинейной дисплазией (без предшествующего миелодиспластического синдрома и с предшествующим миелодиспластическим синдромом); с t(6;11), t(10;11), тремя и более хромосомными аномалиями.

Больные, включенные в группы стандартного или среднего риска, получали лечение по ветви протокола НИИ ДОГ ОМЛ 2002 для стандартного риска, которая состояла из индукции ремиссии (Ага-С 100 мг/м<sup>2</sup>/сут 1-, 2-й дни и 100 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 ч 3–8-й дни, идарубин 12 мг/м<sup>2</sup>/сут 3–5-й дни и этопозид 150 мг/м<sup>2</sup>/сут 6–8-й дни), одной фазы консолидации ремиссии (даунорубомицин 30 мг/м<sup>2</sup>/сут 1, 8, 15, 22-й дни, Ага-С 75 мг/м<sup>2</sup>/сут 3–6, 10–13, 17–20, 24–27-й дни, 6-меркаптопурин 60 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–28-й дни), двух курсов ранней интенсификации, состоявших из повышенных доз Ага-С 1000 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 ч 1–3-й дни, этопозид 125 мг/м<sup>2</sup>/сут 2–4-й дни и поддерживающей терапии (Ага-С 40 мг/м<sup>2</sup>/сут 4 дня с повтором каждые 28 дней до 108 нед от начала лечения, 6-меркаптопурин 40 мг/м<sup>2</sup>/сут ежедневно до 78-й недели, считая от начала индукции ремиссии). Поддерживающая терапия в протоколе была сохранена в связи с тем, что, по данным группы BFM, ее неэффективность не доказана. Суммарная доза химиопрепаратов антрациклинового ряда составила 156 мг. Профилактику поражения ЦНС проводили путем эндолумбального введения Ага-С (40 мг) и краниального облучения после окончания второго курса интенсификации (СОД 12 Гр).

Большим, включенным в группу среднего риска, в отличие от стандартного, не проводили облучение ЦНС и поддерживающую терапию. В заключение протокола осуществляли ауто-ТСК без дальнейшей поддерживающей терапии.

Лечение больных группы высокого риска состояло из 4 альтернирующих курсов химиотерапии: НАМ (Ага-С 1000 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 ч 1–3-й дни, митоксантрон 12 мг/м<sup>2</sup>/сут 2–4-й дни) и флударабин в сочетании с этопозидом (флударабин 30 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–5-й дни и вепезид 100 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–5-й дни, цитозар эндолумбально 40 мг в 1-й день). Суммарная доза митоксантрона составила 72 мг. Профилактику поражения ЦНС проводили путем эндолумбального введения цитозара в дозе 40 мг в каждом курсе.

Таблица 2. Результаты лечения детей с ОМЛ по данным протоколов различных групп

Протокол	Годы	Полная ремиссия, %	Ранняя смертность, %	5-летняя БСВ, %	5-летняя ОВ, %	Цель/итог исследования
AML-BFM 83	1983–1987	76,4	11,5	47	52	Доказана эффективность этопозида в индукции ремиссии
AML-BFM 87	1987–1993	74,9	9,4	41	55	В рандомизированном исследовании доказана необходимость краниального облучения
AML-BFM 93	1993–1998	82,2	7,4	50	57	Доказана эффективность интенсивной терапии индукции ремиссии
MRC AML 10	1988–1995	93	4	49	58	Доказана эффективность терапии индукции ремиссии ADE по сравнению с DAT
MRC AML 12	1995–2002	92	4	56	66	Доказана эффективность режима индукции ремиссии AME по сравнению с ADE
LAME 89	1988–1991	85,1	10,6	53,3	55,2	Исследование алло-ТГСК (у больных, имевших полностью совместимого родственного донора) после 2 и 4 курсов химиотерапии
LAME 91	1991–1998	90,4	3,9	47,3	60,6	В рандомизированном исследовании показано отсутствие эффективности поддерживающей терапии
LAME SP	1997–1998	84	3	54,8	71,9	Исследование интенсивного режима химиотерапии индукции и эффективности алло-ТГСК (у больных, имевших полностью совместимого родственного донора). Протокол основан на результатах LAME 91
CCG 251	1979–1983	77	12	29	34	Исследование алло-ТГСК (у больных, имевших полностью совместимого родственного донора) после двух курсов химиотерапии по сравнению с только химиотерапией
CCG 213	1985–1989	78	5	29	37	Исследование эффективности послеиндуктивной терапии Capizzi II и необходимости поддерживающей терапии
CCG 2891	1989–1995	77	5	34	45	Доказана эффективность интенсивной терапии индукции ремиссии

В исследование включено 40 больных, набор пациентов в настоящее время продолжается, а 3-летняя БСВ составляет  $40 \pm 12\%$ .

### Обсуждение

Анализ результатов лечения детей с ОМЛ показал, что за последние 20 лет количество полных ремиссий и выживаемость детей, больных ОМЛ, существенно возросли (табл. 2). Это, в первую очередь, объясняется усилением интенсивности режимов, адекватной стратификацией больных на группы риска и выбором риск-адаптированного лечения, снижением смертности во время проведения химиотерапии, а также повышением выживаемости больных с рецидивами ОМЛ.

Большинство неудач в лечении детей с ОМЛ связано с рефрактерностью опухолевых клеток к проводимой инициальной химиотерапии и возникновением рецидивов. По данным различных исследовательских групп, суммарный риск развития рецидива составил 30–40%. При этом количество рецидивов с лейкозным поражением ЦНС составило не более 9% от общего числа пациентов и 6–18% от общего числа рецидивов. До сих пор не известны факторы, влияющие на инициальное вовлечение ЦНС в лейкозный процесс и на развитие рецидива с поражением ЦНС [23]. По имеющимся данным, нет однозначного мнения о необходимости профилактики лейкозного поражения ЦНС путем краниального облучения или эндолумбального введения химиопрепаратов, особенно принимая во внимание предположение об участии резидуальных

опухолевых клеток, находящихся в ЦНС, в развитии рецидива ОМЛ с поражением костного мозга. Так, группы MRC и LAME отказались от краниального облучения. В то же время результаты лечения по рандомизированному протоколу AML-BFM 87 действительно подтверждают важность краниального облучения, но при этом группы сравнения больных довольно малы. В связи с этим необходимы рандомизированные исследования с участием большого количества пациентов в каждой группе.

Открытым остается вопрос о важности поддерживающей терапии. Исследования LAME 91 и CCG 213 показали отсутствие преимущества поддерживающей терапии, а в исследовании LAME 91 ОВ была даже ниже в группе детей с ОМЛ, получавших поддерживающее лечение. Авторы объясняют этот феномен развитием резистентности опухолевых клеток к последующей более агрессивной терапии, назначаемой в случае развития рецидива заболевания [15, 17].

Увеличение выживаемости детей, больных ОМЛ, связано также с улучшением сопроводительной терапии и снижением смертности, связанной с лечением. Некоторые группы исследователей показали, что можно снизить уровень смертности больных даже несмотря на усиление интенсивности режимов лечения. Для этого необходимо, чтобы лечение детей с ОМЛ проводилось в специализированных, хорошо оснащенных соответствующим медицинским оборудованием и медикаментами детских онкологических центрах. Штат отделения дол-

жен быть полностью укомплектован обученным персоналом, имеющим опыт лечения детей (не менее 10 больных в год). Кроме того, детские онкологические отделения должны быть хорошо обеспечены препаратами крови для коррекции анемического и геморрагического синдромов. Клиники должны быть оснащены морфоцитологическими, иммунологическими и генетическими лабораториями для квалифицированной диагностики и выбора адекватного лечения согласно группе риска [24–26].

Вопрос о времени и необходимости ауто- и алло-ТГСК во время первой ремиссии остается спорным. Показания к ауто- и алло-ТГСК у детей с высоким риском ОМЛ существенно разнятся у различных групп исследователей [27–29]. Большинство авторов согласны с тем, что больные ОМЛ, входящие в группу высокого риска, не нуждаются в проведении ауто- или алло-ТГСК. Так, по данным групп MRC, BFM и LAME, проведение ауто- или алло-ТГСК детям с высоким риском ОМЛ во время первой ремиссии нецелесообразно. Несмотря на снижение количества рецидивов и повышение уровня БРВ после ТГСК, ОВ не увеличивалась из-за неудач в лечении рецидивов. С другой стороны, группа CCG доказала необходимость проведения алло-ТГСК во время первой ремиссии, хотя интенсивность терапии во всех протоколах этой группы сомнительна, так как результаты лечения больных, не подвергшихся

алло-ТГСК, были значительно хуже по сравнению с результатами химиотерапии европейских групп. Следовательно, алло-ТГСК может сглаживать недостаточно интенсивную предшествующую ТГСК химиотерапию.

Еще одной возможностью улучшения выживаемости детей с ОМЛ было увеличение доз химиопрепаратов, особенно антрациклинов. При тщательном анализе было выявлено, что низкие суммарные дозы антрациклинов в программах лечения приводили к снижению выживаемости пациентов, но при этом превышение кумулятивной дозы более 375 мг/м<sup>2</sup> часто обуславливало развитие кардиомиопатии. Использование высоких доз Ara-C способствовало проникновению препарата через гематоэнцефалический барьер и, возможно, преодолению резистентности опухолевых клеток.

Таким образом, лечение детей с ОМЛ должно быть риск-адаптированным и достаточно интенсивным с обязательным включением Ara-C в высоких дозах. Суммарная доза антрациклинов не должна превышать 375 мг/м<sup>2</sup>. Интенсивный режим индукции ремиссии и алло-ТГСК во время первой ремиссии необходимы только больным, включенным в группы высокого риска. Дети, больные ОМЛ, должны лечиться только в специализированных детских онкологических центрах, в которых будет обеспечена адекватная сопроводительная терапия.

## Л и т е р а т у р а

- Choi S.I., Simone J.V. Acute nonlymphocytic leukemia in 171 children. *Med Pediatr Oncol* 1976;2:119–76.
- Van Der Does-Van Den Berg A., Van Wering E.R., Van Zanen C.E. Acute niet-lymfatische leukemieën bij kinderen in Nederland (1972-1977). *Tijdschr Kindergeneeskde* 1978;46:146–53.
- Chard Jr. R.I., Frankleshtein J.Z., Sonley M.J. et al. Increased survival in childhood nonlymphocytic leukemia after treatment with prednisone cytosine arabinoside, 6-thioguanine, cyclophosphamide, and oncovin (PATCO) combination chemotherapy. *Med Pediatr Oncol* 1978;4:263–73.
- Weinshtein H.J., Mayer R.J., Rosental D.S. et al. Treatment of acute myelogenous leukemia in children and adults. *N Engl J Med* 1980;303:473–8.
- Riehm H., Gadner H., Welte K. Die West-Berliner Studie zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindes – Erfahrungsbericht nach 6 Jahren. *Klin Padiatr* 1977;189:89–102.
- Baehner R.J., Bernstein I.D., Sather F.H. et al. Improved remission induction rate D-ZAPO but unimproved remission duration with addition of immuthery to chemotherapy in previously untreated children with ANLL. *Med Pediatr Oncol* 1979;7:127–39.
- Buchner T., Urbanitz D., Hiddemann W. et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1985;3:1583–9.
- Creutzig U., Zimmermann M., Ritter J. et al. Treatment strategies and long-term in pediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005;19:2039–42.
- Carella A.M., Berman E., Maraone M.P., Ganzina F. An overview of preclinical and clinical studies. *Hematologica* 1990;75:159–69.
- Berman E., McBride M.. Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug-resistant leukemia cells. *Blood* 1992;79:3267–73.
- Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M. et al. for the BFM study group. Idarubicin improves blast cell clearance during induction therapy in children with AML: results of study AML-BFM 93. *Leukemia* 2001;15:348–54.
- Creutzig U., Berhold F., Boos J. et al. Improved treatment results in children with AML: results of study AML-BFM 93. *Klin Padiatr* 2001;213:175–85.
- Creutzig U., Ritter J., Schelong G. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in the study AML-BFM-83 as a compared with study AML-BFM-78. *Blood* 1990;75:1932–40.
- Gibson B.E.S., Wheatley K., Hann I.M. et al. Treatment strategy and long-term results in pediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005;19:2130–8.
- Perel Y., Auvergnon A., Leblanc T. et al. Treatment of childhood acute myeloblastic leukemia: dose intensification improves outcome and maintenance therapy is of no benefit – multicenter studies of the French LAME (Leucemie Aigue Myeloblastique Enfant) Cooperative Group. *Leukemia* 2005;19:2082–9.
- Smith O., Alonzo T.A., Gerbing R.B. et al. Long-term results of children with acute myeloid leukemia: report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 2891. *Leukemia* 2005;19 – pp. 2054–62.
- Wells R.J., Woods W.G., Buckley J.D. et al. Treatment of newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: a Children's cancer Group study. *J Clin Oncol* 1994;12:2367–77.
- Woods W.G., Kobrinsky N., Buckley J.D. et al. Timed sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from Children's Cancer Group. *Blood* 1996;87:4979–89.
- Woods W.G., Neudorf S., Gold S. et al. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission: a report from Children's Cancer Group. *Blood* 2001;97: 56–62.
- Ribeiro R.C., Razzouk B.I., Pounds S. et al. Successive clinical trails for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* 2005;19:2125–9.
- Попа А.В., Маякова С.А., Тупицын Н.Н. Прогностическое значение иммунологических маркеров острого нелимфобластного лейкоза у детей. *Педиатрия* 1999;(3).

22. Попа А.В., Маякова С.А., Тупицын Н.Н. Результаты лечения детей, больных острым миелоидным лейкозом, в зависимости от иммунофенотипа бластных клеток. Гематол и трансфузиол 1999;(6).

23. Abbott B.L., Rubnitz J.E., Tong X. et al. Clinical significance of central of central nervous system involvement at diagnosis of pediatric acute myeloid leukemia: a single institution's experience. Leukemia 2003;17:2090–6.

24. Creutzig U., Zimmermann M., Reinhardt D. et al. Early death and treatment related mortality in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia:

analysis of the multicenter clinical trials AML-BFM 93 and AML-BFM 98. J Clin Oncol 2004;22:4384–93.

25. Lehnbecher T., Värwig D., Kaiser J. et al. Infectious complications in pediatric acute myeloid leukemia: analysis of the prospective multi-institutional clinical trial AML-BFM 93. Leukemia 2004;18:72–7.

26. Slats A.M., Egeler R.M., Van Der Does-Van den Berg A. et al. Causes of death other than progressive leukemia in childhood acute lymphoblastic (ALL) and myeloid leukemia (AML): the Dutch Childhood Oncology Group experience. Leukemia 2005;19:537–44.

27. Creutzig U., Reinhardt D. Currant controversies: which patients with acute myeloid leukemia should receive a bone marrow transplantation? A European view. Br J Hematol 2002;118:365–77.

28. Chen A.R., Alonzo T.A., Woods W.G., Arceci R.J. Currant controversies: which patients with acute myeloid leukemia should receive a bone marrow transplantation? An American view. Br J Hematol 2002;118:378–84.

29. Whealhy K. Currant controversies: which patients with acute myeloid leukemia should receive a bone marrow transplantation? A statistician view. Br J Hematol 2002;118:351–56.

## РОЛЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

### ROLE OF HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN THERAPY OF ADULT PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIAS

B.V. Afanasyev, L.S. Zubarovskaya

Acad. I.P. Pavlov Saint Petersburg State Medical University

*In 1990 to 2005, a total of 138 hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) were made in patients with high risk group of acute myeloblastic leukemia (AML) (auto-HSCT in 20 patients, related allo-HSCT in 18, unrelated allo-HSCT in 20) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) (auto-HSCT in 13 patients, related allo-HSCT in 24, unrelated allo-HSCT in 43). The patients' age was 2 to 55 years. Five-year relapse-free survival after auto-HSCT in the 1st-2nd remissions in AML was 40%; 8-year one was 30% in patients with ALL (including 3 patients with Ph+). In patients aged less than 21 years with acute leukemias, 5-year overall survival after related and unrelated donor allo-HSCT was 38 and 44%, respectively. Both allo-HSCT modes had the similar spectrum of complications in the early period (as long as 100 days). In patients with AML and ALL, 5-year overall survival depended on the stage of disease at the moment of allo-HSCT performance (52 and 5.9% in ALL and 62.5 and 27.3% in AML, remission and relapse, respectively). Auto-HSCT in ALL and AML is an effective method for remission consolidation and may be regarded as an alternative if the patient has no related or unrelated donor. The efficacy of allo-HSCT from a related or unrelated donor in acute leukemia depends on the stage of disease at the moment of its performance, which determines the likelihood of development of a relapse and different complications (toxic, infectious, graft rejection, etc).*

**Key words:** Acute leukemias, transplantation, related and unrelated donors

Трансплантацией называется введение реципиенту для частичного или полного замещения кроветворения полученных от донора гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), источниками которых могут быть костный мозг, периферическая кровь, пуповинная кровь. Трансплантация ГСК (ТГСК) является эффективным методом в лечении больных с различными заболеваниями системы крови с конца 1960-х годов [1–3].

В зависимости от донора ТГСК подразделяется на аутологичную (ауто-ТГСК), сингенную, аллогенную (алло-ТГСК) от родственного или неродственного донора. Совместимость по HLA-системе является основным фактором, определяющим выбор аллогенного донора. В настоящее время применяются серологический и молекулярно-биологический методы типирования доноров, последний из которых различается по количеству идентификации генов на низкоразрешающее и высокоразрешающее типирование, подразумевающее определение до 10 генов комплекса гистосовместимости. При этом возможны следующие варианты совместимости донора и ре-

ципиента — наличие полностью серологически и генотипически совместимого родственного донора, хорошо совместимого неродственного донора (совместимость по 10/10 или 9/10 генов), частично совместимого донора (совместимость по 6–8/10 генов) [4, 5]. Совместимость донора и реципиента по одному гаплотипу рассматривается как гаплогенотипическая. Для доноров не существует биологических ограничений по возрасту, за исключением юридических постановлений и состояния здоровья. Неродственным донором может быть человек, достигший 18 лет, в то время как взятие ГСК от родственного донора с согласия родителей может быть осуществлено в любом возрасте и только для сиблинга (брат, сестра). Различия по группе крови, полу и возрасту не имеют определяющего значения при выборе донора ГСК. Тем не менее при прочих равных условиях предпочтение отдается донору-мужчине и донору более молодого возраста (лучше до 40 лет) [6, 7].

Терапевтический эффект при ауто-ТГСК обусловлен использованием миелоаблативных доз цитостатиков или радиации (миелоаблативные режимы кондициони-

рования), в то время как при алло-ТГСК к воздействию цитостатиков и радиации на злокачественные клетки добавляется цитотоксический эффект иммунокомпетентных клеток донора (реакция «трансплантат против лейкоза/опухоли» – РТПЛ/О), которая зачастую протекает параллельно с реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), несмотря на существенные различия в их патогенезе [8–11].

В течение многих лет превалировало мнение о необходимости использования миелоаблативных режимов кондиционирования с целью максимальной эрадикации злокачественного клона клеток и создания иммунологической толерантности у реципиента с целью приживления ГСК донора [12]. Однако в последние годы стало очевидным, что абсолютная миелоабляция не является необходимым компонентом приживления ГСК донора, а иммуноадаптивный цитостатический эффект клеток донора зачастую превосходит цитостатические воздействия лучевой и химиотерапии (ХТ). Это послужило причиной того, что режимы кондиционирования с использованием сниженных доз цитостатических препаратов и/или радиации получили широкое распространение в клинической практике благодаря их низкой миело- и органотоксичности и возможности использования у значительного числа пациентов старшей возрастной группы и больных с различными сопутствующими заболеваниями. Зачастую после ТГСК с использованием немиелоаблативных режимов кондиционирования период выраженной нейтропении и тромбоцитопении значительно сокращается или отсутствует [13–22] (рис. 1).

В отличие от миелоаблативных режимов кондиционирования при режимах со сниженной интенсивностью доз замещение кроветворной и иммунной системы реципиента на клетки донора происходит постепенно через стадию смешанного «химеризма», которая может продолжаться у некоторых больных в течение нескольких месяцев или лет. Реальным методом ускорения перехода частичного «химеризма» в полный является применение инфузии лимфоцитов от донора ГСК (donor lymphocyte infusion – DLI) [23, 24].

Основным требованием к режиму кондиционирования остается необходимость индукции иммунологической толерантности, достаточной для приживления аллогенного трансплантата, т.е. иммуноабляция. Решающую роль в широком использовании режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью доз играют уникальные свойства новых химиотерапевтических препаратов из группы антагонистов пуриновых оснований – флударабина, кладрибина и других, имеющих выраженный иммуносупрессивный (иммуноаблативный) эффект при минимальной миело- и органотоксичности [25]. Таким образом, практически все немиелоаблативные режимы кондиционирования являются флударабинсодержащими, за исключением некоторых, основанных на применении низких доз ионизирующей радиации (2 Гр) [26, 27]. При использовании немиелоаблативных режимов и режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью доз усиление иммуноадаптивного эффекта аллогенного

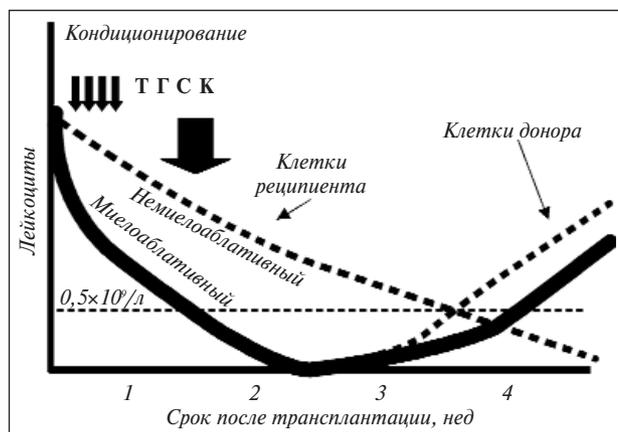


Рис. 1. Особенности восстановления кроветворения при миелоаблативных и немиелоаблативных режимах кондиционирования

Таблица 1. Степень чувствительности к иммуноадаптивной терапии после алло-ТГСК при различных заболеваниях

Чувствительность	Диагноз
Высокая	Хронический миелолейкоз (ХМЛ) Лимфома низкой степени злокачественности Лимфома мантийной зоны Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)
Промежуточная	Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) Лимфома промежуточной степени злокачественности Множественная миелома (ММ) Лимфома Ходжкина Рак почки Рак молочной железы
Низкая	Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) Лимфома высокой степени злокачественности

трансплантата с помощью DLI в посттрансплантационном периоде приобретает все большее значение [28, 29].

Таким образом, применение DLI обоснованно для ускорения становления полного донорского «химеризма» у реципиента с целью усиления иммуноадаптивного эффекта при терапии минимальной остаточной болезни, а также рецидива основного заболевания после алло-ТГСК [28, 30–32]. Имеются различия в чувствительности к иммуноадаптивной терапии при различных заболеваниях системы крови и злокачественных новообразованиях. Данные о выраженности этого эффекта в зависимости от диагноза представлены в табл. 1.

В настоящее время не представляется возможным провести четкую границу между миело- и немиелоаблативными режимами кондиционирования, поскольку чувствительность к токсическим воздействиям клеток органов и тканей варьирует в значительных пределах у разных индивидуумов и определяется различием в экспрессии генов MDR (multiple drug resistant – гены множественной лекарственной устойчивости) и других генов [33]. Условная классификация режимов кондиционирования в зависимости от миело- и иммуноаблативного воздействия представлена в табл. 2 и на рис. 2.

Наиболее используемыми миелоаблативными режимами кондиционирования являются:

- TOT 10–12 Гр+циклофосфан 120 мг/кг;
- бусульфан 16 мг/кг+циклофосфан 120 мг/кг±ATG;

Таблица 2. Классификация режимов кондиционирования

Режимы кондиционирования	Основные особенности
Миелоаблативные — иммуноаблативные режимы кондиционирования (стандартные)	Обладают способностью «полной» эрадикации нормальных и злокачественных клеток Восстановление собственного кроветворения практически невозможно (только в единичных наблюдениях с 60-го дня после ТГСК) Наблюдается относительно быстрое приживание трансплантата
Миелоаблативные — иммуноаблативные режимы кондиционирования (со сниженной токсичностью)	Основные характеристики те же, за исключением того, что применяются новые классы цитостатических препаратов со сниженной органотоксичностью
Режимы кондиционирования с уменьшенной интенсивностью дозы и токсичностью (reduced intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplant — RI-HSCT)	Не обладают способностью «полной» эрадикации нормальных и злокачественных клеток Возможно восстановление собственного кроветворения Приживание наступает постепенно через относительно длительную стадию частичного «химеризма»
Немиелоаблативные — иммуноаблативные режимы кондиционирования	Не обладают способностью «полной» эрадикации нормальных и злокачественных клеток Гемопоз восстанавливается полностью до 28-го дня без трансплантации гемопоэтических клеток Приживание наступает постепенно через относительно длительную стадию частичного химеризма

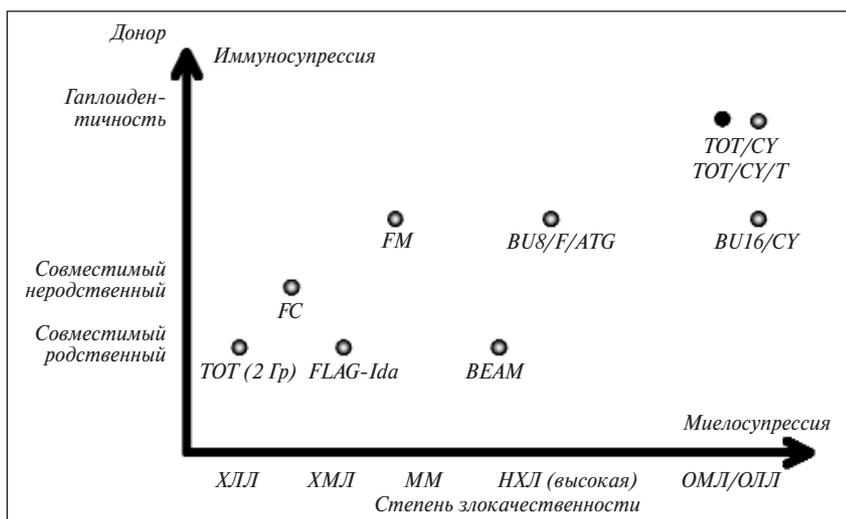


Рис. 2. Сравнительная интенсивность режимов кондиционирования при онкогематологических заболеваниях

TOT — тотальное облучение тела, CY — циклофосфан, BU8 — бусульфан 8 мг/кг массы тела реципиента, BU16 — бусульфан 16 мг/кг массы тела реципиента, ATG — антилимфоцитарный глобулин, FC — флударабин+циклофосфан, FLAG-Ida — флударабин+цитозар+идарубицин+Г-КСФ, FM — флударабин+мелфалан, BEAM — кармустин+этопозид+цитозар+мелфалан, НХЛ — неходжкинская лимфома

- бусульфан 16 мг/кг+циклофосфан 120 мг/кг+вепезид 30–45 мг/кг±ATG.

Миелоаблативные — иммуноаблативные режимы кондиционирования (со сниженной токсичностью):

- тресульфан 30–42 г/м<sup>2</sup>+циклофосфан 120–200 мг/кг±ATG;

- тресульфан 30–42 г/м<sup>2</sup>+флударабин 150 мг/м<sup>2</sup>+циклофосфан 120 мг/кг±ATG.

Режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью и уменьшенной токсичностью:

- флударабин 90–150 мг/м<sup>2</sup> + циклофосфан 20–120 мг/кг±ATG;

- флударабин 90–150 мг/м<sup>2</sup> + бусульфан 4–8 мг/кг ±ATG;

- флударабин 90–150 мг/м<sup>2</sup> + мелфалан 140–180 мг/м<sup>2</sup> ±ATG;

- флударабин 90–150 мг/м<sup>2</sup> + мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>±Campath-1H 100 мг/м<sup>2</sup>;

- флударабин 90–150 мг/м<sup>2</sup>+тиотепа 300 мг/м<sup>2</sup>±ATG;

- флударабин 100 мг/м<sup>2</sup>+циклофосфан 60 мг/кг+тиотепа 300 мг/м<sup>2</sup>±ATG;

- флударабин 150 мг/м<sup>2</sup> + BCNU 300 мг/кг + мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>±ATG;

- циклофосфан 60–120 мг/кг + тиотепа 300–600 мг/м<sup>2</sup>±ATG;

- флударабин 90–150мг/м<sup>2</sup> + TOT 2,0 Gr.

Немиелоаблативные режимы кондиционирования:

- FLAG — флударабин 120–150 мг/м<sup>2</sup> + цитозар 800 мг/м<sup>2</sup>+Г-КСФ;

- FLAG+Ida — флударабин 120–150 мг/м<sup>2</sup>+ цитозар 800мг/м<sup>2</sup>+ идарубицин 12–15 мг/м<sup>2</sup>;

- FAI — флударабин 30 мг/м<sup>2</sup>/сут 4 дня+ цитозар 1 г/м<sup>2</sup>/сут 4 дня через 4 ч после флударабина.

По данным Европейской группы по трансплантации (EBMT — European Group for Blood and Marrow Transplantation), ежегодно в Европе выполняется около 8000 алло-ТГСК (из них 3300 от неродственного донора) и около 13000 ауто-ТГСК [34]. В США насчитывается более 100 000 человек, живущих после проведения алло-ТГСК. При решении вопроса об использовании ТГСК необходимо учитывать большое количество факторов, основными из которых являются: эффективность альтернативных ме-

Таблица 3. Показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у взрослых с острыми лейкозами и миелодиспластическими синдромами (рекомендации EBMT, 2006)

Диагноз	Стадия заболевания	Алло-ТГСК, донор			Ауто-ТГСК
		родственный	неродственный совместимый	неродственный несовместимый	
ОМЛ	ПР 1 (низкий риск)	ПУ	Р	НП	ПУ
	ПР 1 (средний, высокий риск)	П	ПУ	Р	П
	ПР 2	П	ПУ	Р	П
	ПР 3 (ранний рецидив)	П	ПУ	Р	НП
	М3 (вне молекулярной ремиссии)	П	ПУ	НП	НП
	М3 (молекулярная ПР 2)	П	ПУ	НП	П
	Рецидив или рефрактерность	ПУ	Р	НП	НП
ОЛЛ	ПР 1 (низкий риск)	Р	НП	НП	Р
	ПР 1 (высокий риск)	П	П	ПУ	Р
	ПР 2 (ранний рецидив)	П	П	ПУ	НП
	Рецидив или рефрактерность	ПУ	НП	НП	НП
МДС	РА, РАИБ	П	П	ПУ	ПУ
	РАИБт, вторичный ОМЛ ПР1, ПР2	П	ПУ	ПУ	ПУ
	Развернутая стадия	П	ПУ	Р	НП
	Плохой риск	П	П	Р	ПУ

**Примечание.** М3 – острый промиелоцитарный лейкоз, РА – рефрактерная анемия, РАИБ – рефрактерная анемия с избытком бластов, РАИБт – рефрактерная анемия с избытком бластов с трансформацией, П – показано, ПУ – показано условно, в соответствии со стратегией работы центра, Р – находится в стадии разработки, внедрения, НП – как правило, не показано.

тодов терапии с учетом прогностических факторов (при острых лейкозах, прежде всего, различных программ ХТ, «таргетной» – направленной на определенную мишень терапии – например, глибек при Ph-позитивных острых лейкозах); стадия заболевания и общее состояние больного, наличие сопутствующих заболеваний и различных противопоказаний, включая психоэмоциональные особенности пациентов и их ближайших родственников. Сложность проблемы при выполнении ТГСК определяется невозможностью точной оценки баланса «риск ТГСК – эффект ТГСК». Окончательное решение о выполнении ТГСК принимается больным и его родственниками после проведения детального обсуждения всех вариантов лечения на клинико-семейной конференции при участии специалистов, обладающих опытом использования альтернативных методов лечения у конкретных пациентов. Во время клинико-семейной конференции постоянно возникает «конфликт интересов» – максимальная объективность подробной информации и соблюдение деонтологических принципов [35–38].

По сравнению с детьми результаты стандартной ХТ острых лейкозов у взрослых значительно хуже. Большинство больных с ОМЛ достигают состояния полной ремиссии (ПР), тем не менее 5-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) не превышает 25–50%, а риск развития рецидива составляет 25–80%. При ОЛЛ индукция ремиссии возможна у 75–85% взрослых больных, однако 3–5-летняя БРВ при этом равна 30–45% [39–45]. Несмотря на, казалось бы, явные преимущества ТГСК в лечении острых лейкозов (реализация программы «доза – эффект» при любом варианте ТГСК, введение нормальных ГСК и иммуноадаптивный эффект при алло-ТГСК), показания к одному из вариантов трансплантации при острых лейкозах до сих пор являются предметом дискуссии. Нивелирование эффективности алло- и ауто-ТГСК связано с развитием различных осложнений (особенно при алло-ТГСК) и рецидивами основного заболевания (особенно при ауто-ТГСК) [35, 46–48].

Показания к ТГСК при острых лейкозах у взрослых, в соответствии с рекомендациями EBMT [5], представлены в табл. 3.

Основанием для применения одного из видов ТГСК при острых лейкозах является анализ следующих факторов: возраст больного, морфологический вариант заболевания, стадия, количество лейкоцитов на момент постановки диагноза, характер цитогенетических изменений, ответ на предшествующие курсы ХТ, наличие молекулярно-биологических признаков минимальной остаточной болезни после первичного и последующих курсов цитостатической терапии, доступность донора ГСК [35, 41, 49, 50].

Необходимо отметить, что при попытке сравнения отдаленных результатов ХТ и различных видов ТГСК у больных со злокачественными заболеваниями системы крови достаточно сложно выделить сопоставимые данные. Так, при острых лейкозах в первой или второй ремиссиях эффективность ауто- или алло-ТГСК часто анализируется совместно с ТГСК у детей, подростков и взрослых (например, данные Center for International Blood and Marrow Transplant Research – CIBMTR) или без учета прогностических факторов. Предшествующая ТГСК цитостатическая терапия, как правило, не унифицирована и проводится в соответствии с национальными протоколами либо протоколами международных кооперативных исследований. При этом включение в анализ пациентов, которым ТГСК была выполнена от десятков до нескольких лет назад, может не отражать реальной ситуации настоящего времени. В связи с совершенствованием методов HLA-типирования, сопроводительной терапии, профилактики токсических, инфекционных и иммунологических осложнений за последние годы показатели выживаемости больных после родственной, неродственной алло- и ауто-ТГСК значительно улучшились по сравнению с данными, полученными на начальных этапах внедрения ТГСК как метода лечения. Это позволяет некоторым авторам рассматривать результаты ТГСК с учетом различных исторических периодов [4, 51–58].

Таблица 4. Сравнение эффективности алло-ТГСК преимущественно в 1-й ПР и химиотерапии у больных с ОМЛ

Исследование	Б Р В, %		О В, %	
	алло-ТГСК	ХТ	алло-ТГСК	ХТ
EORTC/GIMEMA AML 8	46	33	48	40
GOELAM	44	38	53	53
MRC AML 10	50	42	55	50
Intergroup (SWOG, CALGB, ECOG)	43	35	46	52
EORTC/GIMEMA AML 10	51,4	41,2	58	49,4

*Примечание.* EORTC/GIMEMA – European Organization for Research and Treatment of Cancer/Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligno dell'Adulto; AML – acute myeloid leukemia; GOELAM – Group Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques; MRC – Medical Research Council; ОВ – общая выживаемость.

Таблица 5. Сравнение эффективности ауто-ТГСК (в 1-й ПР) и ХТ у больных с ОМЛ

Исследование	Вероятность рецидива, %		Б Р В, %		О В, %	
	ауто-ТГСК	ХТ	ауто-ТГСК	ХТ	ауто-ТГСК	ХТ
EORTC/GIMEMA AML 8	40	57	48	30	56	46
GOELAM	—	—	44	40	50	55
MRC AML 10	37	58	53	40	57	45

Таблица 6. БРВ (6-летняя) у взрослых с ОМЛ в 1-й ПР после алло-ТГСК в зависимости от характера цитогенетических изменений (исследование EORTC/GIMEMA AML 10)

Цитогенетические изменения	Б Р В, %	
	алло-ТГСК	ХТ
Низкий риск	65,7	62,1
Промежуточный риск	48,5	45,2
Высокий риск	43,4	18,4
Данные неизвестны	57,8	41,2

При оценке отдаленных результатов ТГСК фактор отбора больных имеет решающее значение. До настоящего времени не получено данных об эффективности ТГСК при острых лейкозах на основании адекватных рандомизированных исследований с учетом современных прогностических критериев. При использовании алло-ТГСК проведение рандомизированных исследований в принципе невозможно, поскольку, как правило, в этом случае имеет место «биологическая» рандомизация пациентов, связанная с наличием родственного или неродственного донора ГСК. Известно, что чем позднее ставится вопрос о выполнении алло-ТГСК, тем больше вероятность развития у больного различных осложнений в раннем и позднем периодах после трансплантации. Факт предшествовавшего рецидива острого лейкоза и высокий уровень минимальной остаточной болезни перед ТГСК увеличивают риск возникновения рецидива после ТГСК [50, 59].

#### ТГСК при ОМЛ у взрослых

ОМЛ – одно из основных показаний к проведению ТГСК у взрослых. Выполнение ТГСК возможно в первой, второй и последующих ПР, при рецидиве, первично-резистентном варианте заболевания [60–64].

Как правило, терапия ОМЛ состоит из курсов индукции и консолидации ремиссии, высокодозной интенсификации и нескольких курсов терапии для поддержания ремиссии. Достижение ремиссии ОМЛ после курса индукции предполагает определение дальнейшей тактики лечения больного. Ввиду отсутствия явных преимуществ при оценке 3–5-летней выживаемости без учета прогностических факторов консолидацию ремиссии при ОМЛ в 1-й ПР в равной степени возможно проводить путем продолжения программного лечения с помощью стандартной цитостатической терапии, ауто-ТГСК, родственной или неродственной алло-ТГСК [3, 43, 65–68].

Сравнительные данные об эффективности стандартной ХТ, ауто- и алло-ТГСК при ОМЛ в 1-й ПР представлены в табл. 4 и 5 [43].

При многофакторном анализе показано, что поводом для раннего обсуждения вопроса о проведении ТГСК при ОМЛ служит оценка прогностических факторов, к которым, в первую очередь, относятся скорость ответа на индукционный курс ХТ и характер цитогенетических изменений в момент постановки диагноза. Цитогенетические изменения подразделяются на благоприятные (низкий риск) – t (8;21), t (15;17), inv 16, имеющие промежуточный прогноз для течения заболевания – нормальный кариотип, +8, 11q23, и неблагоприятные (высокий риск) – 5/del(5q), -7/del(7q), +8, t (4;11), t (9;11), t (11;19), 11q23, 20q-, тандемное удвоение гена *FLT3* [43, 69].

В дополнение к этому необходимо учитывать возраст больного (благоприятный до 40 лет), морфологический вариант, молекулярно-биологические изменения, имеющие отрицательное значение при определении прогноза ОМЛ, а именно, идентификацию патологических генов *MLL*, *MLL/AF4*, *MLL/AF9*, *MLL/ELL*, *MLL/ENL* и повышенную экспрессию Р-гликопротеина, генов *BCL2* и *WT1* [13, 70].

Влияние характера цитогенетических изменений на БРВ больных после алло-ТГСК и ХТ представлено в табл. 6.

Таблица 7. Факторы, влияющие на ОВ и БРВ больных с ОМЛ после аллогенной ТГСК

Источник	Фактор	ОВ, %	БРВ, %	Рецидив, %	Летальность (100 дней), %
E. Papadopoulos и соавт. [78]	Стадия/родственный донор				
	1-я ПР	—	77,4	—	9,7
	2-я ПР	—	50	—	12,5
S. Suciu и соавт. [79]	Возраст, годы/родственный донор				
	15–25	—	54,7	—	—
	26–35	—	56,4	—	—
	36–45	—	49,3	—	—
H. Lazarus и соавт. [80]	Неродственный донор				
	1-я ПР	36	—	13	30
	2-я ПР	32	—	15	31
Y. Kanda и соавт. [81]	HLA-несовместимость/ родственный донор/стандартный риск				
	нет	62	—	22	—
	1 locus	35	—	15	—
	2 locus	10	—	—	—
	I класс	46	—	—	—
	II класс	35	—	—	—
	HLA-несовместимость/ родственный донор/высокий риск				
	нет	22	—	47	—
	1 locus	20	—	19	—
	2 locus	17	—	—	—
3 locus	0	—	—	—	
I класс	18	—	—	—	
II класс	24	—	—	—	
D. Blaise и соавт. [82]	Миелоаблативный режим кондиционирования				
	бусульфан+циклофосфан	51	47	34	27
	TOT + циклофосфан	75	72	14	8
S. Kumar и соавт. [75]	Профилактика оРТПХ				
	циклоспорин А+ МТХ	58	—	—	—
	циклоспорин +преднизолон	38	—	—	—
D. Przepiorcka и соавт. [83]	циклоспорин А+ МТХ	62	—	—	—
	такролимус+МТХ	64	—	—	—
S. Neudorf и соавт. [84]	оРТПХ, степень				
	0	—	58	38	—
	I–II	—	65	20	—
	III–IV	—	15	0	—
M. Remberger и соавт. [85]	Хроническая РТПХ, степень				
	Легкая	—	58	—	—
	Умеренная	—	50	—	—
	Тяжелая	—	10	—	—

Примечание. МТХ – метотрексат.

### Алло-ТГСК

Алло-ТГСК является наиболее радикальным методом терапии ОМЛ, позволяющим надеяться на полное излечение от заболевания. Основным лимитирующим фактором широкого применения алло-ТГСК у взрослых – вероятность развития токсических, инфекционных осложнений и иммунологического конфликта, существенно снижающих качество и продолжительность жизни больных. Совокупность факторов, таких как возраст пациента, стадия заболевания в момент выполнения трансплантации (какая по счету ремиссия, рецидив), источник ГСК (родственный, неродственный донор), степень совместимости по HLA-системе, режим кондиционирования и протокол профилактики острой РТПХ (оРТПХ), определяют успешность проведения алло-ТГСК [5, 71–76].

Применение алло-ТГСК возможно в любой стадии ОМЛ ввиду отсутствия примеси злокачественных клеток в аллогенном трансплантате и наличия иммуноадаптивного эффекта этих клеток.

По данным СВМТР, 3-летняя ОВ без учета возраста после родственной алло-ТГСК при ОМЛ в 1-й ПР составила 60%, во 2-й и последующих ПР – 40%. После неродственной алло-ТГСК эти показатели были равны 43 и 32% соответственно [77].

При алло-ТГСК у больных с ОМЛ не установлено влияния предшествующих курсов консолидации на ОВ и БРВ. Более того, сопоставление данных сложно ввиду того, что терапия до алло-ТГСК проводится в различных дозах и комбинациях препаратов в соответствии с национальными программами либо рекомендациями кооперативных групп по изучению лейкозов.

Таблица 8. Результаты применения алло-ТГСК с немиелоаблативным режимом кондиционирования у больных с ОМЛ

Автор	Число больных	Стадия заболевания	Медиана возраста, годы	Режим кондиционирования	Хроническая РТПХ, %	Рецидив, %	100-дневная смертность, %	БРВ, %
М. Mohty и соавт. [93]	25	1-я ПР***	52	Flu/Bu/ATG	—	12	12	62
U. Hegenbart и соавт. [94]	58 * 64**	1-я ПР/2-я ПР/>1-я ПР/2-я ПР/>	58 57	Flu/2 ГрТВИ Flu/2 ГрТВИ	32 41	47 33	10 22	43 45
H. Sayer и соавт. [95]	113	1-я ПР/2-я ПР/>	51	Flu/Bu/ATG	33	30—65	53	30
R. Martino и соавт. [91]	37	1-я ПР/2-я ПР/>	57	Flu/Bu	43	28	5	66
М. De Lima и соавт. [96]	62 32	1-я ПР/2-я ПР/> 1-я ПР/2-я ПР/>	54 61	Flu/Mel Flu/AraC/Ida	39 27	30 61	39 16	— —

**Примечание.** Flu – флударабин, Bu – бусульфид, ATG – антитимоцитарный глобулин, Mel – мелфалан, Ara-C – цитозар, Ida – идарубин.

алло-ТГСК: \* родственная, \*\* неродственная, \*\*\* высокий риск.

Основные факторы, определяющие отдаленные результаты после алло-ТГСК при ОМЛ у взрослых, представлены в табл. 7.

Наиболее интересными являются данные последних лет, подтверждающие противорецидивный эффект иммунокомпетентных клеток трансплантата и полученные при сопоставлении БРВ у больных с и без оРТПХ и хронической РТПХ после алло-ТГСК. Использование профилактики оРТПХ методом Т-клеточного «истощения» трансплантата *in vivo* и *ex vivo*, по некоторым данным, также сопровождается увеличением риска рецидива ОМЛ, что связано с задержкой восстановления иммунитета и отсутствием при этом иммунологического эффекта, обусловленного РТПЛ [8, 86–92].

До последнего времени оптимальной схемой иммуносупрессивной терапии, позволяющей сохранить надлежащий баланс между эффективной профилактикой оРТПХ и сохранением РТПЛ, была комбинация циклоспорина А (ЦСА) и МТХ, более эффективная по сравнению с монотерапией ЦСА и сочетанием ЦСА с преднизолоном. Однако ввиду высокой токсичности ЦСА и МТХ постепенно внедряются протоколы на основе вновь созданных препаратов – FK506 (такролимус), сиролимус, микофенолат-мофетил (цельсепт).

Принцип комбинированного воздействия цитостатических препаратов и иммунокомпетентных клеток на лейкозный клон наиболее полно реализуется при применении алло-ТГСК с режимами кондиционирования с уменьшенной интенсивностью дозы (немиелоаблативные режимы кондиционирования, мини-трансплантат, RI-HSCT) [10, 25]. Данный вариант алло-ТГСК может быть использован у пациентов старших возрастных групп (до 65 лет), «тяжело предлеченных», имеющих резистентное течение заболевания. Вероятность полного «химеризма» и, следовательно, ПР у больных, находящихся в рецидиве ОМЛ, при этом составляет 30–80%, а 5-летняя ОВ достигает 70% [64, 91]. В настоящее время предложено большое количество режимов кондиционирования с уменьшенной интенсивностью дозы. Сравнительные данные об эффективности применения алло-ТГСК у больных ОМЛ с неми-

елоаблативными режимами кондиционирования представлены в табл. 8 [32].

Несмотря на неоднозначное отношение, внедрение гаплоидентичной алло-ТГСК в первую очередь происходит при ОМЛ. При этом установлено, что иммуноадаптивный эффект гаплоидентичной алло-ТГСК может быть достигнут с учетом аллореактивности естественных киллеров пары донор – реципиент [97, 98]. Использование гаплоидентичной алло-ТГСК особенно актуально в случае необходимости срочного выполнения трансплантации и невозможности быстро найти совместимого родственного или неродственного донора. Проведение гаплоидентичной алло-ТГСК имеет некоторые особенности. Как правило, данный вид трансплантации требует достижения значительной степени иммуносупрессии у реципиента и введения ему большого количества ГСК (CD 34+ клеток) [99, 100]. При этом ГСК донора могут быть предварительно подвергнуты Т-клеточному истощению с помощью моноклональных антител на аппарате CliniMacs (Miltenyi Biotec) либо быть использованы как нативный, необработанный материал. Каждый из указанных способов выполнения гаплоидентичной алло-ТГСК имеет преимущества и недостатки. Для первого варианта характерен длительный период иммунодефицита после трансплантации, связанный с медленным восстановлением иммунитета, что сопровождается развитием большого количества инфекционных осложнений. Второй способ применения ГСК увеличивает риск возникновения острой и хронической РТПХ. Использование гаплоидентичной алло-ТГСК при ОМЛ в ПР позволяет достигнуть 3-летней БРВ у 60% пациентов [97, 99, 101].

### Особенности применения ТГСК

#### при остром промиелоцитарном лейкозе

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) встречается у 10–15% больных ОМЛ и характеризуется наличием специфических морфологических признаков, цитогенетическими изменениями t(15, 17), присутствием патологического белка PML-RARa. Прогресс в терапии этого заболевания связан с внедрением в клиническую практику препаратов из группы ретинойвой кислоты (all-trans retinoid acid – ATRA) и мышьяка (arsenic trioxide – Trisenox). При

этом 70–80% больных ОПЛ могут быть излечены от заболевания назначением АТРА в комбинации с другими цитостатическими препаратами. Тем не менее у 20% пациентов с ОПЛ возможны рецидивы заболевания, что существенно изменяет прогноз у этой группы больных.

Несмотря на то что достижение 2-й ПР при ОПЛ возможно при использовании тех же препаратов, а роль и место ТГСК при ОПЛ до конца не определены, складывается впечатление, что применение алло-ТГСК может быть целесообразно у больных во 2-й и последующих ПР. Пятилетняя БРВ больных ОПЛ после алло-ТГСК во 2-й ПР составила 57%. Ауто-ТГСК при ОПЛ не имеет преимуществ по сравнению со стандартной ХТ [102].

### Ауто-ТГСК

Ауто-ТГСК при ОМЛ рассматривается как этап консолидации ремиссии с помощью высокодозной ХТ, значительно реже используется для индукции ремиссии при начинающемся рецидиве. Несмотря на то что сравнение эффективности стандартной ХТ и ауто-ТГСК при ОМЛ до сих пор не выявило явного преимущества этого метода лечения, окончательные выводы относительно роли ауто-ТГСК кажутся преждевременными. Это связано с отсутствием анализа адекватного количества больных с учетом современных данных о прогнозе ОМЛ при проведении ауто-ТГСК.

На отдаленные результаты у больных ОМЛ при ауто-ТГСК влияют возраст, стадия заболевания, количество курсов индукции (лучше свыше 3 курсов), уровень минимальной остаточной болезни, сроки проведения трансплантации (до или после 6 мес с момента достижения ремиссии). Значение последнего обстоятельства может быть объяснено биологической селекцией пациентов с большей вероятностью длительной ремиссии, а также с применением терапии консолидации, которую в этом случае можно рассматривать как «очистку» костного мозга *in vivo*.

По результатам СИВМТР, 3-летняя общая выживаемость после ауто-ТГСК у больных с ОМЛ в 1-й ПР равна 55%, во 2-й ПР – 35%, при выполнении трансплантации в рецидиве – 18%. При этом ОВ при ОМЛ после ауто-ТГСК в зависимости от возраста пациента не имеет статистически достоверных различий [77].

При сравнении результатов терапии взрослых с ОМЛ в 1-й ПР с использованием интенсивной полихимиотерапии алло- и ауто-ТГСК 4-летняя БРВ составила 30, 55 и 48% соответственно. При сравнении результатов аутологичной и аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ) у пациентов до 46 лет 6-летняя БРВ была равна 42 и 52% соответственно [103].

Аналогичные данные получены у больных с ОМЛ после ауто- и алло-ТГСК от неродственного донора – 3-летняя ОВ составила 57 и 44% соответственно в 1-й ПР, 46 и 33% во 2-й ПР, БРВ была равна 53 и 43% соответственно в 1-й ПР, 43 и 39% во 2-й ПР [80].

Эффективность ауто-ТГСК при ОМЛ не зависит от источника ГСК. По данным ЕВМТ, при ауто-ТКМ и ауто-ТПСКК у больных ОМЛ в 1-й ПР 2-летняя безрецидивная выживаемость составила 49 и 44% соответственно [104].

До сих пор окончательно не установлено влияние «очистки» ГСК *ex vivo* от примеси злокачественных клеток на отдаленные результаты ауто-ТГСК при ОМЛ. При сравнении ауто-ТКМ с «очисткой» или без «очистки» *ex vivo* было показано, что при выполнении ауто-ТКМ в 1-й

ПР, длительность которой больше 6 мес, этот фактор значеня не имеет. Если ауто-ТКМ при ОМЛ производится в период менее 6 мес с момента достижения ремиссии, вероятность рецидива выше при ауто-ТКМ без «очистки» по сравнению с ауто-ТКМ, выполненной с применением «очистки» трансплантата. Складывается впечатление, что проведение «очистки» трансплантата более актуально при осуществлении ауто-ТКМ в первые 6 мес с момента достижения ремиссии, что может быть связано с наличием в этот период в костном мозге большей примеси злокачественных клеток.

Определение минимальной остаточной болезни с помощью молекулярно-биологических методов после курса индукционной терапии у пациентов с ОМЛ позволяет более точно определить не только сроки выполнения ауто-ТКМ, но и показания к «очистке» трансплантата.

Данных о влиянии «очистки» трансплантата на ОВ и БРВ больных ОМЛ при выполнении ауто-ТГСК до настоящего времени не получено.

Таким образом, при ОМЛ алло-ТГСК у взрослых является определяющим методом терапии, что обусловлено ее высокой эффективностью. Выполнение алло-ТГСК возможно у пациентов в возрасте до 65 лет при наличии донора ГСК, выборе соответствующего режима кондиционирования и отсутствии сопутствующих заболеваний, ограничивающих проведение цитостатической терапии. Применение этого метода терапии обоснованно, несмотря на возможное развитие осложнений, связанных с трансплантацией, поскольку среди известных протоколов ХТ только алло-ТГСК уменьшает вероятность развития рецидива ОМЛ до уровня, обеспечивающего полное излечение. Исключение могут составить больные ОМЛ в 1-й ПР, имеющие в момент постановки диагноза благоприятный тип цитогенетических изменений – t(8;21), t(15;17), inv 16.

Эффективность ауто-ТГСК при ОМЛ зачастую незначительно превышает результаты применения стандартных протоколов ХТ, но в ряде исследований сопоставима с таковой алло-ТГСК. ОВ и БРВ после ауто-ТГСК при ОМЛ зависят от общих факторов, определяющих успех любой трансплантации, а именно возраста пациента, стадии заболевания, длительности 1-й ПР, индекса Карновского, наличия отрицательных цитогенетических и молекулярно-биологических факторов на момент постановки диагноза, ответа на индукционный курс химиотерапии. Применение ауто-ТГСК при ОМЛ у взрослых представляется оправданным в силу возможного появления новых протоколов терапии, разработанных с учетом молекулярно-биологических факторов прогноза и основанных на использовании цитостатических препаратов и иммуномодулирующей терапии. Дополнительным аргументом в пользу проведения ауто-ТГСК при ОМЛ у взрослых является возможность для пациента после трансплантации отказаться от длительной поддерживающей терапии, что позволяет достаточно быстро реабилитироваться вплоть до полного восстановления трудоспособности [105].

### ТГСК при ОЛЛ у взрослых

Несмотря на отсутствие удовлетворяющих результатов при применении химиотерапии, продолжают множественные дискуссии относительно необходимости и сроков выполнения ТКМ/ТПСКК (аутологичной, аллогенной) при ОЛЛ как у взрослых, так и, особенно, у детей. Аргументами в пользу более осторожного подхода являются высокая частота рецидивирования ОЛЛ после

высокодозной ХТ или лучевой терапии с ТГСК, отсутствие явных преимуществ при оценке отдаленных результатов по сравнению со стандартной ХТ (в первую очередь, после ауто-ТГСК) и высокая вероятность развития тяжелых, в том числе несовместимых с жизнью, осложнений (особенно после алло-ТГСК).

При постановке диагноза ОЛЛ степень интенсивности предполагаемой цитостатической терапии выбирается на основании оценки риска (стандартный, высокий) заболевания. При определении показаний к проведению одного из видов ТГСК при ОЛЛ учитывают факторы, влияющие на прогноз и определяющие возможность назначения больному сверхвысокодозной лучевой и цитостатической терапии: возраст, индекс Карновского, иммунологический вариант ОЛЛ, количество лейкоцитов на момент постановки диагноза (более или менее  $100,0 \times 10^9/\text{л}$ ), цитогенетические изменения — t (9;22), t (4;11), число курсов ХТ, необходимых для достижения 1-й ПР, наличие признаков минимальной остаточной болезни при молекулярно-биологическом исследовании после курсов индукционной ХТ [44, 106, 107].

Большинство современных протоколов цитостатической терапии ОЛЛ у взрослых включает выполнение одного из видов ТГСК в 1-й ПР в качестве этапа программного лечения при высоком риске ОЛЛ. Больные ОЛЛ во 2-й и последующих ПР являются кандидатами для родственной или неродственной алло-ТГСК. Применение ауто-ТГСК у больных ОЛЛ также возможно, особенно, если эксфузия аутологичного КМ или аферез ПСКК были выполнены в состоянии 1-й ПР.

#### Алло-ТГСК

Оценка эффективности алло-ТГСК у взрослых больных ОЛЛ показывает наличие очевидной зависимости результатов от стадии заболевания, возраста, продолжительности 1-й ПР и длительности ремиссии до алло-ТГСК, иммунологического варианта ОЛЛ, наличия неблагоприятных цитогенетических изменений и признаков минимальной остаточной болезни после курсов индукционной терапии.

Прогностическое значение вышеуказанных параметров является общим практически для всех вариантов острых лейкозов при выполнении ТГСК. Из-за отсутствия единого мнения и результатов, полученных на основании рандомизированных исследований, продолжают исследования, направленные на сравнение различных видов алло-ТГСК у больных ОЛЛ [108].

По данным СВМТР, 3-летняя ОВ после родственной алло-ТГСК при ОЛЛ в 1-й ПР составила 52%, во 2-й и последующих ПР — 42%. Те же показатели после неродственной алло-ТГСК были равны 44 и 33% соответственно [77].

По данным NMDP Working Group (National Marrow Donor Program), отдаленные результаты алло-ТГСК, выполненной во 2-й ПР, зависят от продолжительности 1-й ПР. Так, 5-летняя ОВ после неродственной алло-ТГСК у пациентов в возрасте до 19 лет во 2-й ПР ОЛЛ была равна 38%, 5-летняя БРВ — 36%. При продолжительности 1-й ПР менее 6 мес и более 6 мес 5-летняя БРВ составила 25 и 39% соответственно [109].

Отрицательное прогностическое значение возраста, Т-ОЛЛ и Rh-положительного ОЛЛ подтверждено при анализе ранних осложнений после алло-ТГСК. Так, у больных моложе 15 лет летальность, связанная с трансплантацией от неродственного донора, составила 38%, у больных

старше 15 лет — 60%. При Т-ОЛЛ 5-летняя БРВ была равна  $23 \pm 14\%$ , при других вариантах ОЛЛ —  $38 \pm 6\%$  [110–113].

При Rh-положительном ОЛЛ 5-летняя ОВ у детей и взрослых составила 38% после выполнения родственной и неродственной алло-ТГСК в 1-й ПР и 0% — в последующих ремиссиях. ОВ при данном варианте ОЛЛ после алло- и ауто-ТГСК у пациентов моложе 30 лет была равна 62%, старше 30 лет — 11% [114].

В отличие от ОМЛ алло-ТГСК с «немиелоаблативными» режимами кондиционирования при ОЛЛ используется реже, что связано с вероятностью достижения эффекта, обусловленного РТПЛ, только у 10–15% больных. Тем не менее не исключено, что в последующем показания к данному виду алло-ТГСК при ОЛЛ будут расширены. Достижение ПР после алло-ТГСК с режимом кондиционирования с уменьшенной интенсивностью дозы при рецидиве ОЛЛ возможно у 30–50% больных, при этом 5-летняя ОВ составляет 20%. ПР после алло-ТГСК с «немиелоаблативным» режимом кондиционирования FLAG±Ida констатирована при рецидиве Rh-положительного ОЛЛ. Двухлетняя БРВ составила 47,6%, 2-летняя БРВ равна 30% [115].

Гаплоидентичная алло-ТГСК при ОЛЛ имеет показания, аналогичные таковым при ОМЛ. Несмотря на имеющиеся данные об отсутствии явно выраженного иммунологического эффекта при ОЛЛ, применение данного метода терапии возможно в рецидиве заболевания (собственные данные).

#### Ауто-ТГСК

Особым предметом дискуссии при ОЛЛ в отличие от ОМЛ является обоснованность выполнения ауто-ТГСК. Применение ауто-ТГСК у взрослых при ОЛЛ возможно в 1-й ПР и последующих ремиссиях, что связано с отсутствием удовлетворительных результатов при назначении стандартной химиотерапии и необходимостью поиска новых направлений лечения [116].

Эффективность ауто-ТГСК при ОЛЛ у взрослых зависит от стадии заболевания и наличия прогностически неблагоприятных факторов в момент постановки диагноза. По результатам СВМТР, 3-летняя ОВ после ауто-ТГСК у больных с ОЛЛ в 1-й ПР равна 43%, во 2-й ПР — 37%, при выполнении трансплантации в рецидиве — 15%. По данным ЕВМТ, при проведении ауто-ТГСК 5-летняя ОВ и БРВ составили в 1-й ПР 42 и 36% у взрослых, 54 и 50% у детей, во 2-й ПР — 24 и 21% у взрослых, 41 и 37% у детей соответственно [77].

Применение ауто-ТГСК при ОЛЛ оправданно в случае наличия показаний к интенсификации лечения и отсутствии аллогенного донора ГСК. При сравнении неродственной алло- и ауто-ТГСК у пациентов в возрасте до 50 лет 3-летняя ОВ при ОЛЛ в 1-й ПР была равна 51 и 44%, во 2-й ПР — 40 и 32% соответственно. При этом различия между неродственной алло- и ауто-ТГСК нивелировались за счет увеличения смертности, связанной с развитием осложнений после алло-ТГСК (42 и 20% соответственно) и высоким риском рецидива при ауто-ТГСК (14–25 и 49–64% соответственно) [117].

Проведение ауто-ТГСК в качестве консолидации ремиссии оправданно у больных с ОЛЛ при наличии факторов, свидетельствующих о неблагоприятном прогнозе течения заболевания. Так, 3-летняя БРВ после ауто-ТГСК у больных с Rh-положительным ОЛЛ варьировала от единичных наблюдений до 25% [114, 118]. Однако отдаленные результаты ауто-ТГСК при Rh-положительном ОЛЛ

Таблица 9. Эффективность применения ауто-ТГСК у взрослых с ОЛЛ в 1-й ПР

Автор	Число больных	Возраст, годы	Стадия заболевания	Рецидив, %	БРВ, % (медиана длительности наблюдения), годы
D. Fiere и соавт. [122]	95	15–50	1-я ПР	57	39 (3)
N. Gorin и соавт. [123]	233	1–55	1-я ПР	53	41 (>3)
C. Tiley и соавт. [124]	38	3–41	1-я ПР	35	50 (4)
B. Blaise и соавт. [125]	28	16–57	1-я ПР	57	43 (3)
B. Simonsson и соавт. [126]	53	3–55	>1-й ПР	45	45 (> 1)
K. Doney и соавт. [127]	89	2–46	>1-й ПР	67	15 (3,5)
P. Carey и соавт. [128]	13	18–51	1-я ПР	52	48 (2,5)
D. Lambertenghi и соавт. [129]	20	10–39	>1-й ПР	55	41 (6)
M. Gilmore и соавт. [130]	27	11–45	1-я ПР	67	32 (3,4)
N. Vey и соавт. [131]	34	16–59	1-я ПР	65	27 (4,5)
R. Powles и соавт. [132]	77	16–59	1-я ПР	39	50 (10)

могут быть значительно лучше при ее выполнении в 1-й ПР, длительность которой превышает 6 мес, у пациентов с количеством лейкоцитов в момент постановки диагноза менее  $20,0 \times 10^9/\text{л}$  и хорошим ответом на первичную терапию глюкокортикоидами [119].

Риск возникновения рецидива после ауто-ТГСК при ОЛЛ коррелирует с количественным определением методом ПЦР признаков минимальной остаточной болезни, свидетельствующих об отсутствии молекулярно-биологической ремиссии после ХТ, во время получения ГСК, непосредственно перед трансплантацией или после ее проведения. Значение этих данных превышает такие важные параметры, как иммунофенотипический вариант ОЛЛ, возраст пациента, показатель прогноза и число лейкоцитов в момент постановки диагноза. Высокая вероятность развития раннего рецидива наблюдается при количестве резидуальных бластов  $> 10^{-2}$  после курса индукции и  $> 10^{-3}$  на фоне проведения химиотерапии [120, 121].

Сравнительные данные об эффективности применения ауто-ТГСК у больных ОЛЛ в 1-й ПР представлены в табл. 9 [116].

В связи с важностью вышеуказанных факторов прогноза анализируется влияние «очистки» *ex vivo* аутологичных ГСК от примеси злокачественных клеток на результаты ауто-ТГСК у больных с ОЛЛ, что может выполняться с помощью моноклональных антител, ХТ, ингибиторов тирозинкиназы при Rh-позитивном ОЛЛ. По данным ЕВМТ, не установлено, что этот фактор увеличивает продолжительность жизни больных. Однако в ряде исследований показано, что «очистка» трансплантата влияла на отдаленные результаты терапии: 5-летняя БРВ пациентов после ауто-ТГСК в группе неблагоприятного прогноза в 1-й ПР ОЛЛ составила 52% при «очистке» и 12% без «очистки» трансплантата. Для окончательных выводов относительно необходимости выполнения «очистки» у больных ОЛЛ при ауто-ТГСК необходимо проведение многоцентрового рандомизированного исследования [121].

При применении ауто-ТГСК у больных ОЛЛ не получено данных, свидетельствующих о прямом влиянии источника трансплантата (КМ или ПСКК) на ОВ и БРВ.

С целью повышения эффективности ауто-ТГСК при ОЛЛ была оценена роль поддерживающей терапии МТХ в сочетании с 6-меркаптопурином или преднизолоном в комбинации с винкристином. Длительность терапии составляла до 2 лет после трансплантации. Применение поддерживающей терапии позволило увеличить 5-летнюю БРВ после ауто-ТГСК у больных в 1-й ПР ОЛЛ в целом до 57%, при стандартном риске — до 80% [121]. Тем не менее это направление терапии до сих пор не получило значительного распространения ввиду отсутствия подтверждающих данных, полученных из других источников.

В настоящее время ни один из вариантов терапии ОЛЛ у взрослых не может считаться удовлетворительным. Применение ХТ, ауто- или алло-ТГСК не дает радикальных преимуществ при оценке отдаленных результатов. Тем не менее полное излечение от основного заболевания чаще наблюдается при алло-ТГСК. При ОЛЛ у взрослых показаниями к алло-ТГСК являются возраст больных (до 50 лет), индекс Карновского выше 80%, наличие донора ГСК, поздние сроки достижения морфологической, цитогенетической и молекулярно-биологической ремиссий, неблагоприятный характер цитогенетических изменений в момент постановки диагноза - t (9;22), t (4;11).

Ауто-ТГСК при ОЛЛ у взрослых может быть эффективным методом консолидации ремиссии, а при отсутствии родственного или неродственного донора ГСК рассматриваться как альтернативный метод терапии. Решение в пользу ее проведения зависит от факторов риска и стадии заболевания, эффективности предшествующей ХТ, а также стратегии работы центра трансплантации.

#### **Результаты применения ТГСК при острых лейкозах в Клинике трансплантации костного мозга СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова**

Группой С1С 725 ЕВМТ и Клиникой трансплантации костного мозга СПбГМУ в период с 1990 по 2005 г. выполнено 138 ТГСК у больных острыми лейкозами в возрасте от 2 до 55 лет, из них у 58 больных с ОМЛ (ауто-ТГСК — 20, родственная алло-ТГСК — 18, неродственная алло-ТГСК — 20)

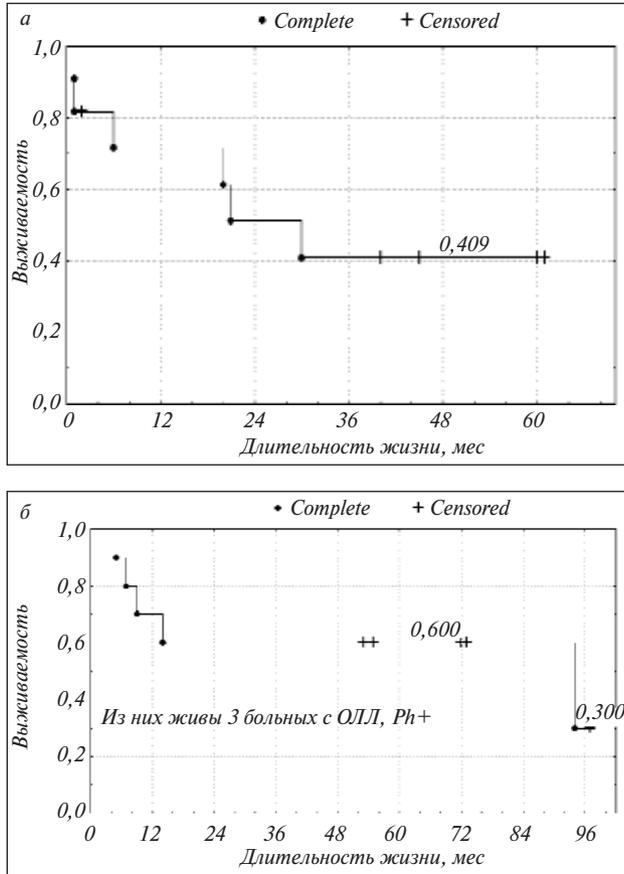


Рис. 3. Пятилетняя (а) и 8-летняя (б) бессобытийная выживаемость после ауто-ТГСК больных всех возрастных групп с ОМЛ (а) и ОЛЛ (б) 1–2-я ремиссия

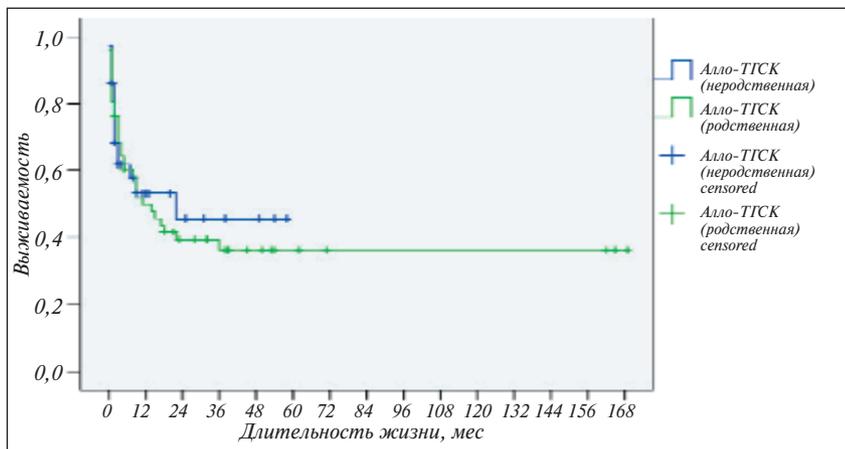


Рис. 4. ОВ больных с острыми лейкозами после алло-ТГСК от родственного и неродственного донора

и у 80 больных с ОЛЛ (ауто-ТГСК – 13, родственная алло-ТГСК – 24, неродственная алло-ТГСК – 43). Один из вариантов ТГСК применяли у пациентов с прогностически неблагоприятными признаками заболевания, в том числе «тяжело предлеченных».

Ауто-ТГСК проводили при ОЛЛ и ОМЛ в 1-й ремиссии при установлении высокого риска заболевания в момент постановки диагноза на основании уровня лейкоцитов (более  $30,0 \times 10^9/\text{л}$ ), наличия прогностически неблагоприятных цитогенетических изменений у 3 пациентов с Rh-положительными ОЛЛ, динамики ответа на индук-

ционный курс ХТ, во 2-й и последующих ремиссиях – при отсутствии HLA-совместимого донора.

Алло-ТГСК у взрослых от родственного и неродственного донора выполняли при ОМЛ и ОЛЛ в 1-й (за исключением неродственной алло-ТГСК при ОЛЛ, стандартный риск) и последующих ремиссиях, рецидиве, первично-резистентном течении заболевания.

В качестве режимов кондиционирования использовали цитостатические препараты в миелоаблативных (BuCy, BuCyVP-16, Thiotepa+Cy, Treosulfan+Cy) и немиелоаблативных дозах (FluMel, FluBu, FluCy). При алло-ТГСК миелоаблативные режимы кондиционирования чаще применяли у пациентов в 1-й или 2-й ремиссиях. Режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью дозы при проведении алло-ТГСК использовали во 2–4-й ремиссиях, рецидиве и у «тяжело предлеченных» пациентов. Основной профилактики оРТПХ являлась общепринятая комбинация иммуносупрессивных препаратов – циклоспорин и МТХ в стандартных дозах. В ряде случаев в связи с индивидуальными особенностями пациента использовали циклоспорин и преднизолон, циклоспорин и микофенолата мофетил. Для достижения максимальной иммуносупрессии при поведении алло-ТГСК от неродственного донора в режим подготовки пациента включали АТГ.

**Результаты.** Пятилетняя бессобытийная выживаемость после ауто-ТГСК в 1–2-й ремиссии при ОМЛ составила 40%, 8-летняя бессобытийная выживаемость у больных с ОЛЛ (в том числе 3 пациента с Ph+) – 30% (рис. 3).

Пятилетняя ОВ после родственной и неродственной алло-ТГСК у больных в возрасте до 21 года с острыми лейкозами составила 38 и 44% соответственно, что указывает на отсутствие существенных различий и позволяет анализировать эффективность данных методов

терапии совместно (рис. 4). При сравнении оба вида алло-ТГСК имели одинаковый спектр осложнений раннего периода (до 100 дней), за исключением более частого развития после неродственной алло-ТГСК цитомегаловирусной инфекции ( $p=0,001$ ), геморрагического цистита ( $p=0,001$ ) и токсического поражения ЦНС ( $p=0,03$ ).

Пятилетняя ОВ больных с ОМЛ и ОЛЛ зависела от стадии заболевания в момент выполнения алло-ТГСК и была равна при ОЛЛ в ремиссии – 52%, в рецидиве – 5,9%, при ОМЛ – 62,5 и 27,3% соответственно (рис. 5).

**Заключение.** Ауто-ТГСК при ОЛЛ и ОМЛ является эффективным методом консолидации ремиссии и может рассматриваться как альтернативный метод терапии в случае отсутствия у пациента родственного или неродственного донора. Эффективность алло-ТГСК от родственного и неродственного донора при острых лейкозах зависит от стадии в момент ее проведения, что определяет не только течение заболевания, но и общее состояние и вероятность развития различных осложнений (токсических, инфекционных, «неприживления» трансплантата).

Несмотря на эффективность ТГСК, перспективы дальнейшего развития этого направления зависят от

успехов медицинской науки в разрешении ряда проблем. ТГСК остается чрезвычайно сложным и опасным методом лечения из-за наличия большого количества ранних и поздних осложнений, приводящих к преждевременной смертности и снижению качества жизни [36, 133–135]. Использование немиелоаблативных режимов кондиционирования в значительной степени снижает проблему органотоксичности, что расширяет возрастные границы для пациентов, у которых может быть применена алло-ТГСК. Немиелоаблативные режимы также могут быть показаны при наличии у пациентов различных сопутствующих заболеваний, являющихся противопоказанием к проведению алло-ТГСК с использованием стандартных режимов кондиционирования. Однако немиелоаблативные режимы кондиционирования не снимают актуальности развития ряда серьезных осложнений, в том числе иммунных, прежде всего РТПХ, и выраженного иммунодефицита в посттрансплантационном периоде. Более того, общепринятые представления о классификации РТПХ, сроках развития острой и хронической РТПХ, инфекционных осложнений, иммунологических конфликтах, связанных с несовместимостью по системе АВ0 и резус-фактору, особенно с малой и смешанной АВ0-несовместимостью, имеют особенности при выполнении алло-ТГСК с немиелоаблативными режимами кондиционирования и нуждаются в разработке усовершенствованных методов профилактики и лечения [136, 137].

Острая и хроническая РТПХ до сих пор являются основной причиной посттрансплантационной летальности и ухудшения качества жизни больных после алло-ТГСК. Следует отметить, что использование новых иммунодепрессантов, таких как такролимус, сиролимус, моноклональных антител (анти-CD52, анти-CD20, антител к рецепторам интерлейкина-2, фактора некроза опухолей и др.), химиофотофереза значительно улучшило профилактику и результаты терапии РТПХ.

В последние годы получены обнадеживающие результаты использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) для профилактики и лечения РТПХ, что связано с наличием выраженного иммуносупрессивного эффекта этих клеток при внутривенном введении [138, 139].

Наряду с этим изучается возможность применения иммуносупрессивного эффекта МСК для лечения различных аутоиммунных заболеваний — рассеянного склероза, коллагенозов, нефритов.

При немиелоаблативных режимах кондиционирования остается актуальной проблема «неприживления»

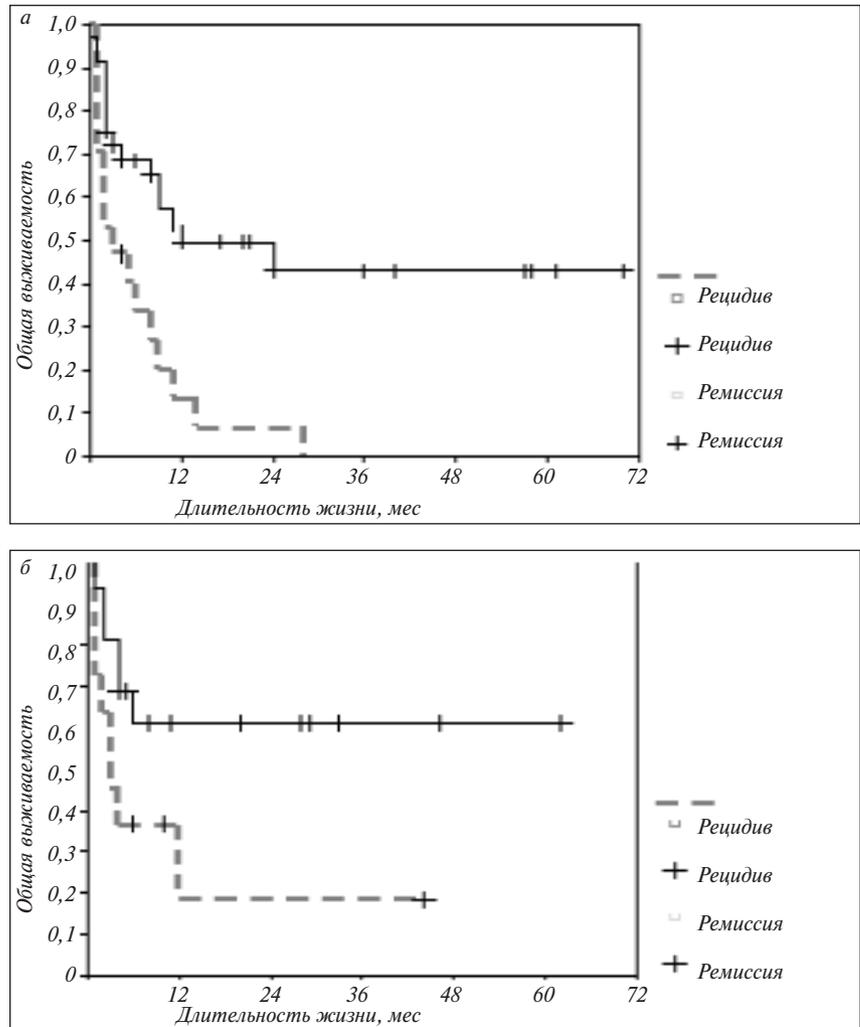


Рис. 5. Пятилетняя ОВ больных ОЛЛ (а) и ОМЛ (б) после алло-ТГСК в зависимости от стадии заболевания

или отторжения аллогенного трансплантата. Возможности использования МСК для профилактики этих осложнений также интенсивно изучаются. Введение МСК взрослых доноров или МСК околоплодных вод человека совместно с ГСК открывают перспективы применения трансплантата с дефицитом стволовых клеток CD34+, CD 133+, например, клеток пуповинной крови у пациентов с большой массой тела [140, 141].

Применение МСК и селективное введение различных иммунокомпетентных клеток могут быть актуальны для алло-ТГСК от гаплоидентичных доноров с целью контроля над развитием основных осложнений данной трансплантации — выраженного иммунодефицитного состояния и оРТПХ, а также развития рецидива основного заболевания.

Иммуносупрессивная терапия РТПХ иногда приводит и к негативным последствиям — уменьшению интенсивности РТПЛ/О. Разделение патогенетических звеньев РТПХ и РТПЛ/О открывает перспективы избирательного подавления клинических проявлений РТПХ при сохранении РТПЛ/О.

К негативным последствиям немиелоаблативных режимов кондиционирования можно отнести возможное увеличение частоты рецидивирования лейкозов, особенно ОЛЛ, ввиду их низкой чувствительности к им-

муноадаптивному воздействию DLI. Одним из способов решения этой проблемы являются поиски достаточного совместимых по HLA-системе доноров, однако различающихся по антигенам клеток иммунологического надзора над злокачественными клетками, например киллерингибиторным рецепторам (KIR-системе).

Медленное восстановление клеток иммунной системы (В-, Т-лимфоцитов, естественных киллеров, дендритических клеток) в посттрансплантационном периоде является не только отрицательным прогностическим фактором для развития инфекционных осложнений, но и фактором риска возникновения рецидива опухоли. Стимуляция или селективное введение субпопуляций иммунокомпетентных клеток в посттрансплантационном периоде открывает перспективы более эффективного контроля за развитием этих осложнений.

Другим направлением уменьшения частоты развития рецидивов лейкозов после немиелоаблативных режимов кондиционирования является использование в пред- и посттрансплантационном периоде препаратов целенаправленного действия, таких как гливек, и других ингибиторов тирозинкиназ при VCR-ABL+, stem cell factor+, PDGF+ мутациях.

Таким образом, несмотря на все сложности, ТГСК в ближайшее время будет оставаться одним из самых эффективных и перспективных методов лечения широкого круга злокачественных, генетических и иммунных заболеваний. Данные фундаментальных исследований и результаты клинического применения ТГСК являются основой для развития клеточной терапии других, негематологических заболеваний человека с целью замещения поврежденных органов и тканей, усиления их физиологических и репаративных процессов.

## Л и т е р а т у р а

- Copelan E.A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *New Engl J Med* 2006;354(17):1813–26.
- Gluckman E., Rocha V., Chastang C.L. Blood hematopoietic stem cells biology and transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1999; 1–14.
- Gratwohl A., Baldomero H., Schmid O. et al. Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(7):575–90.
- Anasetti C. Advances in unrelated donor hematopoietic cell transplantation: improved matching and use of blood stem cells. *Haematologica* 2002;87(8) (Suppl):1–3.
- Ljungman P., Urbano-Ispizua A., Cavazzana-Calvo M. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(5):439–49.
- Carreras E., Jimenez M., Gomez-Garcia V. et al. Donor age and degree of HLA matching have a major impact on the outcome of unrelated donor haematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(1):33–40.
- Fagioli F., Ricchiardi A., Carnevale-Schianca F. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2002;87(8 Suppl):13–9.
- Locatelli F., Zecca M., Rondelli R. et al. Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. *Blood* 2000;95(5):1572–9.
- Munker R., Gunther W., Kolb H.J. New concepts about graft-versus host and graft-versus-leukemia-reactions. A summary of the 5th International Symposium held in Munich, 21 and 22 March 2002. *Bone Marrow Transplant* 2002;30(9):549–56.
- Slavin S., Nagler A., Naparstek E. et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic disease. *Blood* 1998;91(3):756–63.
- Urbano-Ispizua A., Rozman C., Pimentel P. et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in patients undergoing transplantation with CD34+ selected blood cells from HLA-identical siblings. *Blood* 2002;100(2):724–7.
- Афанасьев Б.В., Алмазов В.А. Родоначальные стволовые клетки человека. Л., Наука; 1985. с. 202.
- Appelbaum F.R., Gilliland D.G., Tallman M.S. The biology and treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1999;15–43.
- Bacigalupo A. Second EBMT Workshop on reduced intensity allogeneic hemopoietic stem cell transplants (RI-HSCT). *Bone Marrow Transplant* 2002;29(3):191–5.
- Bacigalupo A., Oneto R., Lamparelli T. et al. Pre-emptive therapy of acute graft-versus-host disease: a pilot study with antithymocyte globulin (ATG). *Bone Marrow Transplant* 2001;28(12):1093–6.
- Corradini P., Tarella C., Olivieri A. et al. Reduced-intensity conditioning followed by allografting of hematopoietic cells can produce clinical molecular remissions in patients with poor-risk hematologic malignancies. *Blood* 2002;99(1):75–82.
- Djulbegovic B., Seidenfeld J., Bonnell C., Kumar A. Nonmyeloablative allogeneic stem-cell transplantation for hematologic malignancies. *Cancer Control* 2003;10(1):17–41.
- Kassim A.A., Chinratanalab W., Ferrara J.L., Mineishi S. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemias: what is the best recipe? *Bone Marrow Transplant* 2005;36(7):565–74.
- Maris M.B., Niederwieser D., Sandmaier B.M. et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003;102(6):2021–30.
- Or R., Shapira M.Y., Resnick I. et al. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia in first chronic phase. *Blood* 2003;101(2):441–5.
- Popplewell L.L., Forman S.J. Is there an upper age limit for bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2002;29(4):277–84.
- Zander A.R., Kroger N., Schleuning M. et al. ATG as part of the conditioning regimen reduces transplant-related mortality (TRM) and improves overall survival after unrelated stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Bone Marrow Transplant* 2003;32(4):355–61.
- Antin J.H., Childs R., Filipovich A.H. et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:473–85.
- Novitzky N., Davison G.M. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 2001;3(3):211–20.
- Dasgupta R.K., Rule S., Johnson P. et al. Fludarabine phosphate and melphalan: a reduced intensity conditioning regimen suitable for allogeneic transplantation that maintains the graft versus malignancy effect. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(5):455–61.
- McSweeney P.A., Niederwieser D., Shizuru J.A. et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001;97(11):3390–400.
- Niederwieser D., Maris M., Shizuru J.A. et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgraft-

- ing immunosuppression with cyclosporin and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003;101(4):1620–9.
28. Marks D.I., Lush R., Cavenagh J. et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;100(9):3108–14.
29. Bethge W.A., Hegenbart U., Stuart M.J. et al. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2004;103(3):790–5.
30. Виноградова О.А., Савченко В.Г., Домрачева Е.В. и др. Молекулярный цитогенетический мониторинг химеризма и минимальной остаточной болезни у пациентов с хроническим миелолейкозом после аллогенной и сингенной трансплантации костного мозга. *Тер арх* 2002;(7):38–44.
31. Billiau A.D., Fevery S., Rutgeerts O. et al. Crucial role of timing of donor lymphocyte infusion in generating dissociated graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses in mice receiving allogeneic bone marrow transplants. *Blood* 2002;100(5):1894–902.
32. Cornelissen J.J., Carston M., Kollman C. et al. Unrelated marrow transplantation for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome. *Blood* 2001;97(6):1572–7.
33. Kallianpur A. Genomic screening and complications of hematopoietic stem cell transplantation: has the time come? *Bone Marrow Transplant* 2005;35(1):1–16.
34. Gratwohl A., Baldomero H., Frauendorfer K. et al. EBMT activity survey 2004 and changes in disease indication over the past 15 years. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(12):1069–85.
35. Bolwell B. Are predictive factors clinically useful in bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2003;32(9):853–61.
36. Leiper A.D. Non-endocrine late complications of bone marrow transplantation in childhood: part I. *Br J Haematol* 2002;118(1):3–22.
37. Sorror M., Maris M., Storb R. et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005;106(8):2912–9.
38. Vogelsang G.B. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001;97(5):1196–201.
39. Баранова О.Ю., Волкова М.А., Френкель М.А. и др. Анализ результатов различных программ терапии острых миелобластных лейкозов МО–М2, М4–М7 ФАБ-вариантами (по данным РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина). *Гематол трансфузиол* 2003;(3):10–3.
40. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Глясова Г.А. и др. Результаты 2,5-летней работы Российского мультицентрового исследования по лечению острого миелоидного лейкоза у взрослых. *Тер арх* 1995;(7):8–12.
41. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н. Лечение острых лейкозов (Клинические исследования). М., МЕДпресс-информ; 2004. с. 223.
42. Buchner T., Hiddemann W., Wörmann B. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93(12):4116–24.
43. Giles F.J., Keating A., Goldstone A.H. et al. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;:73–110.
44. Hoelzer D., Gokbuget N., Ottmann O. et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1999;:162–92.
45. Hoelzer D., Gokbuget N., Digel W. et al. Outcome of adult patients with T-lymphoblastic lymphoma treated according to protocols for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(12):4379–85.
46. Annual meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *EBMT News* 2003;13:3.
47. Bacigalupo A. Bone marrow or peripheral blood as a source of stem cells for allogeneic transplantation. *Haematologica* 2002;87(8 Suppl):4–8.
48. Davies S.M., Kollman C., Anasetti C. et al. Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood* 2000;96(13):4096–102.
49. Deeg H.J., Storer B., Slattery J.T. et al. Conditioning with targeted busulfan and cyclophosphamide for hematopoietic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100(4):1201–7.
50. Kern W., Haferlach T., Schoch C. et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1991 Trial. *Blood* 2003;101(1):64–70.
51. Appelbaum F. Dose intensity and the toxicity and efficacy of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005;19:171–5.
52. Glucksberg H., Storb R., Fefer A. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18(4):295–304.
53. Handgretinger R., Lang P., Klingebiel T., Niethammer D. CD34 stem cell dose and development of extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2002;99(10):3875–7.
54. LeMaistre C.F., Loberiza F.R. Jr. What is quality in a transplant program? *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(4):241–6.
55. Morton J., Hutchins C., Durrant S. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) primed allogeneic bone marrow: significantly less graft-versus-host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 2001;98(12):3186–91.
56. Ringden O., Labopin M., Bacigalupo A. et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2002;20(24):4655–64.
57. Ringden O., Labopin M., Gorin N.C. et al. The dismal outcome in patients with acute leukemia who relapse after an autograft is improved if a second autograft or a matched allograft is performed. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(10):1053–8.
58. Ringden O., Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS* 2005;113(11–12):813–30.
59. Knechtli C.J., Goulden N.J., Hancock J.P. et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92(11):4072–9.
60. Любимова Л.С., Савченко В.Г., Менделеева Л.П. и др. Эффективность трансплантации аллогенного костного мозга у больных острыми лейкозами в фазе полной ремиссии и у больных хроническим миелолейком в хронической фазе. *Тер арх* 1999;(7):27–32.
61. Cornelissen J., Lowenberg B. Role of allogeneic stem cell transplantation in current treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;:151–5.
62. Gupta V., Lazarus H.M., Keating A. Myeloablative conditioning regimen for AML allografts: 30 years later. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(10):969–78.
63. Luger S., Sacks N. Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome – who? when? and which? *Bone Marrow Transplant* 2002;30(4):199–206.
64. Song K.W., Lipton J. Is it appropriate to offer allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to patients with primary refractory acute myeloid leukemia? *Bone Marrow Transplant* 2005;36(3):183–91.
65. Cassileth P.A., Harrington D.P., Appelbaum F.R. et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in the first remission. *N Engl J Med* 1998;339(23):1649–56.
66. Tallman M.S., Rowings P.A., Milone G. et al. Effect of posremission chemotherapy before human leukocyte antigen-identical sibling transplantation for acute myelogenous leukemia in first complete remission. *Blood* 2000;96(4):1254–8.
67. Van der Straaten H.M., van Biezen A., Brand R. et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome who have chromosome 5 and/or 7 abnor-

- malities. *Hematologica* 2005;90(10):1339–45.
68. Zittoun R.A., Mandelli F., Willemze R. et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myeloid leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 1995;332(4): 217–23.
69. Grimwade D., Walker H., Harrison G. et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood* 2001;98(5):1312–20.
70. Licht J., Sternberg D. The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;:137–42.
71. Масчан А.А., Румянцев А.Г. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. М., Медицинское информационное агентство; 2003. с. 909.
72. Птушкин В.В., Селидовкин Г.Д., Чемишкян К.Л. и др. Применение аутологичных клеток предшественников гемопоэза из периферической крови для трансплантации у больных с гемопоэтическими и солидными новообразованиями после высокодозной химиотерапии. *Гематол трансфузиол* 1996;(1):9–13.
73. Птушкин В.В. Методы получения клеток-предшественников гемопоэза из периферической крови. *Гематол трансфузиол* 2000;(6):43–5.
74. Alamo J., Shahjahan M., Lazarus H. et al. Comorbidity indices in hematopoietic stem cell transplantation: a new report card. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(6):517–23.
75. Kumar S., Chen M.G., Gastineau D. et al. Prophylaxis of graft-versus-host disease with cyclosporine-prednisone is associated with increased risk of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(11):1133–40.
76. Ruutu T., Volin L., Parkkali T. et al. Cyclosporine, methotrexate, and methylprednisone compared with cyclosporine and methotrexate for the prevention of graft-versus-host disease in bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donor: a prospective randomized study. *Blood* 2000;96(7):2391–8.
77. IBMTR/ABMTR 2002;9(1).
78. Papadopoulos E.B., Carabasi M.H., Castro-Malaspina H. et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood* 1998;91(3):1083–90.
79. Sucui S., Mandelli F., de Witte T. et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR 1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* 2003;102(4):1232–40.
80. Lazarus H., Perez W., Klein J. et al. Autotransplantation versus HLA-matched unrelated donor transplantation for acute myeloid leukemia: a retrospective analysis from the center for International Blood and Marrow transplant research. *Br J Hematol* 2005;132:755–69.
81. Kanda Y., Chiba S., Hirai H. et al. Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical sibling over the last decade (1991–2000). *Blood* 2003;102(4):1541–7.
82. Blaise D., Maraninchi D., Michallet M. et al. Long-term follow-up of a randomized trial comparing the combination of cyclophosphamide with total body irradiation or busulfan as conditioning regimen for patients receiving HLA-identical marrow grafts for acute myeloblastic leukemia in first complete remission. *Blood* 2001;97(11):3669–71.
83. Przepiorcka D., Smith T.L., Folloder J. et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 1999;94(4):1465–70.
84. Neudorf S., Sanders J., Kobrinsky N. et al. Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myelocytic leukemia in first remission demonstrates a role for graft versus leukemia in the maintenance of disease-free survival. *Blood* 2004;103(10):3655–61.
85. Remberger M., Kumlien G., Aschan J. et al. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(12):674–82.
86. Bunjes D. The current status of T-cell depleted allogeneic stem-cell transplants in adult patients with AML. *Cytotherapy* 2001;3(3):175–88.
87. Flowers M.E., Parker P.M., Johnston L.J. et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002;100(2):415–9.
88. Koc S., Leisenring W., Flowers M.E.D. et al. Therapy of chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 2002;100(1):48–51.
89. Kroger N., Zabelina T., Kruger W. et al. In vivo T cell depletion with pretreatment anti-thymocyte globulin reduces graft-versus-host disease without increasing relapse in good risk myeloid leukemia patients after stem cell transplantation from matched related donors. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(8):683–9.
90. Lee S.J., Zahrieh D., Alyea E.P. et al. Comparison of T-cell depleted and non-T-cell-depleted unrelated donor transplantation for hematologic disease: clinical outcomes, quality of life, and costs. *Blood* 2002;100(8):2697–702.
91. Martino R., Caballero M.D., Simon J.A. et al. Evidence for graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002;100(6):2243–5.
92. Mohty M., Kuentz M., Michallet M. et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood* 2002;100(9):3128–34.
93. Mohty M., de Lavallade H., Ladaïque P. et al. The role of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: a donor vs no donor comparison. *Leukemia* 2005;19(6):916–20.
94. Hegenbart U., Niederwieser D., Sandmaier B.M. et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 2006;24(3):444–53.
95. Sayer H., Kroger M., Beyer J. et al. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(12):1089–95.
96. De Lima M., Anagnostopoulos A., Munsell M. et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104(3):865–72.
97. Aversa F. Full haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplants. *Haematologica* 2002;87(8 Suppl):9–12.
98. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295(5562):2097–100.
99. Martelli M.F., Aversa F., Bachar-Lustig E. et al. Transplants across human leukocyte antigen barriers. *Semin Hematol* 2002;39(1):48–59.
100. Reisner Y., Martelli M.F. Transplantation tolerance induced by 'mega dose' CD34+ cell transplants. *Exp Hematol* 2000;28(2):119–27.
101. Ji S.-Q., Chen H.-R., Wang H.-X. et al. G-CSF-primed haploidentical marrow transplantation without ex vivo T cell depletion: an excellent alternative for high-risk leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(12):861–6.
102. Lowenberg B., Griffin J., Tallman M. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;:82–101.
103. Hessling J., Kroger N., Werner M. et al. Dose-reduced conditioning regimen followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 2002;119(3):769–72.
104. Gorin N. Autologous stem cell trans-

- plantation in acute myelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1999;119–37.
105. Strodtbeck D., Bornhauser M., Hanel M. et al. Graft clonogenicity and intensity of pre-treatment: factors affecting outcome of autologous peripheral hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(12):1083–8.
106. Hahn T., Wall D., Camitta B. et al. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: an evidence-based review. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1):1–30.
107. Willemsse M.J., Seriu T., Hettinger K. et al. Detection of minimal residual disease identified differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99(12):4386–93.
108. Kiehl M., Kraut L., Schwerdtfeger R. et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: no difference in related compared with unrelated transplant in first complete remission. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2816–25.
109. Felix C.A., Lange B., Chessells J.M. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000;285–302.
110. Bunin N., Carston M., Wall D. et al. Unrelated marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Blood* 2002;99(9):3151–7.
111. Snyder D.S. Allogeneic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome – positive acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(6):597–603.
112. Thomas D.A., Faderl S., Cortes J. et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004;103(12):4396–407.
113. Yanada M., Naoe T., Iida H. et al. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in adults: significant roles of total body irradiation and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(10):867–72.
114. Kroger N., Kruger W., Wacker-Backhaus G. et al. Intensified conditioning regimen in bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome – positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(11):1029–33.
115. Deane M., Koh M., Foroni L. et al. FLAG-idarubicin and allogeneic stem cell transplantation for Ph-positive ALL beyond first remission. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(12):1137–43.
116. Mato A.R., Luger S. Autologous stem cell transplant in ALL: who should we be transplanting in first remission? *Bone Marrow Transplant* 2006;37(11):989–95.
117. Weisdorf D., Bishop M., Dharan B. et al. Autologous versus allogeneic unrelated donor transplantation for acute lymphoblastic leukemia: comparative toxicity and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(4):213–20.
118. Arico M., Valsecci M.G., Camitta B. et al. Outcome of treatment with Philadelphia chromosome – positive acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 2000;34:998–1006.
119. Зубаровская Л.С., Сицкая К.О., Морозова Е.В., Афанасьев Б.В. Трансплантация стволовых гемопоэтических клеток при злокачественных заболеваниях системы крови у детей. *Гематол трансфузиол* 1998;(3):36–7.
120. Biondi A., Cazzaniga G. Molecular diagnosis and monitoring of acute lymphoblastic leukemia: applications and limitations. In: EHA, Educational book. 2000. p. 98–101.
121. Gorin N.C. Autologous stem cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia. *Stem cells* 2002;20(1):3–10.
122. Fiere D., Lepage E., Sebban C. et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicentric randomized trial testing bone marrow transplantation as postremission therapy. The French Group on Therapy for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 1993;11(10):1990–2001.
123. Gorin N., Aegerter P., Auvert B. Autologous bone marrow transplantation for acute leukemia in remission: an analysis of 1322 cases. *Haematol Blood Transfus* 1990;33:660–6.
124. Tiley C., Powles R., Treleavan J. et al. Feasibility and efficacy of maintenance chemotherapy following autologous bone marrow transplantation for first remission acute lymphoblastic leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1993;12(5):449–55.
125. Blaise D., Attal M., Pico J.L. et al. The use of a sequential high dose recombinant interleukin 2 regimen after autologous bone marrow transplantation does not improve the disease free survival of patients with acute leukemia transplanted in first complete remission. *Leuk Lymphoma* 1997;25(5–6):469–78.
126. Simonsson B., Burnett A.K., Prentice H.G. et al. Autologous bone marrow transplantation with monoclonal antibody purged marrow for high risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1989;3(9):631–6.
127. Doney K., Buckner C.D., Fisher L. et al. Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1993;12(4):315–21.
128. Carey P., Proctor S., Taylor P. et al. Autologous bone marrow transplantation for high-grade lymphoid malignancy using melphalan/irradiation conditioning without marrow purging or cryopreservation. The Northern Regional Bone Marrow Transplant Group. *Blood* 1991;77(7):1593–8.
129. Lambertenghi Delilieri G., Mozzana R., Annaloro C. et al. Long-term results of autologous bone marrow transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993;11(5–6):419–25.
130. Gilmore M.J., Hamon M.D., Prentice H.G. et al. Failure of purged autologous bone marrow transplantation in high risk acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1991;8(1):19–26.
131. Vey N., Blaise D., Stoppa A.M. et al. Bone marrow transplantation in 63 adult patients with acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(3):383–8.
132. Powles R., Sirohi B., Treleavan J. et al. The role of posttransplantation maintenance chemotherapy in improving the outcome of autotransplantation in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(5):1641–7.
133. Socie G., Salooja N., Cohen A. et al. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003;101(9):3373–85.
134. Wolff S.N. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(7):545–52.
135. Zecca M., Prete A., Rondelli R. et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact of outcome. *Blood* 2002;100(4):1192–200.
136. Worel N., Greinix H.T., Keil F. et al. Severe immune hemolysis after minor ABO-mismatched allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation occurs more frequently after nonmyeloablative than myeloablative conditioning. *Transfusion* 2002;42(10):1293–301.
137. Worel N., Kalhs P., Keil F. et al. ABO mismatch increases transplant-related morbidity and mortality in patients given nonmyeloablative allogeneic HPC transplantation. *Transfusion* 2003;43(8):1153–61.
138. Le Blanc K., Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(5):321–34.
139. Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81(10):1390–7.
140. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem cells* 2004;22(5):649–58.
141. Lu L.L., Lui Y.J., Yang S.G. et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006;91(87):1017–26.

# РОЛЬ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ С ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ С НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ

В.В. Птушкин, Н.В. Жуков, С.В. Миненко, А.Ю. Попов, Д.М. Мхеидзе, Л.Ю. Андреева  
РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

ROLE OF HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY WITH HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

V.V. Ptushkin, N.V. Zhukov, S.V. Minenko, A.Y. Popov, D.M. Mheidze, L.Y. Andreeva  
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

High-dose chemotherapy (HDC) with autologous or allogenic hemopoietic stem cell transplantation (SCT) is successfully used in refractory, relapsed or high-risk primary aggressive non-Hodgkin's lymphomas (NHL). Results on HDC employing in follicular lymphoma, is inconclusive. Recent studies has suggested that combining of anti-CD20 (rituximab) with HDC (HDC-R) may successfully eliminate minimal residual disease, further delaying or preventing disease relapse and potentially extending the duration of survival after autologous SCT in patient with aggressive B-cell lymphomas. The paper discusses recent dates on HDC-R treatment strategy and presents the author's own data on the use of HDC with autologous SCT in a group of 50 patients with relapsed and primary resistant NHL (22 of them received rituximab at different stages of treatment - remission induction, stem cell collection, posttransplantation period). In all patients receiving high-dose therapy, 5-year overall survival was 40.3% and 5-year relapse-free survival was 77.5%. 5-year overall survival was 52% in patients with the B-cell phenotype treated with HDC plus rituximab, and 21% in those treated with HDC only ( $p = 0.014$ ). Treatment toxicity was comparable in both groups.

**Key words:** non-Hodgkin's lymphomas, high-dose chemotherapy, hemopoietic stem cell transplantation, rituximab

**К**ак показали исследования, проводимые *in vitro* и на животных моделях, увеличение дозы многих цитостатиков пропорционально усиливает тумороцидный эффект для ряда опухолевых линий, включая злокачественные лимфомы, что позволяет преодолеть лекарственную резистентность [1]. В то же время эскалация доз сопровождается и ростом токсичности, т.е. повреждением нормальных органов и тканей. Для многих химиопрепаратов (алкилирующие агенты, этопозид, митоксантрон и т.д.) дозопонижающей токсичностью является подавление кроветворной функции костного мозга, приводящее к лейко- и тромбоцитопении с развитием инфекционных и геморрагических осложнений. Разработка методов трансплантации донорских (аллогенных) кроветворных клеток, выделенных из костного мозга или из крови, позволила безопасно увеличить интенсивность химиотерапии. Аллотрансплантация помимо быстрого восстановления гемопоэза усиливает противоопухолевое воздействие цитостатиков за счет иммунной атаки на опухоль (реакция «трансплантат против опухоли»). В то же время возможности подбора гистосовместимого донора в настоящее время ограничены, и значительная часть пациентов не имеет шанса на успешную трансплантацию. Использование методики трансплантации аутологичных (т.е. выделенных из костного мозга или крови самого больного) стволовых кроветворных клеток (СКК) позволяет значительно увеличить число пациентов, которым может быть проведена высокодозная химиотерапия (ВХТ). В то же время этот вид трансплантации не оказывает иммунологического действия на остаточную опухоль и может сопровождаться попаданием опухолевых клеток в организм пациента вместе с кроветворными клетками. Достижения трансплантологии стимулировали исследования по применению ВХТ в клинической практике. Если в 1960-х годах метод использовался в основном при лечении лейкозов, то в 1980-х годах он стал широко применяться и у пациентов с лимфомами.

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) представляют собой гетерогенную группу опухолей Т(НК)- и В-линий лимфоидного роста кроветворения. Существуют различные классификации лимфом, но в большинстве из них выделяются индолентные (медленно развивающиеся), а также агрессивные и даже сверхагрессивные, в зависимости от характера клинического течения. К сверхагрессивным относят лимфомы из клеток-предшественников, лимфому Беркитта и плазмоклеточный лейкоз. К агрессивным лимфомам, или лимфомам высокой степени злокачественности, относят диффузную крупноклеточную лимфому (ДККЛ), фолликулярную лимфому III цитологического типа, мантийно-клеточную лимфому (иногда ее относят и к индолентным лимфомам), множественную миелому. К индолентным, или лимфомам низкой степени злокачественности, относят лимфоцитарную лимфому из мелких клеток/хронический лимфобластный лейкоз (ХЛЛ), лимфоплазмацитоидную лимфому/макроглобулинемию Вальденстрема, спленическую лимфому маргинальной зоны, экстранодальные В-клеточные опухоли маргинальной зоны/МАЛТ-лимфомы, фолликулярную лимфому I и II цитологического типа. Это разделение, во многом условное, определяется принципиально различными подходами к их начальному лечению. Если в случае индолентных лимфом на первом этапе возможна тактика наблюдения, то при агрессивных лимфомах активная химиотерапия используется как можно раньше.

Подходы к терапии НХЛ в последние годы развиваются очень быстро. Появление новых препаратов (ингибиторы протеасом — бортезомиб, противосмысловые олигонуклеотиды — анти-BCL2), моноклональных антител к опухолевым антигенам (анти-CD20 — ритуксимаб, анти-CD52 — алемтузумаб), антиангиогенных агентов (анти-VEGF — бевацизумаб, талидомид) открывают новые возможности лечения. В то же время до полного решения проблемы еще далеко. Одним из обстоятельств, затрудняющих разработку эффективных схем терапии, является

разнообразие неоплазий данного типа. НХЛ значительно различаются по своим клеточным источникам (неопухольевым аналогам), иммуноморфологии, цитогенетическим нарушениям. Анализ активности генов в клетках лимфом может свидетельствовать о том, что и в рамках устоявшихся относительно гомогенных групп этих опухолей имеются подтипы, значительно различающиеся по чувствительности к терапии и прогнозу. Так, группу диффузных В-клеточных крупноклеточных лимфом (В-ДККЛ) можно подразделить на лимфомы из клеток герминального центра и клеток, прошедших герминальный центр (активированных лимфоцитов). Лимфомы последней группы значительно хуже отвечают на стандартную химиотерапию независимо от наличия других факторов риска. Все эти факты делают необходимым разработку лечебных подходов с учетом каждого конкретного варианта лимфомы. Во многом это касается и ВХТ с трансплантацией СКК. За 30 лет клинического использования данный подход из экспериментального к середине 1990-х гг. для определенных вариантов НХЛ превратился в стандартный [2]. По мере накопления клинического опыта и появления новых препаратов, позволяющих модифицировать методику ВХТ, ее роль и место продолжает постоянно меняться.

### **Сверхагрессивные лимфомы**

**Лимфомы из клеток-предшественников (лимфобластные).** Лимфомы из клеток-предшественников (Т- и В-клеток) — это относительно редкая группа НХЛ, составляющая, по некоторым данным, 2–4% от числа первично выявленных [3]. Агрессивный характер течения с частым поражением костного мозга и ЦНС во многом объединяет ее с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Использование стандартных режимов химиотерапии для НЛ (типа СНОР), как правило, не сопровождается высокой долговременной выживаемостью. В связи с этим во многих центрах уже на стадии начальной терапии (особенно при Т-клеточной иммуноморфологии) проводят ВХТ с аллотрансплантацией. В то же время интенсификация режимов первой линии или использование протоколов лечения ОЛЛ в этой подгруппе (hyper-CVAD [4], VFM [5]) позволило значительно улучшить долговременные результаты лечения. Выживаемость без прогрессирования, в том числе больных с Т-клеточными лимфомами, в течение 3 лет в этих исследованиях превышает 60%. Это делает применение аллотрансплантации целесообразным, возможно, лишь в подгруппе пациентов, имеющих дополнительные факторы риска (медленный ответ на начальную терапию, поражение ЦНС, неблагоприятный профиль активности генов) и требует подтверждения в проспективных исследованиях. Применение ВХТ с ауто-трансплантацией у первичных больных не сопровождалось в некоторых исследованиях высокой 5-летней безрецидивной и общей выживаемостью, составившей 40 и 46% соответственно [6].

В случае рецидива или при первичной резистентности лимфомы из клеток-предшественников стандартная химиотерапия значительно менее действенна. Существуют работы, свидетельствующие об эффективности ВХТ с ауто- [7] или аллотрансплантацией [8] в этой клинической ситуации. Для выявления возможного преимущества аллотрансплантации за счет реакции «трансплантат против лимфомы» (РТПЛ) был проведен ретроспективный анализ результатов трансплантаций двух типов у больных с НХЛ из клеток-предшественников [9]. В анализ были включены

данные 204 больных (128 после ауто-трансплантации и 76 после совместимой родственной аллотрансплантации). 5-летняя общая выживаемость составила 44% для ауто- и 39% для аллотрансплантации, выживаемость без лимфомы — 39 и 36% соответственно (различия недостоверны). Применение аллотрансплантации сопровождалось значительно меньшей частотой рецидивов (34% против 56%), но большей токсической смертностью (18% против 3%). Авторы делают вывод об эффективности обеих методик, а также об их недостатках, которые, возможно, следует в случае ауто-трансплантации исправить за счет посттрансплантационной консолидации (иммунотерапия), а в случае аллотрансплантации — за счет разумного снижения интенсивности химиотерапии. Действенность этих рекомендаций является предметом дальнейших исследований.

**Лимфомы Беркитта.** Лимфома Беркитта у взрослых встречается достаточно редко. Высокий пролиферативный индекс, быстрое вовлечение в опухолевый процесс экстранодальных областей (ЦНС, кишечник) позволяют отнести данный вариант В-клеточной зрелоклеточной пролиферации к сверхагрессивным. В то же время стандартная интенсивная полихимиотерапия первой линии позволяет излечить более половины пациентов. В одном из исследований ВХТ с ауто-трансплантацией у первичных больных оказалась также высокоэффективной [6]. Применение высокодозного режима BEAM в группе пациентов без поражения ЦНС и массивного вовлечения костного мозга позволило добиться долговременной безрецидивной и общей выживаемости в 73 и 80% случаев соответственно. Эти результаты высоки, однако остается открытым вопрос, насколько они превышают результаты использования стандартных интенсивных протоколов. Прямых сравнительных исследований не проводилось, кроме того, следует принять во внимание селекцию пациентов при проведении ВХТ с трансплантацией СКК. Аллотрансплантация не продемонстрировала преимуществ перед аутологичной при лечении лимфомы Беркитта. Анализ EBMT показал отсутствие снижения частоты рецидивов при значительно более высокой токсической смертности [10]. По результатам ряда небольших исследований, ВХТ с ауто-трансплантацией используется достаточно эффективно при рецидиве лимфомы Беркитта, сохраняющем чувствительность к стандартной химиотерапии [11].

### **Лимфомы высокой и промежуточной степени злокачественности**

В исследованиях по применению трансплантационных методик в данной группе в основном (70–80%) включались пациенты с В-ДККЛ, составляющей до 40% от всех НХЛ взрослых [3], и в значительно меньшем объеме — с анапластической, трансформированной фолликулярной лимфомой или периферическими Т-клеточными лимфомами. Перечисленные лимфомы, как правило, высокочувствительны к начальному лечению. Новые стандарты химиотерапии 1-й линии СНОР/СНОЕР 14 (доксорубин, циклофосфамид, винкристин и преднизолон + этопозид) каждые 2 нед [12] или СНОР + ритуксимаб (моноклональные антитела к антигену CD20) каждые 3 нед [13] позволили дополнительно увеличить долговременную бессобытийную и общую выживаемость. Эти показатели в настоящее время составляют 40–60%, что на 10–15% выше, чем после СНОР 21, оставшегося стандартом лечения пос-

ледние 20 лет [14]. Ритуксимаб обладает отличным от цитостатиков иммунологическим механизмом действия (комплементзависимая и антителозависимая цитотоксичность), что позволяет рассматривать его как препарат для контроля остаточной болезни, резистентной к цитостатикам [15].

В то же время до 30–40% пациентов являются первично резистентными либо у них наблюдаются рецидивы. Результаты последующей альтернативной химиотерапии в этих группах значительно хуже. По данным центра M.D. Anderson в США, проводившего в 1980–1990-х гг. многочисленные контролируемые исследования по химиотерапии «спасения» у больных с резистентным и рецидивирующим течением агрессивных НХЛ, долговременная безрецидивная выживаемость составляет около 10% [16]. При проведении таких активных режимов 2-й линии, как IMVP-16, MIME, DNAP, ESNAP, 2-летняя безрецидивная выживаемость не превышает 25% даже у больных с полной ремиссией [17]. Недостаточная эффективность стандартных режимов 2-й линии заставила исследователей искать пути интенсификации цитостатической терапии и, в частности, применять ВХТ с трансплантацией СКК. Первые исследования по ВХТ, проводимые в отдельных центрах в 1980–1990-х гг., свидетельствовали о значительном эффекте этого типа лечения. Было показано, что у больных, сохраняющих чувствительность к цитостатикам, безрецидивная выживаемость при медиане наблюдения 3 года может достигать 50–60% [18]. Исследования были продолжены, и в настоящее время уже накоплен значительный опыт применения ВХТ у пациентов с НХЛ высокой и промежуточной степени злокачественности, включающей использование данной методики как у больных с рецидивами или резистентными формами опухоли, так и у первичных больных.

#### **Использование ВХТ в 1-й линии лечения**

ВХТ в качестве начальной терапии у всех первичных больных использовалось редко, так как эффективность стандартной химиотерапии достаточно высока, и поэтому значительная группа больных получит агрессивное и потенциально токсичное лечение напрасно. В некоторых работах эффективность ВХТ не превышала результатов стандартной химиотерапии [19]. Напротив, выделение среди первичных пациентов подгрупп высокого риска рецидива позволяет определить тех, кому, возможно, показана интенсификация лечения уже на начальном этапе. В 1997 г. были опубликованы данные контролируемого исследования, сравнивающего результаты высокодозного и стандартного лечения у первичных больных ДККЛ [20]. Факторами неблагоприятного прогноза служили массивное (более 10 см) поражение или распространенные (III–IV) стадии заболевания. Схема лечения включала химиотерапию по схеме MASOP В или высокодозную последовательную химиотерапию. Последняя включала на первом этапе назначение доксорубина, преднизолона и винкристина, на втором — циклофосфана  $7 \text{ г/м}^2$ , на третьем — метотрексата  $8 \text{ г/м}^2$  с винкристином, на четвертом — этопозиды  $2 \text{ г/м}^2$  и на пятом — либо облучение с мельфаланом  $140 \text{ мг/м}^2$  либо митоксантрон  $60 \text{ мг/м}^2$  с мельфаланом  $140 \text{ мг/м}^2$  с трансплантацией аутологичных СКК. Результаты работы показали статистически значимое преимущество высокодозного лечения в отношении безрецидивной выживаемости (76% против 49%,  $p=0,01$ ). Общая выживаемость имела тенденцию к улучшению в высокодозной группе (81% против 55%), но различие не достигло статистически значимого ( $p=0,09$ ).

Германская группа по изучению лимфом (DSHNHL) в течение ряда лет проводит исследование по интенсификации химиотерапии у первичных пациентов с НХЛ и высоким риском рецидива — повышенным уровнем лактатдегидрогеназы или IPI более 2 баллов. Больные получают 4 курса СНОЕР в дозировках, в несколько раз превышающих стандартные (мега-СНОЕР), с трансплантацией аутологичных СКК после 2, 3 и 4-го курсов [21]. Предварительные данные свидетельствуют о высокой эффективности данного подхода с достижением 5-летней общей выживаемости 67,2% и выживаемости, свободной от неудач лечения, 62,1%. В 2006 г. были опубликованы предварительные результаты применения этого протокола с ритуксимабом (R — мега-СНОЕР). Ритуксимаб вводился перед каждым курсом химиотерапии и через 3 и 6 нед после окончания лечения, всего 6 введений [22]. При медиане наблюдения 2,5 года отмечены значимое преимущество в выживаемости, свободной от неудач лечения, и тенденции к улучшению общей выживаемости в сравнении с историческим контролем (мега-СНОЕР). В то же время добавление ритуксимаба значительно увеличило частоту тяжелых инфекций (с 7,3 до 20,3%) и сопровождалось большей частотой преждевременного прекращения терапии, что снизило долю больных, которые полностью завершили запланированный курс лечения (71% против 91%).

Проведение одного высокодозного курса для консолидации эффекта после укороченной индукционной начальной терапии (менее 6 циклов СНОР) в двух исследованиях не показало преимущества ВХТ.

#### **Консолидация первой полной ремиссии**

Крупное контролируемое исследование, проведенное во Франции LNH-87, по высокодозной консолидации первой полной ремиссии после окончания полного курса стандартной химиотерапии в группе 464 больных не показало преимущества трансплантации [23]. Общая выживаемость при медиане наблюдения в 5 лет составила 71% для стандартной химиотерапии и 69% для ВХТ. Выживаемость без опухоли (52 и 59% соответственно) также статистически значимо не различалась ( $p=0,46$ ). Последующий ретроспективный анализ подгруппы больных, имеющих высокий риск рецидива (международный прогностический индекс — IPI — 2–3 балла), включивший данные 236 пациентов, выявил значимо более высокую выживаемость без опухоли (39% против 52%,  $p=0,02$ ) и общую выживаемость (49% против 64%,  $p=0,04$ ) в группе ВХТ при медиане наблюдения в 8 лет [24].

#### **Консолидация первой частичной ремиссии**

Отсутствие быстрого полного ответа на химиотерапию 1-й линии рассматривалось в качестве причины для ранней интенсификации лечения во избежание развития резистентности лимфомы. В одном из исследований была выделена подгруппа пациентов ( $n=49$ ) с частичной ремиссией после окончания 2/3 программы лечения MASOP-B. Они получали консолидацию частичной ремиссии либо 4 курсами второй линии DNAP, либо ВХТ с трансплантацией костного мозга. Частота общего ответа в подгруппах была 59 и 96% соответственно ( $p=0,001$ ) при сопоставимой частоте полной регрессии опухоли (15 и 14%). При медиане наблюдения в три года безрецидивная выживаемость составила 52 и 73%, а общая — 59 и 73% (различия недостоверны) [25]. В аналогичном по схеме исследовании L. Verdonck и соавт. [26] пациенты, медлен-

но отвечавшие на применение режима 1-й линии СНОР и разделенные на продолжение СНОР или высокодозное лечение, не различались по характеру течения болезни.

#### **Лечение пациентов с рецидивами лимфомы, сохраняющими чувствительность к химиотерапии**

Явно недостаточная эффективность современных стандартных схем химиотерапии у больных с рецидивами лимфом высокой и промежуточной степени злокачественности склоняла многих исследователей к интенсификации лечения в данной группе. Успех первых исследований стимулировал реализацию контролируемых многоцентровых протоколов. Самым заметным из них стало Европейское исследование PARMA, в которое было включено 215 больных [27]. Пациенты получили 2 курса индукционной химиотерапии 2-й линии ДНАР, и у 109 (58%) из них была достигнута ремиссия. Эти больные были рандомизированы в 2 группы. В первой продолжалось исходное лечение, а во второй ремиссия закреплялась высокодозным курсом ВЕАС (BCNU 0,3 г/м<sup>2</sup>, этопозид 1,5 г/м<sup>2</sup>, цитарабин 0,8 г/м<sup>2</sup> и циклофосфамид 6 г/м<sup>2</sup>) с трансплантацией аутологичных СКК. При медиане наблюдения в 5 лет бессобытийная выживаемость составила 46% в группе ВХТ и 12% в группе стандартной химиотерапии ( $p=0,001$ ). Общая выживаемость в группе ВХТ была также значимо выше, чем при стандартном лечении (53 и 32% соответственно,  $p=0,038$ ). Дополнительный анализ результатов этого исследования еще через 3 года (медиана наблюдения 8 лет) не внес принципиальных изменений в его результаты. И общая, и безрецидивная выживаемость оставались значимо более высокими в группе получивших ВХТ с аутотрансплантацией. Следует отметить, что ретроспективный анализ не показал улучшения результатов лечения при проведении ВХТ в отсутствие факторов отрицательного прогноза при рецидиве (группа IPI 0). Общая выживаемость в подгруппах больных с показателем IPI 0, 1, 2 и 3, получивших стандартную химиотерапию, составила 48, 21, 33 и 0%, а получивших ВХТ — 51, 47, 50 и 50% соответственно ( $p=0,006$ ).

#### **Лечение пациентов с первично резистентными лимфомами и резистентными рецидивами**

Применение ВХТ у первично резистентных пациентов с лимфомами использовалось также достаточно широко, что объясняется отсутствием реально эффективных методов лечения в данной группе. Большинство полученных результатов были неудовлетворительными. Отдельные наблюдения длительного эффекта ВХТ чаще рожают вопросы относительно использованных критериев резистентности. Тем не менее, по данным регистра ЕВМТР, долговременная безрецидивная выживаемость может быть достигнута у 30% первичных больных, не ответивших на химиотерапию 1-й линии [28]. ВХТ несколько улучшает непосредственные результаты лечения рецидивов агрессивных лимфом, резистентных к стандартной химиотерапии, однако долговременная выживаемость не превышает 10–15% [29].

Попытки использовать ВХТ с трансплантацией аллогенных СКК в подгруппе резистентных больных были также малоуспешны. В небольшом исследовании 14 больных (13 с В-ДККЛ), резистентных к стандартной химиотерапии или имеющих множественные рецидивы, получили курсы ВХТ с трансплантацией СКК от совместимых родственных доноров. Ранняя летальность дос-

тигла 50%, а 2-летняя общая выживаемость и выживаемость без опухоли составили 21 и 0% соответственно [8].

#### **Другие лимфомы (первичная медиастинальная, анапластическая, Т/НК клеточная назальная, периферические Т-клеточные)**

Первичная медиастинальная (тимическая) лимфома, выделенная из общей группы ДККЛ, имеет более благоприятный прогноз в сравнении с другими лимфомами этой группы. Результаты ретроспективных анализов свидетельствуют о том, что проведение ВХТ в группе больных тимической лимфомой с резистентным или рецидивирующим течением сопровождается долговременной выживаемостью без опухоли более 50%, что на 15–20% выше, чем в аналогичной группе больных с ДККЛ [30]. Также благоприятны и результаты ВХТ с аутотрансплантацией в подгруппе больных с анапластическими лимфомами [31].

Напротив, периферические Т-клеточные лимфопролиферации протекают преимущественно хуже, и результаты ВХТ, по некоторым данным, ниже, чем в аналогичной группе пациентов с ДККЛ. Применение высокодозного лечения у больных с кожной Т-клеточной лимфомой (синдром Сезари), несмотря на высокую частоту ремиссий, быстро сопровождается рецидивом [32].

#### **Сравнение результатов ВХТ с трансплантацией аллогенных и аутологичных СКК у больных лимфомами высокой и промежуточной степени злокачественности**

Аллотрансплантация при лечении лимфом имеет потенциальные преимущества перед аутологичной за счет отсутствия риска реинфузии опухолевых клеток, которые могут попасть в трансплантационный материал, а также за счет иммунологической РТПЛ. Наличие и выраженность этой реакции при лимфомах высокой степени злокачественности — вопрос дискуссионный. С одной стороны, частота рецидивов после аллотрансплантации, как правило, ниже. Также имеются многочисленные наблюдения регрессии лимфомы после отмены иммуносупрессии или трансфузии донорских лимфоцитов. С другой стороны, низкая частота рецидивов, особенно через 1,5–2 года после трансплантации, может хотя бы отчасти объясняться отсутствием риска попадания опухолевых клеток с трансплантатом. Ретроспективный анализ суммарных результатов аллогенной, аутологичной и сингенной (от однойяцевой близнеца) трансплантаций при злокачественных лимфомах не выявил статистически значимого различия в частоте рецидивов между аллогенными и сингенными (когда РТПЛ отсутствует, но нет опухолевых клеток) видами трансплантации [33]. Также было выявлено некоторое снижение частоты рецидивов в случае использования аутотрансплантации с очисткой трансплантата от элементов опухоли.

Несколько ретроспективных исследований было проведено с целью сравнить клинические результаты этих двух подходов у больных с лимфомами высокой и промежуточной степени злокачественности. В исследовании Европейской группы по трансплантации костного мозга (ЕВМТ) вероятность рецидива после аутотрансплантации была значимо выше, чем после аллотрансплантации ( $p=0,006$ ). Тем не менее общая выживаемость была выше в группе аутотрансплантаций ( $p=0,0173$ ) [10]. Практически во всех исследованиях некоторое снижение риска рецидива не сопровождалось увеличением показателей выживаемости в связи с высокой токсической смертностью.

Попытки использовать режимы химиотерапии меньшей интенсивности перед аллотрансплантацией стали интенсивно изучаться в последние годы. Продолжается накопление материала, однако первые результаты применения этой методики свидетельствуют о сохранении токсичности вследствие иммунологического конфликта (реакция «трансплантат против хозяина») [34].

#### **Использование методик очистки костного мозга при аутотрансплантации у пациентов с лимфомами**

Как уже отмечалось, получение аутологичных СКК может сопровождаться попаданием опухоли в трансплантат и возвращением их пациенту при реинфузии. Генетическая маркировка показывает возможность развития рецидива из перелитых при трансплантации опухолевых клеток [35]. Некоторые авторы, исследовавшие костный мозг после его взятия (экспузии), показали значительно больший риск рецидива в случае обнаружения клеток лимфомы (57%), чем в случае их отсутствия (17%) [36]. Исследователи этой же группы в последующих работах не выявили подобного влияния клеток лимфомы, обнаруживаемых в продукте афереза, при выделении СКК из периферической крови [37]. Попытки воздействия на клетки лимфомы *in vitro* с помощью цитостатиков или моноклональных антител, добавляемых в выделенный костный мозг или продукт афереза, дали разноречивые результаты. В одной из публикаций J.G. Gribben и соавт. [38] описывают 114 больных с лимфомами, имевших ПЦР-признаки наличия злокачественных клеток в трансплантационном материале. Добавление моноклональных антител против антигенов лимфомы и комплимента *in vitro* привело к исчезновению определяемой опухоли в половине случаев (57 больных). Последующая трансплантация оказалась более успешной у пациентов с «чистыми» кровяными клетками. Частота рецидивов в этом случае составила лишь 5% в сравнении с 39% после трансплантации материала, содержащего клетки лимфомы. С другой стороны, в нескольких исследованиях подтвердить положительное влияние очистки *in vitro* не удалось [39].

#### **Заключение Американского общества трансплантации крови и костного мозга (ASBMT) о роли и месте ВХТ с трансплантацией СКК у больных с ДКЛ [40]**

**ВХТ с трансплантацией СКК является более эффективным методом лечения, чем стандартная химиотерапия, и рекомендована:**

- при первом рецидиве заболевания, чувствительном к стандартной химиотерапии;
- для консолидации первой полной ремиссии у пациентов с высоким/промежуточным и высоким риском (IPI 2–3 балла);
- как высокодозная последовательная химиотерапия при начальном лечении у пациентов с высоким/промежуточным и высоким риском (IPI 2–3 балла).

**ВХТ с трансплантацией СКК не является более эффективным методом лечения, чем стандартная химиотерапия, и не может быть рекомендована:**

- при консолидации первой полной ремиссии у больных с низким/промежуточным и низким риском (IPI 0–1 балл);
- как закрепляющее лечение после укороченных курсов химиотерапии 1-й линии – менее 6 циклов СНОР, менее 12 циклов MACOP-B или VACOP-V.

**Недостаточно данных для четких рекомендаций при использовании ВХТ с трансплантацией СКК:**

- при первом рецидиве, резистентном к реиндукционной стандартной химиотерапии, или первичной резистентности;
- первой частичной ремиссии после полного окончания терапии 1-й линии;
- высокодозной последовательной терапии в качестве 1-й линии лечения у больных с низким/промежуточным и низким риском (IPI 0–1 балл).

**Трансплантация аутологичных СКК является стандартным подходом и имеет преимущество над аллогенной.**

**Аутологичные СКК из периферической крови имеют преимущество над СКК из костного мозга.**

**В настоящее время нет возможности определить эффективность этих подходов, и они должны являться предметом дальнейшего изучения:**

- двойные/комбинированные ауто-/аллотрансплантации;
- аллотрансплантации после сверхвысокодозных (миелоаблативных) режимов химио/радиотерапии;
- аллотрансплантации после неинтенсивных (немиелоаблативных) режимов химио/радиотерапии – мини-трансплантации;
- очистка трансплантата от опухолевых клеток;
- режимы мобилизации СКК;
- режимы высокодозной химиотерапии – химио/радиотерапии.

Вышеперечисленные рекомендации были опубликованы в 2003 г., но в основном основывались на результатах исследований, проведенных до 2000 г. В то же время за последние 5 лет в лечении лимфом произошли значительные изменения. Во-первых, режим химиотерапии СНОР перестал быть стандартом первой линии лечения у большинства больных с лимфомами высокой и промежуточной степени злокачественности. Во-вторых, с появлением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) значительно возросла точность стадирования и оценки эффекта, особенно в случае частичной ремиссии и сохранения остаточной опухоли. В-третьих, достигнуты успехи в изучении профиля экспрессии генов при различных вариантах НХЛ, что позволило выявить новые факторы прогноза, не учитываемые IPI.

Использование ПЭТ-сканирования позволяет выявить больных с высоким риском рецидива лимфомы. В работе К. Спраерн и соавт. [41] был проведен анализ течения заболевания у 96 больных с лимфомами высокой и промежуточной степени злокачественности в зависимости от результатов ПЭТ по окончании лечения. Среди 67 больных с негативным результатом 80% длительное время находились в ремиссии, а у 20% наблюдался рецидив, и медиана времени до его развития составляла около 2 лет. Среди 29 больных с позитивным результатом ПЭТ-сканирования рецидив наблюдался в 100% случаев при медиане около 4 мес. В некоторых исследованиях показана еще большая прогностическая значимость этого исследования, если оно проводилось на раннем этапе – после 1-го или 2-го курса химиотерапии [42]. В то же время сейчас нет данных о том, что ранняя интенсификация химиотерапии в этих случаях может улучшить общий прогноз. Проведение подобных исследований – вопрос будущего.

Одним из факторов, определяющих целесообразность проведения ВХТ в группе больных с лимфомами, является уровень риска по IPI. В то же время исследова-

ние активности генов с использованием микрочипов позволяет в общей группе В-ДККЛ выделить подгруппы лимфом из клеток герминального центра и негерминального центра [43]. По некоторым данным, большие с лимфомами из клеток, прошедших герминальный центр (активированных лимфоцитов), имеют значимо более низкую общую и безрецидивную выживаемость независимо от величины IPI [44]. В одном из исследований были проанализированы результаты ВХТ у 86 больных с рецидивами ДККЛ в зависимости от результатов генетического исследования образцов лимфомы, полученных при рецидиве опухоли [45]. Авторами не было выявлено различий в показателях выживаемости между лимфомами из герминального и не из герминального центра. Продолжаются дополнительные исследования в этом направлении.

В настоящее время в большинстве стран в качестве 1-й линии химиотерапии лимфом высокой и промежуточной степени злокачественности используется режим с ритуксимабом (R-СНОР) или режим СНОР/СНОЕР14 с укорочением интервалов между курсами до 2 нед. В то же время значительная часть контролируемых исследований по трансплантации проводилась на материале больных, получивших в 1-й линии лечения менее интенсивную химиотерапию. Не вполне понятно, насколько рецидивы после более интенсивного лечения окажутся столь же чувствительными к ВХТ. В одной из публикаций были проанализированы результаты лечения 113 больных с рецидивами после R-СНОР и СНОР21, получивших ВХТ [46]. И общая и безрецидивная выживаемость в этих группах не различалась, однако требуется дополнительный анализ для окончательных выводов.

#### **Применение моноклональных антител на различных этапах ВХТ с трансплантацией СКК**

Разработка гуманизированных (содержащих человеческие константные цепи) моноклональных антител к таким антигенам, как CD20 (ритуксимаб) и CD52 (алемтузумаб), позволяет вводить их больному без риска аллоиммунизации в процессе получения СКК, снижая риск контаминации трансплантационного материала. Подобные подходы получили название очистки *in vivo*, т.е. в самом организме. Наиболее исследованным и применяемым из этой группы препаратов является ритуксимаб. Его использование не увеличивает гематологическую токсичность, не сокращает количества полученных стволовых клеток и может приводить к эрадикации минимальной остаточной болезни. В нескольких работах было показано, что использование анти-CD20 (ритуксимаб) в процессе сбора СКК сопровождается значительным (с 60 до 7%) снижением частоты попадания клеток лимфомы в продукт афереза [47]. В последние годы было проведено несколько исследований по ВХТ у больных с рецидивами или резистентными формами В-ДККЛ, в которых на различных этапах лечения использовался ритуксимаб.

**ВХТ с ритуксимабом.** Ритуксимаб теоретически может применяться на всех этапах ВХТ, совместно с реиндукционной химиотерапией 2-й линии, в процессе сбора СКК, перед введением цитостатиков в высокой дозе и в посттрансплантационном периоде. Каждый из этих подходов имеет определенные обоснования.

Результаты применения трансплантационных методик у пациентов с рецидивами агрессивных лимфом показали, что долговременная выживаемость зависит от воз-

можности достижения полной ремиссии перед ВХТ [48, 49]. Это свидетельствует о том, что отсутствие видимых проявлений опухоли дает шанс полной ее эрадикации после интенсификации лечения. В некоторых исследованиях долговременная выживаемость пациентов с размерами остаточных очагов менее 2 см перед ВХТ была значительно выше (48% против 25%,  $p=0,04$ ), чем в случае остаточных очагов большего размера. Другими словами, у пациентов с ремиссией эффективность ВХТ зависит от объема остаточной опухоли, и, увеличивая эффективность химиотерапии 2-й линии, можно рассчитывать на увеличение эффективности последующей ВХТ. Режимы химиотерапии 2-й линии для лечения рецидивов и резистентных форм агрессивных лимфом различаются по своей интенсивности. Использование более интенсивных режимов (mini-VEAM, dexaBEAM) дает возможность несколько увеличивать количество полных ремиссий в сравнении с менее интенсивными (DHAP, ESHAP, ICE), но при более выраженной миелотоксичности. В то же время выраженная миелотоксичность препятствует получению достаточного количества СКК для поддержки кроветворения после дальнейшей высокодозной закрепляющей ВХТ. Применение моноклональных антител в комбинации с цитостатиками не усиливает миелодепрессию и позволяет добиться большего противоопухолевого эффекта.

Недавно опубликованы результаты использования комбинации ICE (ифосфамид, карбоплатин и этопозид) с ритуксимабом (R-ICE) у больных с первичной резистентностью или рецидивами агрессивных В-клеточных лимфом [50]. Результаты терапии сравнивались с историческим контролем у данных пациентов, получавших аналогичное лечение без ритуксимаба. Частота достигнутых полных ремиссий была значительно выше в группе R-ICE – 53% против 27% в группе исторического контроля. У части больных было проведено высокодозное закрепляющее лечение. Выживаемость без прогрессирования в течение 2 лет у больных, получавших ритуксимаб, при этом была несколько выше (54% против 43%), чем у пациентов, получивших лечение по аналогичной схеме без ритуксимаба.

В нескольких работах изучалась эффективность ритуксимаба у больных с ДККЛ после окончания ВХТ. В исследовании S.M. Horwitz и соавт. [51] 25 больным, большинство (80%) из которых получили ВХТ в связи с рецидивами или первичной резистентностью, было осуществлено 4 введения ритуксимаба с недельным интервалом начиная с 42-го дня после трансплантации. Общая (88%) и безрецидивная (83%) 2-летняя выживаемость, по мнению авторов, превышает аналогичные показатели исторического контроля – 62 и 58% соответственно.

Назначение ритуксимаба некоторыми авторами проводилось как до ВХТ (в процессе сбора СКК), так и непосредственно перед введением цитостатиков в высоких дозах. Во всех этих исследованиях была подтверждена безопасность назначения ритуксимаба [52]. В одном из протоколов M.D. Anderson ритуксимаб вводился на четырех этапах, включая реиндукционную химиотерапию, сбор СКК, ВХТ и ранний посттрансплантационный период [53]. Результаты применения этой схемы у 67 пациентов (41 с ДККЛ и 26 с фолликулярной лимфомой III цитологического типа или трансформированной) сравнивались с историческим контролем. При медиане наблюдения в 20 мес расчетная 2-летняя общая выжива-

емость составила 80% для группы ритуксимаба и 53% для группы контроля ( $p=0,002$ ). Выживаемость без опухоли составила 67 и 43% соответственно ( $p=0,004$ ).

В нашем отделении высокодозное лечение получили 50 больных с рецидивами и первично-резистентным течением НХЛ. В-клеточный фенотип опухоли имели 33 пациента (2 — фолликулярная лимфома, 1 — мантийно-клеточная, 26 — диффузная крупноклеточная и 3 — лимфома Беркитта). У 17 пациентов отмечался Т(0)-клеточный фенотип лимфомы (7 — Т-клеточная неспецифицированная, 6 — анапластическая и 4 — лимфобластная). Первично-резистентное течение заболевания было у 78% больных, ранний рецидив — у 22%. На момент включения в исследование IV стадия была у 76% больных, симптомы интоксикации — у 40%. До проведения ВХТ пациенты получили в среднем 2 линии химиотерапии (от 1 до 5), не считая курсов индукции ремиссии, причем у 70% из них весь период предшествующего лечения отмечалась стабилизация или прогрессирование заболевания. Проведение ВХТ позволило добиться полной ремиссии у 64% больных, частичной — у 14%.

К моменту анализа медиана наблюдения за больными составила 23 мес (от 1 до 97 мес), 5-летняя общая выживаемость всех пациентов, получивших высокодозное лечение, — 40,3%, безрецидивная — 77,5%. 22 пациента получали ритуксимаб на этапах индукционной химиотерапии, перед сбором аутологичных СКК и ВХТ, а также в посттрансплантационном периоде [54]. 11 больных с В-клеточными лимфомами ритуксимаб не получали. В группе больных, не получавших ритуксимаб, 5-летняя общая выживаемость составила 21%, а в группе получавших — 52% ( $p=0,037$ ). Различия в выживаемости сохранилось и после исключения из анализа больных с индолентными лимфомами ( $p=0,014$ ). Токсичность лечения была сопоставимой в обеих группах.

В то же время количество работ, проводимых по подобной методике у больных с В-ДККЛ, пока ограничено, и требуется проведение проспективных сравнительных исследований как для доказательства ее эффективности, так и для определения наиболее рациональной схемы назначения ритуксимаба.

#### **Индолентные лимфомы (лимфомы низкой степени злокачественности)**

Больные с индолентными лимфомами на первом этапе могут не получать лечения, и такая тактика («наблюдать и ждать»), по некоторым данным, не сокращает продолжительности жизни. Она в первую очередь применяется при медленно прогрессирующих фолликулярных лимфомах, лимфоме из малых лимфоцитов/ХЛЛ и других. При появлении симптомов поражения внутренних органов или быстром прогрессировании проводится облучение, моно- или полихимиотерапия, применяются моноклональные антитела, в том числе совместно с цитостатиками, или проводится интенсивная химиотерапия с ауто- или аллотрансплантацией СКК.

При фолликулярной лимфоме, составляющей около 20% всех НХЛ [3], до последнего времени ни один из этих вариантов не имел преимуществ в общей выживаемости в сравнении с другими. Опубликованные недавно результаты исследования по использованию ритуксимаба в комбинации с различными режимами химиотерапии (R-CHOP R-CVP, R-FND) дают реальную надежду на изменение ситуации. В исследовании R. Marcus и соавт. [55]

добавление ритуксимаба к режиму химиотерапии CVP (COP) сопровождалось значительным (с 10 до 41%) увеличением частоты полных ремиссий ( $p=0,0001$ ), а также удлинением медианы времени до прогрессирования с 15 до 32 мес. Общая выживаемость на период наблюдения в 2,5 года существенно не различалась, что, возможно, связано с недостаточной продолжительностью наблюдений.

Менее агрессивные подходы обладают меньшей эффективностью, но также меньшей токсичностью и затратностью. Их идеология базируется на двух положениях. Первое положение заключается в отсутствии шанса на полную эрадикацию опухоли на этапе распространенной болезни. Второе основано на том факте, что больные могут длительное время (годы и даже десятилетия) существовать с лимфомой без принципиального снижения качества жизни. «Неизлечимость» диссеминированных индолентных лимфом во многом определяется механизмом их патогенеза. В частности, 95% больных с фолликулярными лимфомами имеют транслокацию t(14,18). Эта транслокация приводит к увеличению экспрессии гена *Bcl-2*, продукт которого — белок BCL-2 — оказывает антиапоптотическое действие, определяющее устойчивость к цитостатикам. Поэтому, несмотря на возможность достижения длительной ремиссии, в подавляющем большинстве случаев сохраняется минимальная остаточная опухоль, дающая начало рецидивам. В нескольких исследованиях проводилась попытка преодолеть лекарственную резистентность у больных с фолликулярной лимфомой путем эскалации доз цитостатиков.

#### **ВХТ с аутотрансплантацией у больных с фолликулярными лимфомами**

**Использование ВХТ для консолидации первой полной или частичной ремиссии.** ВХТ с аутотрансплантацией применялась для консолидации первой полной или частичной ремиссии у больных с распространенными фолликулярными лимфомами в нескольких исследованиях. В одном из них больные, получившие индукционную химиотерапию СНОР или МСР (митоксантрон, лейкеран и преднизолон), в случае достижения эффекта (240 пациентов) рандомизированно разделялись на проведение ВХТ (ТТО с циклофосфамидом) или поддерживающее лечение интерфероном- $\alpha$  [56]. При медиане наблюдения в 5 лет выживаемость без прогрессирования составила в группе ВХТ 64,7% против 33,3% в группе интерферона ( $p=0,0001$ ). Общая выживаемость в группах практически не различалась, и авторы отметили большую частоту вторичных неоплазий в группе ВХТ (5 случаев против 1,  $p=0,036$ ).

Еще одно исследование, проведенное по сходной схеме, включило результаты наблюдения 172 пациентов с вновь выявленной фолликулярной лимфомой II–IV стадии и наличием факторов неблагоприятного прогноза (большие размеры опухоли, высокий уровень лактатдегидрогеназы) [57]. Больные были разделены на 2 группы. В 1-й из них проводилась стандартная химиотерапия в течение 1,5 года с последующим назначением интерферона- $\alpha$ . Пациенты 2-й группы получали несколько курсов химиотерапии 1-й и 2-й линии. Получаемые аутологичные СКК подвергались очистке *in vitro* с комбинацией моноклональных антител. На втором этапе больные получали высокодозную консолидацию ремиссии (ТТО с циклофосфамидом) с трансплантацией очищенных СКК. Расчетная 5-летняя

бессобытийная выживаемость составила  $82 \pm 7\%$  для ВХТ против  $51 \pm 5\%$  для стандартной химиотерапии ( $p=0,05$ ). Общая выживаемость значимо не различалась. В этом исследовании также отмечена высокая частота вторичных опухолей, послуживших причиной гибели больных в группе ВХТ (7 случаев против 0). Отсутствие различий в общей выживаемости в этих исследованиях, возможно, объясняется недостаточной длительностью наблюдения и может выявиться позднее. В то же время обращает на себя внимание значительное количество вторичных опухолей в группе ВХТ, возможно, связанное с применением ТТО, которое может повлиять на долговременный прогноз.

**Использование ВХТ при рецидивах фолликулярных лимфом.** У больных с рецидивами фолликулярных лимфом или с резистентностью к начальному лечению сохраняется практически столь же широкий выбор вариантов терапии, что и у первичных больных, за исключением, возможно, варианта «наблюдать и ждать». При позднем (более 1 года) небольшом по объему рецидиве можно применять радиотерапию, провести монокимиотерапию (хлорамбуцил, циклофосфан) или полихимиотерапию с включением ритуксимаба, а также использовать ВХТ с трансплантацией аутологичных или аллогенных СКК. Использование ВХТ для лечения рецидивов и резистентных форм индолентных лимфом до последнего времени было одним из приемлемых, но редко используемых вариантов лечения. С одной стороны, ВХТ позволяла достичь наибольшего числа полных ремиссий, в том числе у больных, резистентных к стандартной химиотерапии [58]. С другой стороны, этот метод не приводил к излечению (отсутствие плато на кривой безрецидивной выживаемости), был более дорогостоящим и токсичным. Опубликованные недавно результаты нескольких исследований свидетельствуют о преимуществе ВХТ с аутотрансплантацией СКК над стандартными методами лечения при рецидивах фолликулярных лимфом. В ретроспективном анализе французских авторов среди 372 пациентов с рецидивами или резистентными формами фолликулярных лимфом, которым проводилась стандартная химиотерапия (289 больных) или ВХТ (83 больных), отмечено преимущество последней. В течение 5 лет наблюдения безрецидивная выживаемость составила 42% для больных, получивших ВХТ, против 16% для получивших стандартную ( $p=0,0001$ ). Общая выживаемость также была значимо выше в группе интенсивного лечения — 58% против 38% ( $p=0,0005$ ).

Проспективное рандомизированное контролируемое исследование было проведено для выявления возможного улучшения общей выживаемости при использовании ВХТ у пациентов с рецидивами фолликулярных лимфом [39]. У 140 пациентов было проведено повторное лечение, включавшее несколько курсов химиотерапии СНОР. При достижении повторной полной или частичной ремиссии (89 пациентов) проводилось разделение на 3 схемы дальнейшего лечения. Пациенты 1-й группы получали 3 дополнительных курса химиотерапии СНОР, пациенты 2-й группы — курс ВХТ (ТТО с циклофосфамидом) с аутотрансплантацией очищенных *in vitro* СКК, 3-й — ВХТ с неочищенным аутотрансплантатом. Выживаемость без прогрессирования в течение 2 лет составила 26, 55 и 58%, а общая выживаемость при 4-летнем наблюдении — 46, 71 и 77% соответственно ( $p=0,0037$ ). Результаты исследования показали значимое преимущество ВХТ, но не выявили преимущества очистки СКК.

Проведение ВХТ с аутотрансплантацией СКК больным с фолликулярными лимфомами, несмотря на значимо более высокую безрецидивную и даже общую выживаемость, также сопровождается значительным числом возвратов заболевания, и кривая выживаемости не выходит на плато даже через 10 лет. Проведение аллогенной (донорской) трансплантации, когда к противоопухолевому цитостатическому воздействию добавляется противоопухолевое иммунологическое воздействие (РТПЛ), позволяет у 30–40% больных достичь длительной безрецидивной выживаемости [59]. Иммунная система донора способна эффективно разрушать опухолевые клетки, в том числе химиорезистентные. В то же время этот подход является высокотоксичным, затратным и не применим у большинства больных (отсутствие совместимого донора, пожилой возраст).

В развитии альтернативных донорской трансплантации куративных подходов за последние годы достигнут значительный прогресс, связанный с использованием моноклональных антител, в частности ритуксимаба, способных разрушать клетки, резистентные к цитостатикам. Определение гиперэкспрессии *Bcl-2* в лимфоидных клетках методом ПЦР (суррогатный маркер минимальной остаточной болезни) показало полное исчезновение этого признака в лимфоидных клетках через 1 год после терапии ритуксимабом из костного мозга у 50% и из периферической крови у 80% пациентов с фолликулярной лимфомой. У больных с молекулярной ремиссией (отсутствие гиперэкспрессии *Bcl-2*) длительность эффекта была практически в 2 раза больше, чем у больных в ремиссии, но сохраняющих гиперэкспрессию *Bcl-2* хотя бы в части лимфоидных клеток.

Использование ритуксимаба в режимах ВХТ теоретически может улучшить результаты лечения. Начальные исследования свидетельствуют о высокой эффективности такого подхода при индолентных лимфомах. Использование ритуксимаба с ВХТ в небольшом сравнительном исследовании у 49 пациентов с рецидивирующим/резистентным течением фолликулярной лимфомы оказалось эффективным и безопасным [60]. В этом исследовании больные помимо ВХТ получали либо интерферон как поддержку после трансплантации, либо ритуксимаб до и после ВХТ, либо ритуксимаб до и ритуксимаб с интерфероном после химиотерапии. Частота полных ремиссий через 3 мес после трансплантации составила 23, 90 и 70% соответственно. 10 из 12 больных в группе ритуксимаба продолжали сохранять молекулярную ремиссию в течение 2–3 лет. Еще одно аналогичное исследование, проведенное на материале больных с фолликулярной и крупноклеточной лимфомой, также показало высокую эффективность сочетания ритуксимаба с ВХТ [61].

Сравнительное исследование М. Magni и соавт. [47] ставило задачу определить роль ритуксимаба в комбинации с ВХТ у больных с индолентными (в основном фолликулярными) лимфомами. Половина из 25 пациентов получали последовательную ВХТ циклофосфаном, цитарабином и затем мельфаланом и митоксантроном с трансплантацией аутологичных СКК. Вторая половина получала ритуксимаб вместе с цитостатиками и на заключительном этапе — дополнительно 2 введения ритуксимаба в посттрансплантационном периоде. Клинически подтвержденная полная ремиссия и молекулярная ремиссия достигнуты у 100% больных, получавших ритуксимаб, и у 70% больных, его не получавших.

Многочисленные исследования второй фазы стимулировали проведение крупного контролируемого многоцентрового исследования по выявлению роли ритуксимаба в комбинации с ВХТ у больных с чувствительными рецидивами фолликулярных лимфом. Схема его предполагает проведение химиотерапии СНОР и после достижения ремиссии — назначение ритуксимаба или плацебо с последующим проведением ВХТ (BEAM). После трансплантации проводится повторная рандомизация с назначением соответственно ритуксимаба или плацебо в качестве поддерживающей терапии. В настоящее время в это исследование уже включено более 300 больных и их набор продолжается.

#### Мантийно-клеточные лимфомы

Мантийно-клеточные лимфомы составляют около 5–7% от общего числа НХЛ [3]. В значительном проценте случаев они протекают агрессивно, и медиана общей выживаемости составляет 3–4 года. Как правило, больные имеют распространенные стадии заболевания уже на момент диагноза, и терапия изначально является паллиативной со средней длительностью ремиссии 1–2 года. В 1-й линии лечения применяют химиотерапию, и наибольшего непосредственного эффекта удается достичь при использовании режимов, включающих высокие дозы цитарабина (комбинация СНОР/DHAP) или дозоинтенсивные схемы (гипер-CVAD) [62]. Добавление ритуксимаба к режимам 1-й линии (R-СНОР) сопровождалось значительным увеличением частоты полного и частичного ответа, а также удлинением периода до прогрессирования [63]. В то же время общая выживаемость больных существенно не изменилась в сравнении с таковой после химиотерапии СНОР. Попытки консолидации ремиссии ВХТ с аутоотрансплантацией были успешными. В одном из контролируемых исследований выживаемость без прогрессирования (39 мес против 17 мес) была значимо выше в группе больных с мантийно-клеточной лимфомой, получивших высокодозную консолидацию ремиссии (ТТО с циклофосфамидом), в сравнении с больными, получавшими поддерживающую терапию интерфероном [64]. Общая выживаемость на 5 лет наблюдения также имела тенденцию к более высоким показателям в группе интенсивного лечения (70% против 50%).

В аналогичном по схеме терапии исследовании А.М. Gianni и соавт. [65] в группе из 28 пациентов с ма-

нитийно-клеточными лимфомами полная ремиссия была достигнута у 27 (96%) и молекулярная — у 100% (из 20 обследованных) больных. Безрецидивная выживаемость в группе получивших ВХТ с ритуксимабом при 3-летнем наблюдении была значительно выше, чем у больных исторического контроля, получавших стандартную химиотерапию типа СНОР (80 и 20% соответственно).

#### Лимфоплазмочитарная лимфома/болезнь Вальденстрема

Несколько небольших серий наблюдений свидетельствуют о высокой эффективности ВХТ с аутоотрансплантацией у пациентов с лимфоплазмочитарной лимфомой. Малое число включенных пациентов связано с относительной редкостью данного варианта лимфом, составляющего около 1% от общего их числа [3]. Большинство авторов описывают возможность достижения длительной ремиссии, в том числе у больных, получавших множественные курсы химиотерапии и резистентных к проводимому лечению. В то же время принципиальная невозможность излечения повышает интерес к аллотрансплантации в данной группе. Сравнение эффективности ауто- и аллотрансплантаций [66] у больных с резистентными вариантами индолентных, в том числе лимфоплазмочитарных лимфом, показывает значимое преимущество в 2-летней выживаемости без прогрессирования (68% против 22%,  $p=0,049$ ) в группе получивших трансплантацию донорских СКК. Использование менее токсичных, немиелоаблативных режимов химиотерапии повышает интерес к использованию этой методики у больных с лимфоплазмочитарной лимфомой.

#### Заключение

Определенные успехи ВХТ сделали данный вид терапии средством выбора у больных с рецидивами НХЛ высокой степени злокачественности, сохраняющих чувствительность к стандартным дозам цитостатиков или при лечении первично неблагоприятных форм заболевания. В то же время остальные показания (первичная резистентность, множественные рецидивы) продолжают обсуждаться. Нет окончательной ясности относительно наилучшей схемы ВХТ. Продолжается накопление материала по использованию аллотрансплантации после режимов химиотерапии сниженной интенсивности или аутоотрансплантации в комбинации с моноклональными антителами, в том числе у пациентов с индолентными лимфомами.

## Л и т е р а т у р а

1. Frei E. III, Canellos G.P. Dose, a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1986;69:585.
2. Gorin N.C., Gale R.P., Armitage J.O. Autologous bone marrow transplant, different indication in Europe and North America. *Lancet* 1989;2:312–8.
3. [No authors listed]. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997;89(11):3909–18.
4. Thomas D.A., O'Brien S., Cortes J. et al. Outcome with the hyper-CVAD regimens in lymphoblastic lymphoma. *Blood* 2004;104(6):1624–30.
5. Hoelzer D., Gokbuget N., Digel W. et al. Outcome of adult patients with T-lymphoblastic lymphoma treated according to protocols for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(12):4379–85.
6. van Imhoff G.W., van der Holt B., MacKenzie M.A. et al. Short intensive sequential therapy followed by autologous stem cell transplantation in adult Burkitt, Burkitt-like and lymphoblastic lymphoma. *Leukemia* 2005;19(6):945–52.
7. Bouabdallah R., Xerri L., Bardou V.J. et al. Role of induction chemotherapy and bone marrow transplantation in adult lymphoblastic lymphoma, a report on 62 patients from a single center. *Ann Oncol* 1998;9(6):619–25.
8. van Besien K.W., Mehra R.C., Giralt S.A. et al. Allogeneic bone marrow transplantation for poor-prognosis lymphoma: response, toxicity and survival depend on disease histology. *Am J Med.* 1996; 100(3):299–307.
9. Levine J.E., Harris R.E., Loberiza F.R. et al. A comparison of allogeneic and autologous bone marrow transplantation for lymphoblastic lymphoma. *Blood* 2003;101(7):2476–82.
10. Peniket A.J., Ruiz de Elvira M.C., Taghipour G. et al. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for lymphoma: allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but a higher procedure-related

- mortality rate than autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(8):667–78.
11. Ladenstein R., Pearce R., Hartmann O. et al. High-dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue in children with poor-risk burkitt's lymphoma: a report from the European Lymphoma Bone Marrow Transplantation Registry. *Blood* 1997;90(8):2921–30.
  12. Pfreundschuh M., Trumper L., Kloess M. et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas, results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004;104(3):634–41.
  13. Feugier P., van Hoof A., Sebban C. et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma, a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4117–26.
  14. Fisher R.I., Gaynor E.R., Dahlberg S. et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;328(14):1002–6.
  15. Maloney D.G. et al. The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody (mAb) therapy includes direct antiproliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. *Blood* 1996;88 (Suppl 1): 637a (abstr 2535).
  16. Cabanillas F., Hagemester F.B., Bodey J.P., Freireich E.J. IMVP-16: an effective regimen for patients with lymphoma who have relapsed after initial combination chemotherapy. *Blood* 1982;60(3):693–7.
  17. Velasquez E., Hagemester F., McLaughlin P. E-SHAP, an effective treatment for refractory and relapsing lymphoma. A long follow up. *J Clin Oncol* 1992;11:abstr 326.
  18. Gulati S.C., Shank B., Black P. et al. Autologous bone marrow transplantation for patients with poor prognostic lymphoma. *J Clin Oncol* 1988;6(8):1303–13.
  19. Tura S., Mazza P., Cherlizoni F. et al. High-dose chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation (ABMT) in previously untreated non-Hodgkin's lymphoma. *Scand J Haematol* 1986;37(4):347–52.
  20. Gianni A.M., Bregni M., Siena S. et al. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997;336(18):1290–7.
  21. Schmitz N., Kloess M., Reiser M. et al. Four versus six courses of a dose-escalated cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) regimen plus etoposide (megaCHOEP) and autologous stem cell transplantation: early dose intensity is crucial in treating younger patients with poor prognosis aggressive lymphoma. *Cancer* 2006;106(1):136–45.
  22. Glass B., Kloess M., Reiser M. et al. Repetitive high dose therapy followed by autologous stem cell transplantation (Mega CHOEP) for primary treatment of aggressive NHL: the impact of rituximab on outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant* 2006;37 (Suppl 1):S26 (abstr 236).
  23. Haïoun C., Lepage E., Gisselbrecht C. et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation with sequential chemotherapy for intermediate-grade and high-grade non-Hodgkin's lymphoma in first complete remission: a study of 464 patients. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1994;12(12):2543–451.
  24. Haïoun C., Lepage E., Gisselbrecht C. et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 Protocol – a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol* 2000;18(16):3025–30.
  25. Gherlinzoni F., Martelli M., Tura S. Early autologous stem cell transplantation (ASCT) versus conventional first line chemotherapy in high-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL): an Italian multicenter randomized trial. *Blood* 2000;96(11):481a.
  26. Verdonck L.F., van Putten W.L.J., Hagenbeek A. et al. Comparison of CHOP chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for slowly responding patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;332(16):1045–51.
  27. Philip T., Guglielmi C., Hagenbeek A. et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;333(23):1540–5.
  28. Philip T., Armitage J.O., Spitzer G. et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1987;316(24):1493–8.
  29. Vose J.M., Zhang M.J., Rowlings P.A. et al. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2001;19(2):406–13.
  30. Popat U., Przepiork D., Champlin R. et al. High-dose chemotherapy for relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma: mediastinal localization predicts for a favorable outcome. *J Clin Oncol* 1998;16(1):63–9.
  31. Deconinck E., Lamy T., Foussard C. et al. Autologous stem cell transplantation for anaplastic large-cell lymphomas: results of a prospective trial. *Br J Haematol* 2000;109(4):736–42.
  32. Olavarria T., Child F., Woolford A. et al. T-cell depletion and autologous stem cell transplantation in the management of tumor stage mycosis fungoides with peripheral blood involvement. *Br J Haematol* 2001;114(3):624–31.
  33. Bierman P.J., Sweetenham J.W., Loberiza F.R. Jr. et al. Syngeneic hematopoietic stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a comparison with allogeneic and autologous transplantation – The Lymphoma Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2003;21(20):3744–53.
  34. Scott B.L., Sandmaier B.M., Storer B. et al. Myeloablative vs nonmyeloablative allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia with multilineage dysplasia: a retrospective analysis. *Leukemia* 2006;20(1):128–35.
  35. Hanania E.G., Kavanagh J., Hortobagyi G. et al. Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am J Med* 1995;99(5):537–52.
  36. Sharp J.G., Kessinger A., Mann S. et al. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 1996;14(1):214–9.
  37. Demirkazik A., Kessinger A., Armitage J. et al. Progenitor and lymphoma cells in blood stem cell harvests: impact on survival following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(2):207–12.
  38. Gribben J.G., Freedman A.S., Neuberg D. et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991;325(22):1525–33.
  39. Schouten H.C., Qian W., Kvaloy S. et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol* 2003;21(21):3918–27.
  40. Hahn T., Wolff S.N., Cruczman M. et al. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of diffuse large cell B-cell non-Hodgkin's lymphoma: an evidence-based review. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(6):308–31.
  41. Spaepen K., Stroobants S., Dupont P. et al. Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18-

- fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: is [18F]FDG PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *J Clin Oncol* 2001;19(2):414–41.
42. Kostakoglu L., Coleman M., Leonard J.P. et al. PET predicts prognosis after one cycle of chemotherapy in aggressive lymphoma and Hodgkin's disease. *J Nuc Med* 2002;43(8):1018–27.
43. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A. et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350(18):1828–37.
44. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503–11.
45. Moskowitz C.H., Kewalramani T., Hamlin P. et al. The importance of molecular phenotype in predicting overall survival in patients with relapsed or primary refractory DLBCL treated with second line chemotherapy and ASCT. *Blood* 2004;104:7a.
46. Vose J.M., Bierman P.J., Lynch J.C. et al. Autologous transplant event-free survival (EFS) following failure of CHOP-rituximab (CHOP-R) or diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the same as the EFS following failure of CHOP alone. *Blood* 2004;104:254a.
47. Magni M., Di Nicola M., Devizzi L. et al. Successful in vivo purging of CD34-containing peripheral blood harvests in mantle cell and indolent lymphoma: evidence for a role of both chemotherapy and rituximab infusion. *Blood* 2000;96(3):864–9.
48. Moskowitz C.H., Bertino J.R., Glassman J.R. et al. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide, a highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17(12):3776–85.
49. Prince H.M., Imrie K., Crump M. et al. The role of intensive therapy and autologous blood and marrow transplantation for chemotherapy-sensitive relapsed and primary refractory non-Hodgkin's lymphoma, identification of major prognostic groups. *Br J Haematol* 1996;92(4):880–9.
50. Kewalramani T., Zelenetz A.D., Nimer S.D. et al. Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2004;103(10):3684–8.
51. Horwitz S.M., Negrin R.S., Blume K.G. et al. Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103(3):777–83.
52. Hoerr A., Gao F., Hidalgo J. et al. Effects of pretransplantation treatment with rituximab on outcomes of autologous stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22(22):4561–6.
53. Khouri I.F., Saliba R.M., Hosing C. et al. Concurrent administration of high-dose rituximab before and after autologous stem-cell transplantation for relapsed aggressive B-cell non-hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 2005;23(10):2240–7.
54. Птушкин В.В., Жуков Н.В., Мищенко С.В. и др. Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных клеток-предшественников гемопоза и применением ритуксимаба (мабтера) при неходжкинских лимфомах. *Соврем онкол* 2006;10(3):84–7.
55. Marcus R., Imrie K., Belch A. et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105(4):1417–23.
56. Lenz G., Dreyling M., Schiegnitz E. et al. Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma, results of a prospective, randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004;104(9):2667–74.
57. Deconinck E., Foussard C., Milpied N. et al. High-dose therapy followed by autologous purged stem-cell transplantation and doxorubicin-based chemotherapy in patients with advanced follicular lymphoma: a randomized multicenter study by GOELAMS. *Blood* 2005;105(10):3817–23.
58. Pettengell R. Autologous stem cell transplantation in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002;29 (Suppl 1):S1–4.
59. Van Besien K. Autologous and allogeneic stem cell transplantation in follicular lymphoma. *Transfus Apher Sci* 2005;32(1):45–53.
60. Mangel J., Buckstein R., Imrie K. et al. Pharmacokinetic study of patients with follicular or mantle cell lymphoma treated with rituximab as «in vivo purge» and consolidative immunotherapy following autologous stem cell transplantation. *Ann Oncol* 2003;14(5):758–65.
61. Ladetto M., Zallio F., Vallet S. et al. Concurrent administration of high-dose chemotherapy and rituximab is a feasible and effective chemo/immunotherapy for patients with high-risk non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2001;15(12):1941–9.
62. Romaguera J.E., Fayad L., Rodriguez M.A. et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol* 2005;23(28):7013–23.
63. Lenz G., Dreyling M., Hoster E. et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 2005;23(9):1984–92.
64. Dreyling M., Lenz G., Hoster E. et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 2005;105(7):2677–84.
65. Gianni A.M., Magni M., Martelli M. et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood* 2003;102(2):749–55.
66. Verdonck L.F., Dekker A.W., Lokhorst H.M. et al. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90(10):4201–5.

# ИНВАЗИВНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Н.Н. Климко

Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

Грибы рода *Aspergillus* были впервые описаны Micheli в 1729 г., однако только в 1953 г. Rankin опубликовал описание инвазивного аспергиллеза (ИА) у больного апластической анемией, возникшей в результате применения флорамфеникола. С тех пор актуальность ИА неуклонно нарастает. Применение новых медицинских технологий (высокодозной цитостатической и иммуносупрессивной терапии, трансплантации кроветворных стволовых клеток – ТКСК – и пр.), успехи в лечении бактериальной инфекции, эффективная профилактика вирусных инфекций и инвазивного кандидоза привели к значительному увеличению когорты больных с высоким риском развития ИА. Это заболевание отличается тяжестью клинических проявлений и чрезвычайно высокой летальностью. У некоторых категорий пациентов, например, больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и реципиентов алло-ТКСК, именно ИА является основной причиной летальных исходов [1, 2].

В данной статье обсуждаются диагностика и лечение ИА у взрослых больных, особенности ИА у детей с онкогематологическими заболеваниями исчерпывающе описаны А.А. Масчаном в недавно опубликованном пособии для врачей [3].

## Этиология

Из известных более чем 150 *Aspergillus* spp. основными возбудителями ИА являются *A. fumigatus* (≈70–90%), *A. flavus* (≈10–15%) и *A. niger* (≈2–6%), другие [*A. terreus*, *A. nidulans* (*A. nidulellus*) и пр.] встречаются реже. При этом соотношение различных видов возбудителей зависит от популяции пациентов. Определение вида возбудителя ИА имеет важное клиническое значение в связи с их различной чувствительностью к антимикотикам. Например, *A. terreus* отличается низкой чувствительностью к амфотерицину В [1].

*Aspergillus* spp. могут вызывать различные заболевания легких: ИА, хронический некротизирующий аспергиллез, аспергиллому и аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА). Они различаются по патогенезу, клиническим проявлениям и прогнозу, возникают у разных контингентов больных и требуют различных диагностических и лечебных мероприятий. Следует отметить, что клинический вариант и тяжесть заболевания определяются преимущественно состоянием иммунной системы больного, а не особенностями возбудителя [4].

**Факторами патогенности *Aspergillus* spp.** являются способность к росту при 37°C, наличие ферментов (протеазы, фосфолипазы), токсинов (афлатоксина, фумагиллина и пр.) и ингибиторов функций компонентов иммунной системы (например, нарушающего функции макрофагов и нейтрофилов глиотоксина), а также выраженная ангиоинвазивность [5].

*Aspergillus* spp. широко распространены в природе, они обитают в почве и гниющих растениях. Грибы рода *Aspergillus* часто выявляют в различных компонентах зда-

ний (ремонт в больнице может сопровождаться вспышками ИА), системе вентиляции и водоснабжения, пищевых продуктах (специях, кофе, чае, фруктах и пр.), домашних растениях и цветах, мягких игрушках, а также на медицинских инструментах (системах ИВЛ, небулайзерах и пр.). Следует учитывать, что длительное пребывание в жилых или производственных помещениях, пораженных *Aspergillus* spp., может привести к развитию ИА даже у иммунокомпетентных людей [4].

Роль контаминации *Aspergillus* spp. больничных помещений продолжают активно изучать. С одной стороны, хорошо известно увеличение частоты возникновения или развитие вспышек внутрибольничного ИА при проведении ремонта больничных помещений, сопровождающегося значительным увеличением числа конидий (спор) *Aspergillus* spp. в воздухе. Разработаны мероприятия, позволяющие уменьшить вероятность развития нозокомиального ИА при проведении ремонта. Вместе с тем следует учитывать возможность колонизации дыхательных путей больного *Aspergillus* spp. еще до поступления в стационар. В этих случаях роль контаминирующих больничные помещения *Aspergillus* spp. менее очевидна [6, 7].

Например, Н.А. Петрова и Г.А. Клясова [8] опубликовали опыт четырехлетнего микологического контроля воздуха палат для выявления возможных источников инфицирования у пациентов гематологических отделений. По мнению авторов, несмотря на широкую распространенность *Aspergillus* spp. в воздухе стационаров, совпадение контаминантов воздуха и возбудителей инвазивного аспергиллеза встречается редко и возможно инфицирование иммунокомпрометированных больных из других источников.

Вместе с тем доказана эффективность мероприятий, направленных на предупреждение контакта больных с *Aspergillus* spp., в предотвращении развития ИА у больных с длительным агранулоцитозом (НЕРА-фильтрация и пр.). Не подлежит сомнению, что во всех случаях внутрибольничного ИА необходимо проводить мероприятия, направленные на выявление и устранение источников *Aspergillus* spp. Кроме того, больных с высоким риском развития ИА следует размещать в палатах, оборудованных системой очистки воздуха, способной фильтровать конидии *Aspergillus* spp. [9].

## Патогенез

Инфицирование обычно происходит при ингаляции конидий *Aspergillus* spp. с вдыхаемым воздухом; другие пути инфицирования (пищевой, травматическая имплантация возбудителя, при ожогах и пр.) имеют меньшее значение. От человека к человеку любые формы аспергиллеза не передаются [4].

Человеческий организм очень хорошо защищен от возбудителей оппортунистических микозов, поэтому, несмотря на повсеместное присутствие *Aspergillus* spp., у иммунокомпетентных людей ИА обычно не возникает. Цилиарный клиренс препятствует попаданию конидий

Таблица 1. Группы риска развития инвазивных микозов у гематологических больных [10]

Низкий риск	Промежуточный / низкий риск	Промежуточный / высокий риск	Высокий риск
Ауто-ТКСК	Нейтропения $0,1-0,5 \times 10^9$ менее 3 нед	ОМЛ – индукция ремиссии	Нейтропения $<0,1 \times 10^9$ более 3 нед
Острый лимфобластный лейкоз у детей (кроме <i>P. jiroveci</i> )	Лимфоциты $<0,5 \times 10^9$ + антибиотики	Нейтропения $0,1-0,5 \times 10^9$ 3–5 нед	Алло-ТКСК неродственная, частично совместимая
Злокачественная неходжкинская лимфома	Пожилой возраст + центральный венозный катетер	Лимфопения $0,1-0,5 \times 10^9$ 3–5 нед	РТПХ
		Алло-ТКСК родственная	Нейтропения $<0,5 \times 10^9$ более 5 нед
		Тотальное облучение тела	Стероиды $>1$ мг/кг + нейтропения $<1 \times 10^9$ более 1 нед
		Колонизация <i>Candida sp.</i> 2 локусов	Стероиды $>2$ мг/кг более 2 нед
			Высокие дозы цитозина-арабинозида
			Колонизация <i>C. tropicalis</i>
			Флударабин?

*Aspergillus spp.* в альвеолы, а альвеолярные макрофаги способны эффективно уничтожать их. После герминации конидий и формирования гиф уничтожение возбудителя происходит с участием нейтрофильных гранулоцитов, Т-клеток и системы комплемента [5].

Основные факторы риска развития ИА представлены в табл. 1. Наиболее часто ИА развивается у больных с длительным агранулоцитозом, обусловленным массивной цитостатической терапией или основным заболеванием; реципиентов алло-ТКСК при развитии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и цитомегаловирусной инфекции и пациентов длительно получающих глюкокортикостероиды и иммуносупрессоры [2, 10].

У пациентов с выраженной нейтропенией ИА является частым осложнением. Например, у больных острыми лейкозами частота ИА составляет 5–24%. Вероятность развития ИА определяется не только продолжительностью и выраженностью нейтропении, но и некоторыми другими факторами: возрастом, применением кортикостероидов, предшествующими заболеваниями легких, а также большим количеством конидий *Aspergillus spp.* в окружающей среде. При продолжительности нейтропении менее 10 дней ИА возникает редко, более 30 сут – очень часто (до 70%). У детей с нейтропенией ИА возникает несколько реже, чем у взрослых. Выраженная нейтропения не только является фактором риска развития ИА, но и в значительной степени определяет исход заболевания. При сохраняющейся выраженной нейтропении успех даже интенсивной антифунгальной терапии маловероятен [10, 11].

У реципиентов алло-ТКСК частота ИА составляет от 5 до 26%, у реципиентов ауто-ТКСК – менее 5%. Для реципиентов алло-ТКСК характерно бимодальное распределение развития ИА. У части больных ИА возникает в периоде постцитостатической аплазии кроветворения, особенно при отсутствии палат с высокоэффективной очисткой воздуха. Более распространенным является развитие ИА во время выраженной иммуносупрессии, обусловленной РТПХ и применением стероидов и иммуносупрессоров. Медиана этих двух периодов высокого

риска развития ИА, по данным разных исследователей, варьирует от 25 до 67 дней и от 100 до 136 дней после трансплантации. Основными возбудителями ИА у реципиентов алло-ТКСК являются *A. fumigatus* (56%), *A. flavus* (18%), *A. terreus* (16%), *A. niger* (8%) и *A. versicolor* (1%). Факторами риска развития ИА у этих больных являются длительная миелосупрессия вследствие позднего приживания трансплантата или малого количества ( $< 3 \times 10^6$ /кг) трансплантируемых стволовых клеток, иммуносупрессия в связи с применением трансплантатов с селекцией CD34+ клеток или деплецией Т-клеток, острая и хроническая РТПХ при использовании неродственных или частично совместимых трансплантатов, иммуносупрессивное лечение РТПХ, применение немиелоаблативных режимов кондиционирования, а также цитомегаловирусная инфекция. Летальность в течение 3 мес после развития ИА варьирует от 48–57% у реципиентов ауто-ТКСК до 78–92% у реципиентов алло-ТКСК [12, 13].

Следует отметить, что ИА может возникать у больных и без указанных факторов риска. Например, частота ИА у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) составляет 2–4%. Основным фактором риска у таких пациентов является длительное или высокодозное применение системных стероидов. *A. fumigatus* составляет 96% возбудителей ИА у больных в ОРИТ, *A. flavus* и *A. niger* встречаются редко. Летальность при ИА у иммунокомпетентных больных в ОРИТ составляет 80–97% и достоверно не отличается от показателей пациентов в ОРИТ с известными факторами риска, например, нейтропенией [14, 15].

Кроме того, вспышки внутрибольничного ИА у иммунокомпетентных больных в других отделениях могут быть связаны с высокой концентрацией конидий *Aspergillus spp.* в воздухе при проведении ремонта, поражении этими грибами системы вентиляции, водоснабжения и пр. [16].

#### Клинические признаки

Продолжительность инкубационного периода не определена. У многих пациентов поверхностную коло-

низацию *Aspergillus spp.* дыхательных путей и придаточных пазух носа выявляют до госпитализации и ятрогенной иммуносупрессии. При ИА первичное поражение легких выявляют у 80–90% больных, придаточных пазух носа — у 5–10%. *Aspergillus spp.* ангиотропны, способны проникать в сосуды и вызывать тромбозы, что приводит к частой (15–40%) гематогенной диссеминации с поражением различных органов, например, головного мозга (~ 3–30%), кожи и подкожной клетчатки, костей, щитовидной железы, печени, почек и пр. Следует подчеркнуть, что у иммуноскомпрометированных больных выраженность симптомов не отражает тяжесть заболевания, поэтому у пациентов с факторами риска обязательными являются раннее выявление клинических признаков и незамедлительные диагностические мероприятия [8, 20].

**ИА легких.** Наиболее частыми клиническими признаками ИА легких у больных с нейтропенией являются рефрактерное к антибиотикам широкого спектра повышение температуры тела более 38°C длительностью более 96 ч, непродуктивный кашель, боли в грудной клетке, кровохарканье и одышка. Клинические признаки обычно появляются после 10–12 дней агранулоцитоза. У 10–15% больных повышения температуры тела не отмечают. Иногда проявления ИА легких напоминают признаки тромбоза ветвей легочной артерии: внезапно возникшие боли в груди и одышка. Летальность при ИА легких у больных с нейтропенией составляет от 35 до 60% и зависит от времени начала лечения и восстановления нейтрофилопоза [4].

Особенностями клинических проявлений ИА легких у реципиентов алло-ТКСК по сравнению с больными с нейтропенией являются развитие клинических симптомов в поздние сроки после трансплантации, очень быстрое прогрессирование, нередко отсутствие лихорадки у получающих стероиды больных, а также очень высокая (>50%) частота поражения экстрапульмональных органов, особенно ЦНС. Кроме того, летальность при ИА у реципиентов алло-ТКСК существенно выше, чем у больных с нейтропенией, и составляет от 80 до 90% [2].

У больных в ОРИТ клинические признаки ИА легких чрезвычайно неспецифичны. Рефрактерная к антибиотикам лихорадка отмечается лишь у половины больных, типичные признаки ангиоинвазии, например, кровохарканье или «плевральные» боли в груди, еще реже. Поэтому заболевание обычно диагностируют поздно, нередко посмертно [14, 15].

**Острый инвазивный аспергиллезный риносинусит** составляет ~ 5–10% всех случаев ИА. Этот вариант инфекции развивается преимущественно у больных гемобластозами с длительной постцитостатической нейтропенией и апластической анемией, а также у реципиентов алло-ТКСК. У других категорий иммуноскомпрометированных больных этот вариант инфекции возникает редко, чаще развивается хронический аспергиллезный риносинусит. Основным возбудителем острого инвазивного аспергиллезного риносинусита является *A. flavus*, в отличие от пульмонального или диссеминированного ИА, где преобладает *A. fumigatus*. Кроме *Aspergillus spp.* возбудителями микотического риносинусита могут быть зигомикеты, *Fusarium* и *Scedosporium spp.* Ранние клинические признаки (повышение температуры тела, односторонние боли в области пораженной придаточной пазухи, появление темного отделяемого из носа) неспецифичны, их ча-

сто принимают за проявления бактериальной инфекции. Быстрое прогрессирование процесса приводит к появлению боли в области орбиты глаза, нарушению зрения, конъюнктивиту и отеку век, разрушению твердого и мягкого неба с появлением черных струбьев. При поражении головного мозга развиваются головные боли, обмороки и нарушение сознания [1, 5].

**Диссеминированный ИА.** Гематогенная диссеминация является частым осложнением прогрессирующего ИА легких или придаточных пазух носа у больных с тяжелой иммуносупрессией, в том числе с длительным агранулоцитозом, РТПХ III–IV степени, высокодозной терапией стероидами и пр. У таких пациентов гематогенная диссеминация происходит очень быстро, при этом могут поражаться буквально все органы и ткани, наиболее часто — головной мозг, кожа и подкожная клетчатка, кости, кишечник и пр. Летальность при диссеминированном ИА достигает 90% [2].

**Аспергиллез ЦНС** характеризуется очень высокой летальностью (80–99%) и нередко выявляется лишь посмертно. Обычно поражение ЦНС возникает в результате гематогенной диссеминации, а также распространения инфекции из придаточной пазухи или орбиты. Частота поражения ЦНС широко варьирует (3–30%) у разных категорий больных и зависит от степени иммуносупрессии. Основными вариантами церебрального аспергиллеза являются абсцесс и кровоизлияние в вещество головного мозга, менингит развивается редко. Клинические проявления (головная боль, головокружение, тошнота и рвота, очаговые неврологические симптомы и нарушение сознания) неспецифичны. Аспергиллез ЦНС необходимо исключить во всех случаях появления необъясненной неврологической симптоматики у больных с ИА другой локализации. Дифференциальную диагностику следует проводить с бактериальными абсцессами, туберкулезом, токсоплазмозом, лимфомой, а также другими микотическими поражениями ЦНС [17].

**Диссеминация с поражением кожи** (5–20%) проявляется быстро увеличивающимися макуло-папулезными элементами с очагом изъязвления и некроза в центре.

При поражении щитовидной железы (3–15%) обычно возникают локализованные абсцессы либо диффузное увеличение органа.

**Аспергиллезный остеомиелит** может возникать вследствие гематогенной диссеминации (позвонки, череп, длинные кости), а также распространения инфекции из придаточной пазухи (мастоидит, поражение орбиты). Клинические проявления неспецифичны и неотличимы от бактериального остеомиелита.

**Аспергиллезный перикардит** может возникать при распространении инфекции из легкого, а также вследствие гематогенной диссеминации. У большинства больных развиваются симптомы инфекционного перикардита, у 30% — тампонады перикарда. Аспергиллезный перикардит обычно заканчивается летальным исходом. Диагноз подтверждается выявлением возбудителя или специфического антигена при исследовании перикардиальной жидкости.

**Поражение желудка и кишечника** обычно появляется в терминальном периоде ИА у больных гемобластозами, апластической анемией и реципиентов алло-ТКСК. Основным проявлением являются тяжелые кровотечения, обычно заканчивающиеся летальным исходом [18].

Таблица 2. Частота (в %) выявления различных признаков ИА при КТ и рентгенографии легких у 55 больных [20]

Признак	КТ	Рентгенография
Округлые фокусы уплотнения легочной ткани	75	47
Субплевральные очаги с нечеткими контурами	75	40
Инфильтрация по типу «матового стекла»	65	—
Связь изменений с сосудами	50	10
Симптом «ореола»	40	—
Альвеолярная инфильтрация	35	25
Симптом «полумесяца»	9	3

### Диагностика

Важнейшее условие успешного лечения ИА — ранняя диагностика, которая нередко является трудной задачей. Клинические признаки заболевания неспецифичны, радиологические — недостаточно специфичны, полученные материалы для микробиологического подтверждения диагноза часто затруднено в связи с тяжестью состояния больных и высоким риском тяжелых кровотечений. Основными методами выявления очагов поражения являются компьютерная томография, микробиологического подтверждения диагноза — микроскопия и посев материала из очага поражения, серологической диагностики — определение галактоманна в сыворотке крови [1, 2].

#### Методы диагностики:

- КТ или рентгенография легких, придаточных пазух;
- при наличии неврологической симптоматики — КТ или МРТ головного мозга (или других органов при выявлении симптомов диссеминации);
- определение антигена *Aspergillus* (галактоманна) в сыворотке крови, бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), спинномозговой жидкости — СМЖ (Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad);
- бронхоскопия, БАЛ, биопсия очагов поражения;
- микроскопия и посев БАЛ, мокроты, отделяемого из носа, биопсийного материала.

Основным методом радиологической диагностики ИА легких является КТ в режиме высокого разрешения. В отличие от КТ результаты рентгенографии легких при ИА обычно неспецифичны, раннее выявление признаков заболевания с помощью этого метода часто невозможно. Установлено, что систематическое применение КТ у больных с высоким риском развития ИА достоверно снижает общую и атрибутивную летальность. При наличии факторов риска и предполагаемых клинических признаков у иммунокомпрометированного больного показано проведение КТ грудной полости в режиме высокого разрешения в течение 48 ч [19].

«Ранними» КТ-признаками ИА легких являются: мелкие (< 2 см) связанные с сосудами округлые очаги, расположенные субплеврально; симптом «ореола», а также уплотнения треугольной формы, примыкающие основанием к плевре. По мере прогрессирования заболевания при КТ легких определяют «поздние» признаки: очаги деструкции, а также полости с содержимым и прослойкой воздуха (симптом «полумесяца» или «погремушки»). Признаки плеврита обычно отсутствуют.

Симптом «ореола», характерный признак ИА, является изображением зоны кровоизлияния и некроза вокруг очага микотического поражения легких. Симптом «ореола» обычно возникает в течение первых 3–7 дней ИА у больных с агранулоцитозом. Следует отметить, что симптом «ореола» нельзя расценивать как патогномичный признак ИА, он описан при поражениях легких, вызванных другими микотическими (*Fusarium spp.*, зигомицеты и др.) или бактериальными (*Pseudomonas spp.*) патогенами. Симптом «ореола» наиболее часто выявляют у больных с агранулоцитозом, реже — у других

категорий иммунокомпрометированных пациентов, например, реципиентов алло-ТКСК. Симптом «полумесяца» или «погремушки» является проявлением образования полости в легких. У гематологических пациентов этот симптом обычно выявляют после завершения периода нейтропении. Симптом «полумесяца» также не является патогномичным, но у больных с нейтропенией он с высокой вероятностью свидетельствует об ИА [1, 4, 5].

Частота выявления указанных симптомов различна. По данным разных авторов, одиночные фокусы поражения с симптомом «ореола» определяют у 30–60% больных ИА легких, симптом «полумесяца» — у 2–10%, а неспецифические признаки (очаги с неровными контурами, инфильтрация, центролобулярные узелки, полости, изменения по типу матового стекла, плевриты) — у 30–80% [2]. М.В. Самохвалова [20] при обследовании 55 больных ИА установила, что наиболее часто при КТ легких выявляют округлые фокусы уплотнения легочной ткани и субплевральные очаги с нечеткими контурами, в то время как симптом «ореола» и симптом «полумесяца» определяют реже (табл. 2). Кроме того, исследование подтвердило, что КТ — более эффективный метод диагностики ИА легких, чем рентгенография [20].

Наконец, следует учитывать динамику КТ-признаков ИА легких. Наиболее характерный признак, симптом «ореола», обычно выявляют на 1-й неделе заболевания, «неспецифические» изменения — на 2-й, симптом «полумесяца» — на 3-й. Поэтому КТ-исследование следует проводить рано, в течение 48 ч после появления первых признаков ИА легких [19].

Эффективность КТ в диагностике ИА легких весьма велика. Например, у реципиентов ТКСК прогностическое значение отрицательного результата КТ легких с высоким разрешением составляет 97%, т.е. отсутствие КТ-признаков практически исключает возможность ИА легких у таких пациентов. Если же у больных с высоким риском ИА сохраняются необъясненные признаки инфекции, то показана повторная КТ легких через 5–7 дней. С другой стороны, у больных без типичных факторов риска, например, пациентов ОРИТ, симптомы «ореола» и «полумесяца» при КТ легких обычно не выявляют, а отмечают «неспецифические» изменения [1, 15].

При ИА придаточных пазух носа обычная рентгенография неэффективна и не позволяет провести дифференциальную диагностику с бактериальным синуситом. При КТ обычно определяют локальную деструкцию

костей придаточных пазух носа и вовлечение в патологический процесс мягких тканей [4].

КТ-признаками аспергиллезного поражения головного мозга являются единичные или множественные абсцессы, окруженные зоной отека и усиливаемые при контрастировании, а также очаги низкой плотности. Признаки менингита выявляют редко, поражение спинного мозга — чрезвычайно редко [5, 17].

**Определение антигена *Aspergillus* (галактоманна)** в сыворотке крови, БАЛ и СМЖ является важным методом ранней диагностики ИА. По результатам метаанализа 27 исследований, чувствительность определения галактоманна в сыворотке крови методом Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad, при доказанном ИА составляет 0,71, специфичность — 0,89 [21]. Диагностическим является выявление галактоманна при повторном исследовании. Частота ложноположительных результатов при использовании Platelia *Aspergillus* у больных без ИА составляет 1–18%. Ложноположительные результаты чаще выявляют в первые 10 дней после цитостатической химиотерапии и 30 дней после трансплантации костного мозга. У детей ложноположительные результаты теста Platelia *Aspergillus* отмечают чаще, чем у взрослых. Развитие ложноположительных реакций связывают с эмпирической антифунгальной терапией, применением некоторых антибактериальных препаратов (например, пиперациллина/тазобактама), наличием галактоманна в продуктах питания (крупа, макарон), а также перекрестными реакциями с экзоантигенами бактерий и других микромицетов. Диагностическая эффективность определения галактоманна повышается при проведении скрининга 2–3 раза в неделю во время высокого риска развития ИА. При этом у большинства больных галактоманн методом Platelia *Aspergillus* выявляют на 4–8 дней раньше первых клинических и рентгенографических признаков заболевания [1, 2, 19]. Есть данные о диагностической эффективности выявления галактоманна методом Platelia *Aspergillus* у больных в ОРИТ, хотя специфичность и чувствительность метода у этих пациентов пока не определены [14, 15]. Определение специфических антител в сыворотке крови для диагностики острого ИА не применяют в связи с нарушением их продукции у данной категории больных. Однако этот метод имеет диагностическое значение при хроническом некротизирующем аспергиллезе и аспергилломе [4, 22].

**При микроскопии** мокроты, БАЛ и биопсийного материала от больных ИА выявляют септированный, т.е. содержащий перегородки, мицелий, ветвящийся под углом 45°. Однако частота обнаружения *Aspergillus spp.* при микроскопии и посеве БАЛ у больных с доказанным ИА легких составляет около 50%, а проведение инвазивных процедур у большинства таких пациентов невозможно. Поэтому отрицательный результат микологического исследования мокроты и БАЛ не исключает наличия у больного ИА. Эффективность микроскопического исследования увеличивается после обработки респираторных субстратов калькофлюором белым. Следует отметить, что даже при диссеминированном аспергиллезе возбудитель очень редко выделяют при посеве крови [1].

**При гистологическом исследовании** материала от больных ИА обнаруживают некротизированные абсцессы и инфаркты. *Aspergillus spp.* в тканях относительно хорошо окрашиваются гематоксилином и эозином. Гифы *Aspergillus spp.*, 2–3 мкм в диаметре, разрастаются ради-

ально от центрального фокуса в виде «кустарника». Характерно дихотомическое ветвление под углом 45°. В отличие от возбудителей зигомикозов, мицелий *Aspergillus spp.* септированный. С другой стороны, *Aspergillus spp.* в гистологических препаратах иногда трудно отличить от возбудителей гиалогифомикозов (*Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium spp.* и др.), поэтому для идентификации возбудителя необходимо его выделение в культуре [1, 5].

Все грибы рода *Aspergillus*, выделенные в культуре из любых биосубстратов от иммуноскомпрометированных больных, должны быть определены до вида. Выделение *Aspergillus spp.* в мокроте или БАЛ больного с факторами риска, характерными клиническими и КТ-признаками с высокой вероятностью свидетельствует об ИА. С другой стороны, выделение *A. niger* из респираторных субстратов нередко свидетельствует не об инвазивном процессе, а о колонизации дыхательных путей. Некоторые виды *Aspergillus* отличаются сниженной чувствительностью к антимикотикам. Например, устойчивый к амфотерицину В *A. terreus* у разных категорий больных составляет от 3 до 16% возбудителей ИА. Кроме того, сниженная чувствительность к амфотерицину В характерна для *A. nidulans* (*A. nidullelus*). При длительной антифунгальной терапии следует учитывать возможность развития вторичной резистентности *A. fumigatus* к итраконазолу [4, 11, 23].

Диагностическое значение высокого уровня фибриногена (> 6,0 г/л) и прокальцитонина в сыворотке крови не определено. Повышение уровня С-реактивного белка неспецифично [1].

**Критерии диагностики.** Диагноз устанавливают при наличии факторов риска, радиологических признаков инвазивного микоза легких в сочетании с выявлением *Aspergillus spp.* при микроскопии, гистологическом исследовании и/или посеве материала из очагов поражения, мокроты, БАЛ или выявлением антигена *Aspergillus* (галактоманна) в сыворотке крови, БАЛ.

Критерии диагностики ИА:

ИА легких — КТ-, рентгенографические признаки инвазивного микоза легких в сочетании с выявлением *Aspergillus spp.* при микроскопии, гистологическом исследовании и/или посеве материала из очагов поражения, мокроты, БАЛ или выявлением антигена *Aspergillus* (галактоманна) в сыворотке крови, БАЛ;

ИА придаточных пазух носа — КТ-, рентгенографические признаки инвазивного микоза придаточных пазух носа в сочетании с выявлением *Aspergillus spp.* при микроскопии, гистологическом исследовании и/или посеве отделяемого из носа, аспирата из придаточных пазух.

### Прогноз

При ИА летальность без лечения достигает 100%. При проведении лечения летальность в 1960–1995 гг. составляла 86%, в настоящее время — около 50%. Кроме раннего адекватного лечения важными условиями являются завершение периода нейтропении и устранение (снижение выраженности) ятрогенной иммуносупрессии. Следует учитывать заболевание или состояние, на фоне которого развился ИА. Например, у реципиентов алло-ТКСК и больных апластической анемией эффективность лечения остается низкой. Кроме того, летальность значительно увеличивается при развитии гематогенной диссеминации, особенно с поражением ЦНС. У реципиентов ТКСК факторами, ассоциированными с летальным исходом при ИА, являются возраст 12–35 лет,

диссеминация ИА, наличие плеврита, моноцитопения  $<0,12 \times 10^9/\text{л}$ , применение стероидов в течение 2 мес до ИА, применение стероидов в дозе 2 мг/кг/сут, а также неконтролируемая РТПХ [10, 12].

### Лечение

Лечение ИА легких состоит из антифунгальной терапии, устранения или снижения выраженности факторов риска и хирургического вмешательства. При выявлении диагностических признаков ИА лечение должно быть начато как можно быстрее. Кроме лечения установленного заболевания возможно назначение эмпирической (высокий риск ИА, есть предполагаемые клинические признаки, но лабораторное подтверждение отсутствует) или превентивной (высокий риск ИА, есть предполагаемые лабораторные признаки, нет клинических признаков) терапии, а также первичной и вторичной профилактики.

**Антифунгальная терапия.** В данной статье представлены только препараты, разрешенные в настоящее время для применения в нашей стране (амфотерицин В, липидный комплекс амфотерицина В, вориконазол, итраконазол и каспофунгин). Следует отметить, что в настоящее время чрезвычайно интенсивно разрабатываются и внедряются в клиническую практику новые антимикотики, поэтому в ближайшие годы появятся дополнительные препараты для лечения ИА [11].

Амфотерицин В относится к полиеновым антимикотикам. Он связывается с эргостеролом цитоплазматической мембраны, что ведет к нарушению ее целостности, потере содержимого цитоплазмы и гибели клетки гриба. В течение длительного времени амфотерицин В был единственным препаратом для лечения инвазивных микозов, несмотря на недостаточную эффективность и высокую токсичность. С появлением новых, более эффективных и безопасных антимикотиков амфотерицин В перестал быть препаратом выбора для лечения ИА. Липидный комплекс амфотерицина В представляет собой одну из современных лекарственных форм этого полиена с улучшенной переносимостью.

Азолы (вориконазол, итраконазол) ингибируют цитохром Р450-зависимую  $14\alpha$ -деметилазу, катализирующую превращение ланостерола в эргостерол — основной структурный компонент цитоплазматической мембраны. Дефицит эргостерола ведет к нарушению целостности цитоплазматической мембраны и гибели клетки гриба.

Каспофунгин — представитель нового класса антимикотиков, ингибиторов синтеза глюкана или эхинокандинов. Каспофунгин быстро и необратимо блокирует фермент 1,3-бета-глюкансинтазу, что приводит к нарушению синтеза важного компонента клеточной стенки 1,3-бета-глюкана и гибели клетки гриба. У млекопитающих такой фермент отсутствует, что снижает частоту нежелательных явлений.

Препаратом выбора для лечения ИА является вориконазол, альтернативными — каспофунгин, стандартный или липидный амфотерицин В, а также итраконазол. При неэффективности начальной терапии возможно применение комбинации каспофунгина в сочетании с вориконазолом или липидным амфотерицином В. Комбинированную терапию в качестве лечения первой линии используют у больных с очень плохим прогнозом, например при алло-ТКСК или тяжелой апластической анемии. Итраконазол обычно назначают после стабилизации состояния больного [2].

Эффективность вориконазола в лечении ИА доказана в крупном многоцентровом рандомизированном исследовании [24]. По сравнению с амфотерицином В в сочетании с другими препаратами лечение вориконазолом было достоверно более эффективным как при пульмональном, так и при экстрапульмональном аспергиллезе, а также у различных категорий больных (реципиентов алло- и аутологичного костного мозга, пациентов с нейтропенией и без нее и т.д.). Лечение вориконазолом сопровождалось достоверным увеличением выживаемости пациентов (70,8% против 57,9,  $p=0,02$ ). Частота обусловленных аспергиллезом летальных исходов при лечении вориконазолом была более чем в 2 раза меньше (13%), чем при использовании препаратов сравнения (29%). Нежелательные явления при использовании вориконазола возникали достоверно реже, чем при использовании препаратов сравнения (13,4% против 24,3%,  $p=0,008$ ).

Лечение обычно начинают с внутривенного введения вориконазола, при стабильном состоянии пациента возможно применение таблетированной формы препарата. При использовании вориконазола необходимо учитывать возможность лекарственных взаимодействий. Например, не следует назначать вориконазол больным, получающим рифампицин или другие индукторы ферментов цитохрома Р450, поскольку в этих случаях терапевтическая концентрация вориконазола в плазме и тканях обычно не достигается [25].

Эффективность каспофунгина установлена в контролируемом исследовании у больных с ИА, рефрактерным к обычному или липидному амфотерицину В, или итраконазолу. При использовании каспофунгина более 7 сут ответ был получен у 56% пациентов. Каспофунгин назначают как в качестве монотерапии, так и в комбинации с вориконазолом или липидным амфотерицином В. Имеются сообщения об эффективном применении каспофунгина при ИА в качестве препарата первой линии [26–29].

В течение многих лет амфотерицин В был единственным препаратом для лечения ИА. Однако его применение ограничивают дозозависимая нефротоксичность, инфузионные реакции и недостаточная эффективность. В настоящее время амфотерицин В уступил свое место более эффективным и безопасным препаратам — вориконазолу и каспофунгину. При лечении ИА стартовая доза амфотерицина В у больных, не получающих циклоспорин А, обычно составляет 1,0 мг/кг/сут. При прогрессировании заболевания и хорошей переносимости препарата возможно повышение его дозы до 1,5 мг/кг/сут. У пациентов, получающих циклоспорин А, рекомендуют применение других препаратов, в том числе каспофунгина или липидного амфотерицина В, в связи с высоким риском развития почечной недостаточности. При необходимости использования амфотерицина В у таких больных его стартовая доза составляет 0,8 мг/кг/сут с последующим повышением до 1,0 мг/кг/сут. В этом случае показано тщательное мониторирование функции почек и уровня циклоспорина А в сыворотке крови. Для снижения нефротоксичности амфотерицина В применяют гидратацию физиологическим раствором, восполнение дефицита калия и магния, а также отменяют другие нефротоксичные препараты. Совместное применение лазикса и амфотерицина В повышает нефротоксичность последнего. У больных с выраженным нарушением функции почек применение амфотерицина В не рекомендуют. Однако при проведе-

нии хронического гемодиализа амфотерицин В применяют в обычной дозе — 1–1,5 мг/кг/сут [2, 4, 5].

Липидный комплекс амфотерицина В назначают вместо обычного амфотерицина В пациентам с почечной недостаточностью, при неэффективности стандартного амфотерицина В, его нефротоксичности или некупируемых премедикацией выраженных реакций на внутривенную инфузию. Их эффективность при ИА сравнима с таковой стандартного амфотерицина В, но частота нежелательных явлений, в том числе нефротоксичности, ниже [11].

Итраконазол обычно назначают при стабилизации состояния больного после начального применения вориконазола, амфотерицина В или каспофунгина. В связи с переменной биодоступностью капсул итраконазола рекомендуют применение раствора этого препарата для перорального приема. Кроме того, итраконазол назначают при стабильном состоянии больного и отсутствии факторов риска летального исхода в момент диагностики ИА. При назначении итраконазола необходимо учитывать возможные лекарственные взаимодействия. Например, одновременное применение рифампицина и других индукторов ферментов цитохрома Р450 приводит к резкому снижению концентрации итраконазола в плазме и тканях. Дозу циклоспорина А при назначении итраконазола следует уменьшить вдвое, а затем тщательно мониторировать уровень циклоспорина А в плазме [2].

#### Лечение ИА легких

Препарат выбора:

- вориконазол внутривенно 6 мг/кг каждые 12 ч в первый день, затем внутривенно по 4 мг/кг каждые 12 ч или перорально по 200 мг/сут (масса тела < 40 кг) или 400 мг/сут (масса тела > 40 кг).

Альтернативные препараты:

- каспофунгин по 70 мг в первый день, затем по 50 мг/сут;
- амфотерицин В по 1,0–1,5 мг/кг/сут до стабилизации состояния больного, затем итраконазол по 400 мг/сут в течение 2–6 мес;
- липидный комплекс амфотерицина В по 3–5 мг/кг/сут;
- у клинически стабильных больных итраконазол по 600 мг/сут — 4 дня, затем по 400 мг/сут в течение 2–6 мес.

Комбинированная терапия:

- каспофунгин в сочетании с вориконазолом или липидным комплексом амфотерицина В;
- хирургическое лечение;
- устранение или снижение выраженности факторов риска.

Оценку эффекта антифунгальной терапии при отсутствии быстрого ухудшения состояния следует проводить на 4–7-е сутки. При неэффективности начального лечения применяют альтернативные препараты или комбинации антимикотиков с разными механизмами действия, например, вориконазол и каспофунгин или липидный комплекс амфотерицина В и каспофунгин. Положительными особенностями комбинированной антифунгальной терапии являются возможное повышение эффективности, обусловленное различными механизмами действия препаратов, различиями в фармакокинетике и фармакодинамике, снижение токсичности антимикотиков, уменьшение продолжительности лечения, увеличение спектра действия при эмпирической терапии, а также снижение риска развития резистентности возбудите-

лей. Вместе с тем эффективность комбинированной терапии не доказана в контролируемых исследованиях, а одновременное применение новых антимикотиков значительно увеличивает стоимость лечения. В ретроспективных исследованиях показано, что при рефрактерном к липосомальному амфотерицину В ИА эффективность комбинированной терапии каспофунгином и липосомальным амфотерицином В составила от 46 до 60%. В другом ретроспективном исследовании комбинированная терапия вориконазолом и каспофунгином у больных с рефрактерным в начальной терапии ИА приводила к достоверному повышению выживаемости больных и снижению атрибутивной летальности [13, 26, 27, 30, 31].

Антифунгальную терапию продолжают до исчезновения клинических признаков заболевания, эрадикации возбудителя из очага инфекции, купирования или стабилизации радиологических признаков, а также завершения периода нейтропении. Обычная продолжительность антифунгальной терапии — не менее 3 мес. Однако у больных с сохраняющейся иммуносупрессией, например, при РТПХ у реципиентов алло-ТКСК, необходимо более длительное лечение [2].

**Устранение или снижение выраженности факторов риска** достигается в основном успешным лечением основного заболевания, а также, при возможности, отменой или снижением дозы стероидов или иммуносупрессоров.

Возможность медикаментозной коррекции иммунных нарушений при лечении инвазивных микозов продолжают изучать. У больных с длительной нейтропенией широко применяют гранулоцитарный (филграстим, ленограстим) или гранулоцитарно-макрофагальный (молграмостим) колониестимулирующие факторы (Г- или ГМ-КСФ), хотя их эффективность в лечении инвазивных микозов не была показана в контролируемых клинических исследованиях. Более того, использование Г-КСФ (но не ГМ-КСФ) у реципиентов алло-ТКСК может увеличивать длительность иммуносупрессии. Результаты применения трансфузии гранулоцитов для лечения ИА у больных с нейтропенией противоречивы, их эффективность не подтверждена в контролируемых клинических исследованиях. Эффективность применения рекомбинантного гамма-интерферона для профилактики и лечения ИА была установлена только у больных хронической гранулематозной болезнью, имеются лишь единичные публикации об эффективном применении рекомбинантного гамма-интерферона при ИА у больных с нейтропенией или реципиентов ТКСК [11, 32].

Основными показаниями для **хирургического лечения**, лобэктомии или резекции пораженного участка легкого являются высокий риск легочного кровотечения (выраженное кровохарканье, расположение очагов поражения вблизи крупных сосудов). Кроме того, удаление одиночных очагов поражения легких показано для снижения риска рецидива ИА во время высокодозной цитостатической терапии или алло-ТКСК. Наконец, хирургическое вмешательство может понадобиться для верификации диагноза.

Массивное легочное кровотечение является непосредственной причиной летального исхода у 10–15% умерших от ИА больных. Основной причиной легочных кровотечений при ИА считают связанное с ангиотропизмом *Aspergillus spp.* поражение сосудов. Легочные кровотечения обычно возникают по завершении периода нейтропении,

когда выделяемые гранулоцитами протеолитические ферменты способствуют деструкции тканей в очагах аспергиллезной инфекции. Если такие очаги расположены вблизи от легочной артерии и ее ветвей, перфорация стенки сосуда может вызвать тяжелое кровотечение. Поэтому при выявлении аспергиллезных очагов вблизи крупных сосудов показано проведение хирургической операции до завершения периода нейтропении. Установлено, что частота осложнений при проведении оперативного вмешательства, например лобэктомии, во время нейтропении невелика. Во время и после хирургического вмешательства необходимо продолжать применение антимикотиков.

Удаление одиночных очагов поражения легких совместно с вторичной антифунгальной профилактикой снижает риск рецидива ИА во время последующей высокодозной цитостатической терапии или алло-ТКСК. В этих случаях хирургическое вмешательство проводят после завершения периода нейтропении и стабилизации состояния больного на фоне антифунгальной терапии. Наконец, получение материала из очага поражения может способствовать установлению диагноза, особенно при неэффективности других диагностических мероприятий. Обычно проводят торакоскопическую резекцию очага [1, 2].

**ИА придаточных пазух носа** является тяжелым заболеванием, летальность при котором варьирует от 20% у больных с ремиссией острого лейкоза до 70–90% у пациентов с рецидивом острого лейкоза и реципиентов алло-ТКСК. Исход аспергиллезного синусита в значительной степени зависит от завершения нейтропении и иммуносупрессии. Без адекватной антифунгальной терапии и купирования нейтропении и иммуносупрессии распространенность поражения увеличивается, в процесс вовлекаются орбита и головной мозг, после чего вероятность излечения невелика [5].

Оптимальный вариант антифунгальной терапии не определен. Обычно в начале используют вориконазол или липидный амфотерицин В, в качестве альтернативы — каспофунгин и амфотерицин В, а после стабилизации состояния больного — итраконазол. При неэффективности начального лечения используют сочетание вориконазола и липосомального амфотерицина В или вориконазола и каспофунгина. Продолжительность применения антимикотиков зависит от клинической ситуации и обычно превышает 3 мес. При подостром или хроническом течении аспергиллеза придаточных пазух носа антифунгальную терапию можно начинать с итраконазола.

#### **Лечение инвазивного аспергиллеза придаточных пазух носа**

##### *Препараты выбора:*

- вориконазол внутривенно 6 мг/кг каждые 12 ч в первый день, затем внутривенно по 4 мг/кг каждые 12 ч или перорально по 200 мг/сут (масса тела < 40 кг) или 400 мг/сут (масса тела > 40 кг);
- липидный комплекс амфотерицина В по 3–5 мг/кг/сут.

##### *Альтернативные препараты:*

- каспофунгин по 70 мг в первый день, затем по 50 мг/сут;
- амфотерицин В по 1,0–1,5 мг/кг/сут.

*Комбинированная терапия:* сочетания вориконазола и липидного комплекса амфотерицина В или вориконазола и каспофунгина.

У клинически стабильных больных или при хроническом течении заболевания: итраконазол раствор для перорального приема по 600 мг/сут — 4 дня, затем по 400 мг/сут.

##### *Хирургическое лечение.*

*Устранение или снижение* выраженности факторов риска.

Кроме антифунгальной терапии показано хирургическое удаление некротизированных тканей, хотя радикальное хирургическое вмешательство может сопровождаться тяжелыми осложнениями и не приводит к повышению общей эффективности лечения [2].

**Аспергиллез головного мозга.** Церебральный аспергиллез обычно является проявлением диссеминированного заболевания, характеризуется неспецифическими симптомами, поздней диагностикой и высокой летальностью. Кроме того, postponение антимикотиков в очаг поражения часто затруднено в связи с низкой пенетрацией некоторых препаратов через гематоэнцефалический барьер и окклюзией сосудов ангиоинвазивными *Aspergillus spp.*

При лечении аспергиллеза ЦНС необходимо учитывать особенности фармакокинетики антимикотиков. Амфотерицин В плохо проникает в СМЖ и ткань головного мозга. Липосомальный амфотерицин В плохо проникает в СМЖ, но при использовании в больших дозах может создавать высокие концентрации в ткани головного мозга. Липофильный итраконазол и высокомолекулярный каспофунгин плохо проникают в СМЖ, но создают высокие концентрации в тканях головного мозга. Только вориконазол создает высокие концентрации как в СМЖ, так и в тканях головного мозга.

При исследовании применения вориконазола при аспергиллезе ЦНС его эффективность зависела от основного заболевания и варьировала от 16% у реципиентов алло-ТКСК до 54% у больных гемобластозами.

Препаратом выбора является вориконазол, альтернативными — липосомальный амфотерицин В в высоких дозах и каспофунгин. При неэффективности вориконазола используют сочетания вориконазола и липосомального амфотерицина В или вориконазола и каспофунгина. Итраконазол назначают после стабилизации состояния больных. Лечение продолжают до стойкой стабилизации неврологического статуса и размеров очагов поражения на КТ или МРТ головного мозга (отсутствия редукции размеров очагов в течение 3 мес терапии). Обычная продолжительность антифунгальной терапии — не менее 6–12 мес.

#### **Лечение аспергиллеза головного мозга**

##### *Препарат выбора:*

- вориконазол внутривенно по 6 мг/кг каждые 12 ч в первый день, затем внутривенно по 4 мг/кг каждые 12 ч или перорально по 200 мг/сут (масса тела < 40 кг) или 400 мг/сут (масса тела > 40 кг).

##### *Альтернативные препараты:*

- липосомальный амфотерицин В по 5–15 мг/кг/сут;
- каспофунгин по 70 мг в первый день, затем по 50 мг/сут.

*Комбинированная терапия:* сочетания вориконазола и липосомального амфотерицина В или вориконазола и каспофунгина.

Итраконазол раствор для перорального приема по 800 мг/сут — после стабилизации состояния больного.

*Хирургическое лечение.*

*Устранение или снижение* выраженности факторов риска.

Открытое или стереотаксическое хирургическое вмешательство с удалением очага поражения или дренированием абсцесса является важным компонентом успешного лечения аспергиллеза ЦНС. Вместе с тем возможность его проведения определяется тяжестью состояния больного, количеством и локализацией очагов поражения и др. [11, 17, 25, 33].

**Аспергиллезный остеомиелит.** Важным условием успешного лечения является хирургическое удаление пораженных тканей. Кроме того, хирургическое вмешательство позволяет верифицировать диагноз.

#### **Лечение аспергиллезного остеомиелита**

*Препарат выбора:*

- итраконазол раствор для перорального приема по 400 мг/сут — в течение 6–18 мес.

*Альтернативные препараты:*

- амфотерицин В по 0,8–1,0 мг/кг/сут в течение 2–4 нед, затем по 0,5 мг/кг/сут или по 1 мг/кг через день.

*Хирургическое лечение.*

*Устранение или снижение* выраженности факторов риска.

Препаратом выбора для антифунгальной терапии аспергиллезного остеомиелита является итраконазол, концентрация которого в костях в 2–3 раза выше концентрации в плазме. Амфотерицин В не так хорошо проникает в кости, его применяют как альтернативный препарат. Роль новых антимикотиков (вориконазол, каспофунгин) и липидных амфотерицинов В в лечении аспергиллезного остеомиелита недостаточно определена. Антифунгальная терапия должна быть длительной, обычно ее продолжительность составляет от 6 до 18 мес [2].

У реципиентов алло-ТКСК эффективность лечения ИА остается неудовлетворительной. При использовании амфотерицина В общая летальность составляет 90%, при продолжительности лечения более 2 нед — 77%. По другим данным, при использовании амфотерицина В выживаемость в течение 1 года у реципиентов алло-ТКСК с ИА составила 7%, без аспергиллеза — 54%. Прогностическими факторами летального исхода являются прогрессирующая РТПХ, а также применение высоких доз стероидов (преднизолон  $\geq 2,0$  мг/кг/сут) и выраженная моноцитопения ( $\leq 0,12 \times 10^9$ /л) во время выявления аспергиллеза. Применение амфотерицина В в качестве монотерапии у этих пациентов не рекомендуют. Показано назначение вориконазола, при его неэффективности в течение 4–7 сут — комбинированная терапия. Применение антимикотиков следует продолжать до завершения выраженной иммуносупрессии, т.е. до купирования прогрессирующей РТПХ, прекращения использования высоких доз стероидов и пр. [11–13, 26].

Важными условиями снижения летальности от ИА являются эмпирическая и превентивная антифунгальная терапия, а также первичная и вторичная антифунгальная профилактика.

Эмпирическую антифунгальную терапию проводят больным с высоким риском развития ИА и предполагаемыми его клиническими признаками до получения лабораторного подтверждения. В настоящее время установлена эффективность эмпирической антифунгальной терапии у пациентов с рефрактерной к антибиотикам фебрильной

нейтропенией. У других категорий больных эффективность данного применения антимикотиков не определена. При принятии решения об эмпирическом назначении антимикотиков важное значение имеет определение риска развития инвазивного микоза (см. табл. 1). Необходимо отметить, что неоправданное эмпирическое применение антимикотиков в группах с низким риском инвазивных микозов может сопровождаться побочными эффектами и лекарственными взаимодействиями, а также повышает стоимость лечения и способствует селекции рефрактерных к противогрибковым препаратам возбудителей [34].

У больных с нейтропенией показанием к проведению эмпирической антифунгальной терапии является сочетание агранулоцитоза (количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови менее  $0,5 \times 10^9$ /л) и рефрактерной к адекватной терапии антибиотиками широкого спектра действия лихорадки неясной этиологии продолжительностью более 4 сут [35].

В настоящее время препаратом для эмпирической антифунгальной терапии при фебрильной нейтропении является каспофунгин. В крупном рандомизированном двойном слепом многоцентровом исследовании каспофунгин превосходил липосомальный амфотерицин В по эффективности лечения микозов, развившихся до начала терапии (52% против 26%,  $p=0,04$ ), по переносимости, в том числе по частоте связанного с токсичностью прекращения лечения (10,3% против 14,5%,  $p=0,03$ ), а также по выживаемости больных (93% против 89%,  $p=0,05$ ) [36].

#### **Эмпирическая антифунгальная терапия у больных с нейтропенией**

*Препарат выбора:*

- каспофунгин по 70 мг в первый день, затем по 50 мг/сут.

*Альтернативные препараты:*

- вориконазол внутривенно 6 мг/кг каждые 12 ч в первый день, затем внутривенно 4 мг/кг каждые 12 ч или перорально 200 мг/сут (масса тела < 40 кг) или 400 мг/сут (масса тела > 40 кг);

- амфотерицин В 0,6–0,7 мг/кг/сут;

- липосомальный амфотерицин В 1–3 мг/кг/сут.

Продолжительность эмпирической антифунгальной терапии должна составлять не менее 7 дней после нормализации температуры тела, а также до завершения периода нейтропении ( $> 1,0 \times 10^9$ /л) [2, 35].

Превентивную антифунгальную терапию проводят больным с высоким риском развития ИА при выявлении предполагаемых лабораторных и инструментальных признаков (например, аспергиллезного антигена в сыворотке крови и симптома «ореола» на КТ легких) еще до появления клинических признаков (лихорадки, кашля и пр.). Несмотря на то что превентивная антифунгальная терапия активно применяется в различных центрах, ее эффективность не доказана в контролируемых исследованиях. Препарат выбора не определен, обычно используют применяемые в центре схемы лечения ИА. Следует отметить, что неоправданное превентивное применение антимикотиков в группах с низким риском инвазивных микозов может сопровождаться побочными эффектами и лекарственными взаимодействиями, повышает стоимость лечения и способствует селекции рефрактерных к противогрибковым препаратам возбудителей [11].

Превентивную антифунгальную терапию продолжают до исчезновения лабораторных и инструментальных признаков аспергиллеза, а также до завершения периода высокого риска развития аспергиллеза, например, агранулоцитоза.

### Профилактика рецидива

Основными методами предотвращения развития рецидива ИА при продолжении цитостатической или иммуносупрессивной терапии, проведении ТКСК или сохранении выраженной иммуносупрессии являются применение антимикотиков и хирургическое удаление очагов поражения.

У гематологических и онкологических больных профилактику рецидива следует проводить после достижения ремиссии при каждом последующем курсе цитостатической терапии, сопровождающейся нейтропенией или выраженной иммуносупрессией. Обычно используют вориконазол, итраконазол или амфотерицин В. Применение азолов начинают после завершения применения цитостатиков, амфотерицина В — при развитии нейтропении. Лечение продолжают до завершения нейтропении ( $> 1,0 \times 10^9/\text{л}$ ) или выраженной иммуносупрессии. Если прогнозируется длительная нейтропения, используют Г-КСФ (филграстим, ленограстим) или ГМ-КСФ (молграмостим). В период высокого риска целесообразно проводить регулярное, 2 раза в неделю, определение галактоманна в сыворотке крови. При положительном тесте проводят полное обследование, в том числе КТ легких, с последующей модификацией антифунгальной терапии [2, 19].

Успешная ТКСК у больных, перенесших ИА, возможна только при профилактическом применении антимикотиков. Частота рецидива ИА без адекватной антифунгальной профилактики составляет более 50%. Кроме того, перед ТКСК показано хирургическое удаление одиночных очагов инфекции. Основными препаратами являются вориконазол и раствор итраконазола для перорального приема. Амфотерицин В обычно применяют в период нейтропении, длительное его использование затруднительно в связи с нефротоксичностью. При алло-ТКСК продолжительность вторичной профилактики зависит от выраженности РТПХ, применения стероидов и иммуносупрессоров, наличия цитомегаловирусной инфекции и т.п., обычно она составляет от 4 до 12 мес. В период высокого риска целесообразно проводить регулярное, 2 раза в неделю, определение галактоманна в сыворотке крови [2].

### Профилактика рецидива:

- вориконазол внутривенно 6 мг/кг каждые 12 ч в первый день, затем внутривенно по 4 мг/кг каждые 12 ч или перорально по 200 мг/сут (масса тела  $< 40$  кг) или 400 мг/сут (масса тела  $> 40$  кг);
- каспофунгин по 70 мг в первый день, затем по 50 мг/сут;
- амфотерицин В по 1,0 мг/кг через день;
- итраконазол раствор для перорального приема по 5–7 мг/кг/сут;

- при длительной нейтропении: Г-КСФ (филграстим, ленограстим) или ГМ-КСФ (молграмостим);
- хирургическое удаление одиночных очагов поражения.

**Первичная профилактика.** Важным компонентом первичной профилактики ИА у больных с длительной нейтропенией и реципиентов алло-ТКСК является предотвращение контакта с возбудителем (использование палат с НЕРА-фильтрами, обследование больничных помещений и системы вентиляции с последующим устранением источников возбудителя, изоляция больных с факторами риска в период косметического ремонта и пр.). Однако эффективность этих мероприятий может быть недостаточной в связи с предшествующей госпитализации колонизацией дыхательных путей больного *Aspergillus spp.* Кроме того, для реципиентов алло-ТКСК характерно позднее, через 3–6 мес после трансплантации, развитие ИА, и предотвращение контакта с возбудителем для таких больных весьма затруднительно [7, 9].

Применение антимикотиков для первичной профилактики ИА продолжают интенсивно изучать. В настоящее время установлена эффективность первичной антифунгальной профилактики лишь для некоторых категорий больных с высоким риском развития ИА: пациентов с длительной нейтропенией (например, при индукции ремиссии ОМЛ), реципиентов алло-ТКСК и трансплантатов легких, а также больных хронической гранулематозной болезнью. Для других категорий пациентов эффективные методы первичной антифунгальной профилактики ИА не разработаны. Профилактическое применение полиенов (пероральное — амфотерицин В, нистатина, внутривенное — амфотерицин В, ингаляционное — обычного и липидного амфотерицина В) у больных с нейтропенией и реципиентов алло-ТКСК неэффективно [2, 35].

Применение раствора итраконазола для перорального приема по 5–7 мг/кг/сут снижает частоту развития ИА и атрибутивную летальность у больных с нейтропенией и реципиентов алло-ТКСК, однако частые нежелательные явления и лекарственные взаимодействия затрудняют длительное использование этого препарата. Продолжительность применения итраконазола у больных с нейтропенией определяется длительностью миелосупрессии. Для реципиентов алло-ТКСК характерно позднее развитие ИА, поэтому продолжительность антифунгальной профилактики должна быть значительно больше, от 3 до 6 мес. В настоящее время проводят исследование эффективности и безопасности применения вориконазола и каспофунгина для первичной профилактики инвазивных микозов у больных с нейтропенией и реципиентов алло-ТКСК [37].

Эффективность применения Г-КСФ (филграстим, ленограстим) или ГМ-КСФ (молграмостим), рекомбинантного гамма-интерферона для первичной профилактики ИА у больных с нейтропенией и реципиентов алло-ТКСК не доказана [11, 32].

## Л и т е р а т у р а

1. Denning D., Kibbler C., Barnes R.A. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet* 2003; 3: 230–40.
2. Stevens D.A., Kan V.L., Judson M.A. et

- al. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 676–709.
3. Масчан А.А. Клиника, диагностика и лечение инвазивного аспергиллеза у детей с онкогематологическими забо-

леванями. Пособие для врачей. М., 2005.

4. Kibbler C.C., Mackenzie D.W.R., Odds F.C. Principles and practice of clinical mycology. Chichester, N Y, John Wiley & Sons; 1996.

5. Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. (eds.) *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone, 2003.
6. Leenders A.C., van Belkum A., Behrendt M. et al. Density and molecular epidemiology of aspergillus in air and relationship outbreaks of aspergillus infection. *Clin Microbiol* 1999;37(6):1752–7.
7. Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Micol* 2005; 43 (Suppl 1): S59–65.
8. Петрова Н.А., Клясова Г.А. Возможные источники аспергиллезной инфекции в гематологической больнице. *Тер арх* 2005;77(7):71–7.
9. Oren I., Haddad N., Finkelstein R., Rowe J.M. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *Am J Hematol* 2001;66(4):257–62.
10. Prentice H.G., Kibbler C.C., Prentice A.G. Toward a targeted, risk based antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110; 273–84.
11. Steinbach W.J., Stevens D.A. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (Suppl 3): S157–87.
12. Cordonnier C., Ribaud P., Herbrecht R. et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 966–3.
13. Marr K.A., Boeckh M., Carter R.A. et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 797–802.
14. Dimopoulos G., Piagnerelli M., Berre J. et al. Disseminated aspergillosis in intensive care patients: an autopsy study. *J. Chemother.* 2003; 15: 71–5.
15. Meersseman W., Vandecasteele S.J., Wilmer A. et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 170: 621–5.
16. Lutz B.D., Jin J., Rinaldi M.G. et al. Outbreak of invasive *Aspergillus* infection in surgical patients, associated with a contaminated air-handling system. *Clin Infect Dis* 2003;37(6):786–93.
17. Schwartz S., Ruhnke M., Ribaud P. et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood* 2005; 106: 2641–5.
18. Catalano L., Picardi M., Anzivino D. et al. Small bowel infarction by *Aspergillus*. *Haematologia* 1997; 82:182–3.
19. Maertens J., Thenissen K., Verhoef G. et al. Galactomannan and computed tomography based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high-risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 2733–41.
20. Самохвалова М.В. Возможности компьютерной томографии в дифференциальной диагностике микотических поражений легких. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. С.-Пб., 2005.
21. Pfeiffer C., Fine J., Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417–27.
22. Yeo S.F., Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465–84.
23. Perfect J.R., Cox G.M., Lee J.Y. et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of *Aspergillosis*. *Clin Infect Dis* 2001;33:1824–33.
24. Herbrecht R., Denning D.W., Patterson T.F. et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347:408–15.
25. Pearson M.M., Rogers D., Cleary J.D., Chapman S.W. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Ann Pharmacother* 2003; 37:420–32.
26. Johnson M.D., MacDougall C., Ostrosky-Zeichner L. et al. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 693–715.
27. Kantoyannis D.P., Hachem R., Lewis R.E. et al. Efficacy and toxicity of caspofungin in combination with liposomal amphotericin B as primary or salvage treatment of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Cancer* 2003; 98: 292–9.
28. Letscher-Bru V., Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:513–21.
29. Maertens J., Raad I., Petrikos G. et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory or intolerant to conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1563–71.
30. Aliff T.B., Maslak P.G., Jurcic J.G. et al. Refractory *Aspergillus* pneumonia in patients with acute leukemia: successful therapy with combination caspofungin and liposomal amphotericin B. *Cancer* 2003; 97: 1025–32.
31. Maertens J., Glassmacher A., Herbrecht R. et al. Multicenter, noncomparative study of caspofungin combined with other antifungals in adults with invasive aspergillosis refractory or intolerant to prior therapy: final data. 45th ICAAC, 2005.
32. Segal B.H., Kwon-Chung J., Walsh T.J. et al. Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 507–15.
33. Perfect J.R., Marr K., Walsh T. Voriconazole treatment for less common, emerging or refractory fungal infection. *Clin Infect Dis* 2003;36 1122–31.
34. Wingard J.R. Empirical antifungal therapy in treating febrile neutropenic patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: S38–43.
35. Hughes W.T., Armstrong D., Bodey G.P. et al. 2002 Guidelines for the use of the antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 730–51.
36. Walsh T., Tepler H., Donowitz G.H. et al. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Eng J Med*, 2004; 351: 1391–402.
37. Castagnola E., Machetti M., Bucci B., Viscoli C. Antifungal prophylaxis with azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; (Suppl. 10): S86–95.
38. Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. С.-Пб., Издательский дом СПб МАПО; 2004.
39. Клишко Н.Н. Микозы легких. Пособие для врачей. М., Премьер МТ; 2005.
40. Козлова Я.И., Борзова Ю.В., Васильева Н.В. и др. Возможная этиологическая роль микромицетов — контаминантов жилых и производственных помещений в патогенезе инвазивного аспергиллеза. Описание двух клинических случаев. *Пробл мед микол* 2006;8(1):24–8.
41. Asciglu S., Rex J.H., De Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34:7–14.
42. Johnson L.B., Kauffman C.A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 630–7.

# СОВРЕМЕННАЯ ТАКТИКА ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРИ ИНВАЗИВНОМ БРОНХОЛЕГОЧНОМ АСПЕРГИЛЛЕЗЕ

М.Д. Тер-Ованесов, О.Д. Захаров, Б.Е. Полоцкий, М.А. Волкова, И.Е. Тюрин

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

## MODERN SURGICAL STRATEGY IN THE TREATMENT OF INVASIVE BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS

M.D. Ter-Ovanesov, O.D. Zakharov, B.Ye. Polotsky, M.A. Volkova, I.Ye. Tyurin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*Invasive aspergillosis is one of the most life-threatening complications of treatment of oncohematological diseases. In the literature there is no consensus of treatment options and indications for surgical treatment. The authors have observed 2 cases of invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia. Both patients needed pneumonectomy but the first of them received only conservative therapy because of bad general condition and died of pulmonary hemorrhage. In the second case primary lobectomy and postoperative treatment with caspofungin led to recovery and permitted to continue chemotherapy. Now this patient is in complete remission of acute myeloid leukemia.*

**Key words:** acute myeloid leukemia, aspergillosis, surgical treatment.

**A**спергилл *Aspergillus spp.* — это широко распространенный, практически вездесущий гриб, впервые описанный итальянским ботаником Michelli в 1729 г. На сегодняшний день выделено уже более 200 его подвидов.

*Aspergillus* обитает во всех уголках мира, однако наиболее широко распространен в местах с высокими среднегодовыми температурами в зонах, где почвы содержат перегной и вегетирующие микроорганизмы.

Впервые бронхолегочный аспергиллез (БЛА) у человека был описан в 1842 г. английским патологом J.H. Bennett [1]. Патофизиологические аспекты данной проблемы были представлены лишь десятилетие спустя великим немецким исследователем Р. Вирховом [2]. Однако от момента первых исследований до случая хирургического излечения, когда В. Gerstl и соавт. [3] впервые выполнили успешную резекцию очага инвазивного аспергиллеза, прошло около 100 лет. С тех пор проблема хирургического лечения легочного аспергиллеза остается малоизученной, а тактика — неопределенной, что, с одной стороны, обусловлено появлением новых противогрибковых препаратов, а с другой — отсутствием четких общепринятых показаний к хирургическому лечению. Достаточно неопределенным остается и оптимальный объем хирургического вмешательства, а также его этапность в случаях двустороннего поражения.

### Клиническое течение

В норме у здоровых индивидуумов грибковая инвазия не сопровождается клиническими проявлениями, а штаммы *Aspergillus spp.*, как правило, непатогенны и являются сапрофитами. Однако у иммунокомпрометированных пациентов при наличии хронических заболеваний, после проведения курсов химиотерапии, трансплантации органов и стволовых кровяных клеток, а также на фоне длительного приема глюкокортикоидов может развиваться клиническая картина грибковой инвазии. В этих случаях наиболее часто выделяемым возбудителем является *A. fumigatus*, вторым по частоте — *A. flavus*. Заболевание характеризуется крайне тяжелым течением и высокими показателями летальности. Так, по данным D.W. Denning [4], на 1223 случая БЛА летальность составила 86%, что определяется сочетанием неблагоприятных факторов, и в первую очередь — характером основного заболевания в сочетании с особенностями проводимой терапии.

Аспергиллез может протекать в различных клинических формах, что определяется как вирулентными свойствами самого возбудителя, так и реактивностью организма хозяина. Наиболее характерными формами течения заболевания могут быть следующие, выделенные еще в 1970 г. J.R. Belcher и N.S. Plummer [5]:

- аллергическая форма с развитием мигрирующих инфильтратов и бронхообструктивного синдрома;
- неосложненный периферический аспергиллез;
- инвазивный (деструктивный) БЛА.

Критерием морфологической диагностики является выделение колониеобразующих структур гриба с наличием спор, формирующих разветвленную структуру (гифы).

В клинических условиях основным путем распространения спор возбудителя являются вентиляционные системы внутри помещений. Споры могут быть обнаружены в зонах с наибольшей опасностью заражения ослабленных пациентов, получающих высокодозную химиотерапию или находящихся в отделениях трансплантации. Споры аспергиллы имеют размер от 2,5 до 3 мкм, что позволяет им распространяться через систему вентиляционных фильтров и достигать мельчайших альвеол, где и происходит развитие очагов оппортунистической инфекции. Помимо легких очаги аспергиллеза могут поражать головной мозг, мягкие ткани и кожу, сердце, почки, печень и другие паренхиматозные органы.

Основным фактором риска развития аспергиллезной инфекции является пролонгированный период нейтропении, чаще всего сопровождающий проведение трансплантации костного мозга, повторные курсы химиотерапии. По данным S.I. Gerson и соавт. [6], при периоде нейтропении более 34 дней частота развития аспергиллеза превышает 86%. Кроме того, наиболее часто аспергиллез может развиваться в очагах хронического воспаления (при хронических неспецифических заболеваниях легких с развитием бронхоэктазов), очагах туберкулеза, инфильтративного саркоидоза легких, а также в очагах гранулематозного воспаления.

### Классификация

На сегодняшний день с учетом предложенной в 1952 г. классификации K.F.W. Hinson [7] выделяют 3 различных типа БЛА.

- Аллергическая форма развивается у пациентов с предрасполагающей бронхиальной астмой, сопровождается

эозинофилией, интермиттирующими легочными инфильтратами, немедленным вариантом гиперчувствительности к аспергиллезным антигенам. Этот вариант редко является показанием к проведению хирургического лечения.

- Второй тип аспергиллеза характеризуется развитием вторичных изменений в легких. С учетом предложений J.R. Belcher и N.S. Plummer он разделяется на обычный и осложненный. К обычному варианту относятся изолированные аспергилломы, возникающие в неизменной легочной ткани. Они характеризуются развитием тонкостенных кист и не сопровождаются образованием инфильтратов в окружающем легочном поле. Осложненный вариант — возникновение аспергилломы в предсуществующих полостях с наличием перифокального воспаления в легочной ткани. При этом развитие перифокального фиброза с утолщением плевры и формированием спаечного процесса может быть достаточно выраженным, что усложняет хирургическое лечение.

- Инвазивный легочный аспергиллез — наиболее часто встречающийся в группах иммунокомпрометированных пациентов. Именно эти пациенты являются наиболее сложной группой; тактика их лечения до настоящего времени является дилеммой, что определяется характером первичного заболевания, особенностями и течением проводимого лечения, функциональным статусом. Эта подгруппа и является основным предметом обсуждения в настоящей публикации.

### Диагностика

Наиболее значимый метод диагностики — выделение типичной культуры *Aspergillus spp.* для цитологического исследования. Одним из стандартных методов получения материала для цитологического исследования является выполнение бронхиолоальвеолярного лаважа (БАЛ), позволяющего получить смывы из бронхиального дерева. Однако частота получения материала недостаточно высока — от 22 до 50% [8, 9]. Следует подчеркнуть, что автономное выделение культуры гриба при выполнении БАЛ либо браш-биопсии из бронхиального дерева не может являться достоверным критерием диагностики, поскольку аспергиллы часто обнаруживаются на неизмененной слизистой бронхиального дерева у здоровых людей. Как правило, у пациентов отмечается характерная рентгенологическая картина, заключающаяся в наличии фокусов затемнения в легочной ткани с полостями распада, кистами, содержащими жидкость. Зачастую при выполнении КТ-исследования отмечается появление классических «грибковых полостей или шариков», характеризующихся развитием распада легочной ткани [10, 11].

Таким образом, наличие у пациента характерной клинической триады в виде нейтропении, типичных изменений в легочной ткани при рентгенологическом исследовании (рентгеновская томография, КТ и МРТ), а также наличие цитологически подтвержденного мицелия гриба и разветвленной структуры гифы является достаточным для постановки диагноза инвазивного аспергиллеза.

Положительные данные серологического исследования, выявляющие антигены аспергиллы, также являются достаточно важным фактором в постановке диагноза, но, однако, не имеют самостоятельного значения без соответствующей клинико-рентгенологической картины.

На сегодняшний день также отработаны критерии постановки диагноза на основании КТ-исследования [12–14]. К ним относится наличие «ореола», окружаю-

щего зоны инфильтрации легочной ткани. Патологическое наличие «ореола» свидетельствует об инфильтративном характере роста гриба в окружающей легочную ткань с развитием кровоизлияний. Это является отражением локально деструктивного характера роста с поражением сосудов легких и развитием аррозивных кровоизлияний в паренхиме.

Помимо исследования материала БАЛ цитологическое подтверждение может быть получено двумя другими путями. Возможно выполнение цитологического исследования мокроты (при ее наличии), что наиболее часто позволяет выявить возбудитель в случаях осложненного течения при исходном воспалении в бронхиальном дереве. В случаях расположения аспергиллом в периферических отделах паренхимы при условии предлежания к грудной стенке показана трансторакальная тонкоигольная аспирационная биопсия.

### Тактика и возможности хирургического лечения

Наиболее частыми клиническими симптомами БАЛ, по данным I. Pidhorecky [15], являются кашель (54%), лихорадка с подъемами температуры выше 39°C (54%), кровохарканье (30%), одышка (8%). Бессимптомно протекает лишь около 23% случаев.

Как уже отмечалось, поражение легких характеризуется деструктивным ростом с развитием аррозии легочных сосудов [16]. Кровохарканье является поэтому наиболее грозным симптомом, определяющим необходимость активной хирургической тактики. И если в начале 1980-х годов J. Jewkes и соавт. [17] не рекомендовали хирургическое лечение у пациентов с отдельными небольшими эпизодами кровохарканья, то к концу 1990-х кровохарканье, особенно в случаях рецидива либо при тотально окрашенной мокроте, стало рассматриваться как показание для выполнения хирургического лечения в экстренном порядке. По данным литературы, частота кровохарканья как прямого показания к выполнению хирургического лечения составляет 70–80% [18–21].

До проведения хирургического лечения пациент должен находиться на полном постельном режиме, получать противокашлевые препараты и ингаляции увлажненного кислорода.

Другим показанием к выполнению хирургического лечения является низкая эффективность интенсивной противогрибковой терапии (амфотерицин В 1 мг/кг/сут внутривенно либо итраконазол, вориконазол или каспифунгин в адекватных дозах) в течение 14 дней при обнаружении остаточных инфильтратов в легких [22]. При проведении терапии до 13 дней без хирургического лечения последующая летальность на фоне рецидивирующего легочного кровотечения составляет более 96% (выжил лишь 1 пациент из 84), тогда как при проведении терапии более 14 дней частота объективного ответа превышала 75% [22]. Однако в целом консервативная терапия, даже проводимая современными препаратами, характеризуется достаточно низкой эффективностью, не превышающей 50%.

Еще одним показанием к проведению хирургического лечения является наличие инфицированной мокроты при динамическом цитологическом мониторинге на фоне проводимой интенсивной противогрибковой терапии. Это определяется высоким риском контаминации здоровой легочной паренхимы, особенно у пациентов с необходимостью продолжения дальнейшей противоопухолевой терапии.

К другим показаниям относятся наличие бронхоэктазов, инфицированных аспергиллой, грибковая эмпиема плевры, бронхоплевральная фистула, рецидивирующая пневмоторакс либо внутрилегочный абсцесс с эпизодами кровохарканья.

При наличии массивного жизнеугрожающего кровохарканья показано экстренное выполнение ригидной бронхоскопии с целью обтурации бронха в зоне кровотечения для локализации источника кровотечения и профилактики аспирации в непораженные отделы легких. Также возможно выполнение ангиографической эмболизации соответствующей бронхиальной артерии [23] у пациентов с противопоказанием к радикальному хирургическому лечению.

С течением времени происходила эволюция стандартов хирургического лечения БЛА. Однако остается довольно много противоречий по поводу показаний для выполнения хирургического лечения, а также времени его выполнения, особенно при проведении консервативной противогрибковой терапии современными препаратами. Во многом это определяется крайне высоким уровнем послеоперационных осложнений, встречающихся после хирургического лечения по поводу БЛА, частота которых колеблется от 33 до 78% и определяется совокупностью предоперационных факторов риска в сочетании с особенностями проводимого лечения. По данным [24], значимыми факторами риска являются наличие предоперационной иммуносупрессии, особенно в сочетании со снижением массы тела более чем на 10% за короткий период.

По частоте развития послеоперационных осложнений все вмешательства разделяются на операции с низким и высоким риском послеоперационной летальности [25]. Характер риска во многом определяется объемом и травматичностью вмешательства на легком.

К группе операций с низким риском относятся резекции легкого в пределах одной доли:

- краевая или клиновидная резекция;
- сегментэктомия;
- лобэктомия.

К операциям с высоким риском послеоперационных осложнений и летальности относятся вмешательства с необходимостью выполнения пневмонэктомии или плевропневмонэктомии.

Достаточно иллюстративными являются два наблюдения пациентов с острым лейкозом, осложнившимся развитием деструктивного БЛА. В обоих случаях БЛА характеризовался кровохарканьем, однако сочетание факторов риска, распространенность поражения легочной ткани, а главное, тактика лечения определили разный исход заболевания.

**Больная З.**, 51 года, наблюдалась в отделении гематологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН по поводу острого миеломонобластного лейкоза (M4-вариант по ФАБ-классификации). В клинике проведен индукционный курс полихимиотерапии по стандартной программе 3+7+7 с включением идарубицина, этопозиды и цитарабина, достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия. На 15-е сутки перерыва после проведенного лечения отмечено повышение температуры тела до 38,5°C, появление кашля с обильной гнойной мокротой. Несмотря на проводимую интенсивную антибактериальную терапию с использованием карбопенемов, ванкомицина с антифунгальной терапией амфотерицином В в дозе 0,8 мг/кг ежедневно, лихорадка и кашель сохранялись.

По данным КТ грудной клетки, в средней доле правого легкого выявлено массивное инфильтративное уплотнение с обширной полостью распада с неровными, бугристыми внутренними контурами, содержащей незначительное количество жидкости и сообщающейся с просветами сегментарных и субсегментарных бронхов. Кроме того, определялись множественные более мелкие очаги поражения ткани обоих легких. Рентгенологическая картина более всего соответствовала грибковому поражению (аспергиллез).

Попытки верифицировать диагноз оказались безуспешными. При микробиологическом исследовании мокроты получен рост стафилококка и грибов рода *Candida*. Трехкратное исследование крови на галактоманнан дало отрицательный результат (индекс < 0,5), что можно объяснить непрерывной противогрибковой терапией.

В связи с неэффективностью лечения больной начата терапия каспофунгином (Кансидас®) по 50 мг/сут с нагрузочной дозой 70 мг в 1-й день лечения. Отмечены улучшение состояния, нормализация температуры тела, уменьшение количества мокроты. Однако через 9 сут после назначения препарата у больной отмечено кровохарканье, купировавшееся на фоне проведения гемостатической и противокашлевой терапии. Через сутки — рецидив кровохарканья в виде тотально окрашенного плевка (гемоптоз) с одномоментным выделением около 100 мл алой крови. Продолжена интенсивная гемостатическая терапия с временным эффектом. В связи с тяжелым функциональным состоянием, выраженной дыхательной недостаточностью смешанного генеза, крайне высоким риском вмешательства (с учетом необходимости выполнения пневмонэктомии) консилиум с участием торакальных хирургов, гематологов, реаниматологов от хирургического лечения рекомендовал воздержаться и продолжить консервативную терапию, динамическое наблюдение. Через сутки, несмотря на полный постельный режим, проведение противокашлевой и гемостатической терапии, на фоне интенсивной антибиотико- и противогрибковой терапии у больной произошло профузное легочное кровотечение с мгновенным фатальным исходом. При микробиологическом исследовании аутопсийного материала (участок распада в правом легком) получен рост *Aspergillus spp.*

Другие результаты были получены при выполнении экстренного хирургического вмешательства у пациента с высоким риском рецидива легочного кровотечения даже при отсутствии микробиологического подтверждения диагноза. В этом случае тактика лечения в большей степени определяется клинической картиной этого грозного осложнения в сочетании с риском рецидива кровохарканья и профузного легочного кровотечения при наличии данных КТ о развитии БЛА.

**Больной К.**, 31 года, наблюдается в клинике с февраля 2005 г. с диагнозом: острый миеломонобластный лейкоз (M4-вариант по ФАБ-классификации). В период с февраля по сентябрь больному проведено 5 курсов полхимиотерапии с включением цитарабина в стандартных и высоких дозах, идарубицина и этопозиды, причем последний курс лечения завершен в августе. Достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия.

На 24-е сутки перерыва на фоне полностью восстановившихся показателей крови больной отметил резкое ухудшение состояния, появление лихорадки до 38,5°C, боли в правой половине грудной клетки при вдохе, сухого кашля. По рентгенологическим данным выявлена правосторонняя верхнедолевая пневмония. Начата массивная антибактериаль-

ная терапия: тиенам по 2 г/сут и флуконазол, на фоне которой наблюдались некоторое улучшение состояния, снижение температуры тела до субфебрильных значений. Однако через некоторое время вновь отмечены лихорадка и усиление кашля, в связи с чем на 8-е сутки флуконазол заменен на амфотерицин В в дозе 0,8 мг/кг. При контрольной рентгенографии грудной клетки, произведенной на 9-е сутки терапии, выявлена отрицательная динамика в виде нарастания инфильтративных изменений в верхней доле правого легкого и появления распада в центре инфильтрата. Произведена КТ грудной клетки, в верхней доле правого легкого выявлен округлой формы фокус инфильтративного уплотнения 5,0 × 4,4 × 6,0 см с полостью деструкции до 3 см и окружающим его участком инфильтрации до 8,0 × 6,0 см. Кроме того, во всех отделах обоих легких описывались множественные мелкие очаги поражения до 1,0 см в диаметре. Рентгенологическая картина соответствовала грибковому поражению легких. Снимки консультированы фтизиатром, туберкулезный характер поражения легочной ткани исключен.

Больному продолжили лечение амфотерицином В в дозе 0,8 мг/кг через день, что сопровождалось повышением уровня креатинина до 160 мкмоль/л. На фоне проводимого лечения отмечена незначительная положительная динамика в виде уменьшения болей в грудной клетке, снижения температуры до субфебрильных значений. Производился дальнейший диагностический поиск. При исследовании материала БАЛ патологические микроорганизмы не обнаружены. Исследование крови на галактоманнан отрицательное (0,26).

При контрольной КТ грудной клетки выявлена незначительная положительная динамика в виде некоторого уменьшения инфильтративных изменений в верхней доле правого легкого. Рентгенологически установлен диагноз аспергиллеза легкого.

В связи с недостаточным терапевтическим эффектом, а также нарастанием явлений почечной недостаточности на 40-е сутки лечения начата терапия каспифунгином по 50 мг/сут с нагрузочной дозой в 1-й день 70 мг. Через 7 дней после начала терапии отмечены нормализация температуры тела, исчезновение болей в груди, однако на 10-е сутки у больного отмечено появление кровохарканья. Проведен консилиум с участием торакальных хирургов. Учитывая появление кровохарканья,

наличие полости деструкции в ткани легкого и высокий риск развития профузного кровотечения, пациенту показано выполнение экстренного хирургического вмешательства по витальным показаниям.

31.10.05 произведена верхняя лобэктомия справа. На операции при ревизии задний сегмент верхней доли интимо спаян с грудной стенкой по ходу межреберья с утолщением париетальной плевры — зона спаяния выделена экстраплеврально с резекцией мягких тканей грудной стенки. В остальных отделах плевральной полости спаечного процесса, очагов аспергиллеза, плеврита не выявлено. В заднем сегменте верхней доли правого легкого обнаружен плотный, бугристый узел 6,0 × 5,0 см (аспергиллома; см. рисунок), распространяющийся по ходу междолевой борозды в сторону верхнедолевого бронха. Плевра над узлом инфильтративно изменена, тусклая, с наложениями фибрина. Учитывая распространенность процесса, вовлечение субсегментарных бронхов, решено выполнить верхнюю лобэктомию.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Продолжалась противогрибковая терапия каспифунгином (суммарная длительность 21 день). При гистологическом исследовании операционного материала в ткани легкого выявлено разрастание мицелия гриба. При контрольном обследовании через 1 мес после окончания противогрибковой терапии воспалительных изменений в легких нет.

В связи с рецидивом острого лейкоза пациенту через 2 мес после окончания противогрибкового лечения возобновлена химиотерапия и во второй полной ремиссии проведена аллогенная трансплантация костного мозга от полностью совместимого донора — сиблинга. Рецидива аспергиллеза не было.

Таким образом, успешное комбинированное лечение легочного аспергиллеза с применением лекарственного и хирургического методов позволило излечить пациента от инфильтративного аспергиллеза легких и продолжить проведение специфической противоопухолевой терапии.

В целом эти два наблюдения позволяют отметить, что даже при проведении интенсивной противогрибковой терапии современными препаратами фактор своевременного выполнения хирургического вмешательства сложно переоценить. Наличие у пациента клинико-рентгенологического диагноза инвазивного БАЛ в сочетании с развитием кровохарканья, особенно рецидивирующего, является показанием к экстренному вмешательству. Попытки продолжения консервативной терапии чреваты развитием профузного легочного кровотечения с мгновенным фатальным исходом, что необходимо помнить при определении тактики лечения.

### Заключение

БАЛ является крайне сложной с тактической точки зрения нозологией, что во многом определяется контингентом больных и характером ранее проводимого лечения. Комплекс этих проблем усложняет процедуру принятия решения о возможности хирургического лечения, а также тактику периоперационной сопроводительной терапии. Несмотря на появление новых противогрибковых препаратов, консервативная терапия все еще остается малоэффективной, что определяет высокую частоту рецидивов заболевания, высокую вероятность осложненного течения и соответственно крайне высокую летальность.

За последние 20 лет хирургическая тактика изменилась в сторону увеличения степени агрессивности с расширением показаний к выполнению хирургического лечения. На сегодняшний день наличие у пациента диагно-



Типичная КТ-картина аспергилломы с внутриполостным образованием и полоской газа («нимб») над ним в S2 правого легкого

за инвазивного БЛА в сочетании с кровохарканием, особенно рецидивирующим, является показанием к хирургическому лечению. Частота послеоперационных осложнений и летальность все еще остаются высокими, особенно в группах с рецидивирующим и осложненным те-

чением болезни. Однако стремление к выполнению возможных органосохраняющих вмешательств с последующим проведением противогрибковой терапии позволяет достичь неплохих отдаленных результатов с возможностью проведения дальнейшего специфического лечения.

### Л и т е р а т у р а

- Bennett J.H. On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. *Trans R Soc Edinburg* 1842; 15: 277—86.
- Virchow R. Beitrage zur Lehre von de beim Menschen vorkommenden pflanzlichen Parasiten. *Virchow Arch (B)* 1856; 9: 557—64.
- Gerstl B., Weidman W.H., Newmann A.V. Pulmonary aspergillosis: a report of 2 cases. *Ann Intern Med* 1948; 28: 662—71.
- Denning D.W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 608—15.
- Belcher J.R., Plummer N.S. Surgery in broncho-pulmonary aspergillosis. *Br J Diss Chest* 1970; 54: 335—41.
- Gerson S.I., Talbot G.H., Hurwitz S. et al. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984; 100:345—51.
- Hinson K.F.W., Moon A.J., Plummer N.S. Bronchopulmonary aspergillosis: a review and report of eight new cases. *Thorax* 1952; 7: 317—30.
- Kahn F.W., Jones J.M., Enland D.M. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:518—23.
- von Eiff M., Roos N., Schulten R. et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62:341—7.
- Caillot D., Casasnovas O., Bernard A. et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997; 15:139—47.
- Caillot D., Mannone L., Cuisenier B., Couaillier J.F. Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 2):54—61.
- Hruban R.H., Meziane M.A., Zerhouni E.A. et al. Radiologic-pathologic correlation of the CT halosign in invasive pulmonary aspergillosis. *J Comput Assist Tomogr* 1987; 11:534—6.
- Kuhlman J.E., Fishman E.K., Burch P.A. et al. CT of invasive pulmonary aspergillosis. *AJR* 1988; 150:1015—20.
- Тюрин И.Е. Компьютерная томография органов грудной полости. С.-Пб., 2003. с. 228—30.
- Pidhorecky I., Urschel J., Anderson T. Resection of invasive Pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(4):312—7.
- Pagano L., Ricci P., Nosari A. Fatal haemoptysis in pulmonary filamentous mycosis: an underevaluated cause of death in patients with acute leukaemia in hematological complete remission: a retrospective study and review of literature. *Br J Haematol* 1995; 89: 500—5.
- Jewkes J., Kay P.H., Paneth M., Citron K.M. Pulmonary aspergilloma: analysis of prognosis in relation to hemoptysis and survey of treatment. *Thorax* 1983; 38:572—8.
- Massard G. Role of surgery in the treatment of pulmonary aspergillosis. *Rev Mal Respir* 2005; 22(3):466—72.
- Schulte T., Welcker K., Schatz J., Branscheid D. Surgical treatment of pulmonary aspergilloma. *Mycoses* 2005; 48 (Suppl 1):46—50.
- Yamamoto H., Hayashi K., Tomoyasu H. Surgical treatment for pulmonary mycosis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105(12):737—41.
- Chen F., Aoyama A., Itoi S. et al. Surgical treatment of pulmonary aspergillosis. *Kyobu Geka* 2003; 56(7):519—24.
- Denning D.W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 608—15.
- Hugh C.F., Waugh R., Lindsay D. Surgery for pulmonary aspergilloma: pre-operative embolization of the bronchial circulation. *Thorax* 1986; 41:324—7.
- Daly R.C., Piechler J.M., Payne W.S. Pulmonary aspergilloma. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1986; 92: 981—8.
- Schulte T., Welcker K., Schatz J., Branscheid D. Surgical treatment of pulmonary aspergilloma. *Mycoses* 2005; 48 (Suppl 1):46—50.

# РЕПРОДУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ У ПАЦИЕНТОК С ЛИМФОМОЙ ХОДЖКИНА И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ СОХРАНЕНИЯ

И.В. Пылова<sup>1</sup>, Е.А. Демина<sup>1</sup>, Р.Г. Шмаков<sup>2</sup>, Е.Е. Перилова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; <sup>2</sup>ГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Москва

REPRODUCTIVE FUNCTION IN FEMALES WITH HODGKIN'S LYMPHOMA AND POSSIBILITIES OF ITS PROTECTION.

I.V. Pylova<sup>1</sup>, E.A. Demina<sup>1</sup>, R.G. Shmakov<sup>2</sup>, E.E. Perilova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N.Blokhin Russian Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

<sup>2</sup>Research Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

*The impact of various Hodgkin's lymphoma treatment program on the female reproductive function is discussed. The current Russian and foreign literature on this problem is reviewed. Reproductive function was estimated in 247 females with Hodgkin's lymphoma before and after treatment. The irregular menstrual cycle in untreated group of the females with Hodgkin's lymphoma was significantly more frequent when B-symptoms were present ( $p = 0.0004$ ). Radiotherapy without irradiation of inguinal and iliac areas did not induce amenorrhea irrespective of age, the number of fields and the cumulative local dose per field (as high as 50 Gy). Irradiation of inguinal and iliac areas induced amenorrhea in all females even when low doses (less than 30 Gy) were used. The ABVD treatment program did not result in steady-state ovarian tissue damage. The therapy schedules containing less than 8 g of cyclophosphamide were less toxic to ovarian tissue - amenorrhea occurred only in 10.5% of the women. Treatment by the schedules with doses of cyclophosphamide more than 8 g caused amenorrhea in 26.6% of the patients. A high correlation was found between the incidence of amenorrhea and the patient's age ( $p = 0.0002$ ): in women above 25 years irreversible ovarian tissue damage was revealed in 48.4% of cases.*

**Key words:** Hodgkin's lymphoma, pregnancy, amenorrhea, zoladex.

## Введение

Лимфома Ходжкина (ЛХ) диагностируется у людей всех возрастных групп, включая новорожденных. Заболеваемость ЛХ в экономически развитых странах составляет 24 человека на 1 млн жителей, в России — 2,3 случая на 100 000 населения, что составляет 3500 первичных больных ежегодно.

За последние 50 лет в лечении ЛХ достигнуты успехи, доказавшие возможность излечения большинства больных. С 1970-х годов ЛХ признана потенциально излечимым заболеванием, а за последние 10 лет выживаемость больных ЛХ увеличилась на 11% [1]. С появлением новых более эффективных программ лечения число излечившихся больных возрастает. На сегодняшний день, по данным Rockefeller Foundation Sponsored International Workshop, только в США, Канаде и Европе насчитывается более 300 000 излечившихся от этого заболевания и намного больше выздоровевших в остальных странах мира [2]. Согласно данным эпидемиологических исследований, в отличие от других гемобластозов пик заболеваемости ЛХ приходится на репродуктивный возраст [3]. Почти 50% из всех больных ЛХ составляют женщины, из них 81% — это пациентки в возрасте от 15 до 36 лет, поэтому с каждым годом увеличивается интерес к возможности сохранения у них детородной функции [4].

Без современной противоопухолевой терапии 5-летняя выживаемость при ЛХ не превышает 5%, причем в течение первого года погибает половина больных [5]. Использование М. Peters [6] принципов радикальной лучевой терапии, предложенных R. Gilbert [7] в 1920-х годах, и комбинированной химиотерапии по схеме МОРР (мустарген, онковин, прокарбазин, преднизолон), предложенной V. De Vita [8] в 1960-х годах, показало, что ЛХ является потенциально излечимым заболеванием.

Использование современных программ лечения позволяет достигнуть полной ремиссии у 85–90% больных в целом [9]. Десятилетняя выживаемость, по данным ведущих исследовательских центров мира, составляет 70–90% и более в зависимости от прогностической группы [10].

Успехи, достигнутые в лечении ЛХ, молодой возраст большей части пациентов, хороший прогноз на длительную жизнь и развитие у части из них тяжелых осложнений лечения заставили онкологов и врачей других специальностей обратить внимание на качество жизни (КЖ) больных. Наиболее актуальной проблема КЖ стала в последние десятилетия благодаря значительному увеличению числа излеченных больных молодого возраста [11].

Интерес к исследованию КЖ больных, излеченных от ЛХ, свидетельствует о принципиально новом этапе развития онкологии как науки, которая пытается осмыслить проблемы онкологического больного не только во время проведения лечения, но и после его окончания. Излеченные от ЛХ больные ведут активный образ жизни — учатся, вступают в брак и, конечно же, как и все здоровые люди, хотят иметь детей, что, к сожалению, не всегда оказывается возможным. Повышение КЖ больных ЛХ является столь же важной задачей, как и излечение от самого заболевания.

## Репродуктивное здоровье населения России

В настоящее время одной из главных характеристик демографического развития России является депопуляция, т.е. естественная убыль населения. Превышение уровня смертности над рождаемостью впервые было отмечено в 1992 г., а пика — увеличения показателей в 2 раза — достигло в 2001 г. В итоге за последние 10 лет население страны сократилось на 3,5 млн человек.

В России сложилась ситуация, характеризующаяся резким снижением суммарного коэффициента рождаемости с 2,0 до 1,25, уменьшением доли повторных рождений с 51 до 31%. Депопуляция приобрела уровень национальной проблемы. На этом фоне низкая рождаемость в России стала одним из главных факторов сокращения численности населения. Поэтому в настоящее время репродуктивное здоровье становится важной проблемой общего здоровья населения. Таким образом, сохранение у пациенток с ЛХ беременности, а после лечения заболевания и репродуктивной функции — задача не только гинекологов,

но и онкологов. Однако восстановление фертильности у пациентов с ЛХ после химиолучевого лечения является актуальной и пока не решенной проблемой [12].

### **Физиология репродуктивной системы**

Основной функцией репродуктивной системы является воспроизводство, т.е. продолжение биологического вида. Ведущее место в регуляции функции репродуктивной системы принадлежит гипоталамо-гипофизарной системе, которая определяет состояние и функционирование всей эндокринной системы.

Знание основ нейроэндокринологии позволяет широко применять гормональные и нейротропные препараты при лечении нарушений функции репродуктивной системы центрального генеза, а также осуществлять профилактические меры с целью защиты репродуктивной системы от воздействия химиолучевого лечения [13].

**Фолликулогенез в яичниках.** В яичнике женщины репродуктивного возраста фолликулы находятся на разных стадиях зрелости: примордиальные фолликулы, первичные преантральные фолликулы, вторичные преантральные фолликулы, антральные фолликулы и преовуляторный фолликул.

Рост фолликула от покоящегося примордиального до преовуляторного носит последовательный и непрерывный характер и занимает около 85 сут.

Установлено, что число растущих фолликулов зависит от возраста женщины. Так, в 24–25 лет число растущих фолликулов, покидающих примордиальный пул, составляет около 37 в день, в 34–35 лет — 11, а к 44–45 годам — только 2.

В регуляции функции репродуктивной системы основная роль принадлежит секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (ГРГ) гипоталамусом и регуляции синтеза и выделению гонадотропинов по механизмам отрицательной и положительной обратной связи.

К наиболее важным факторам, приводящим к нарушению репродуктивной системы, относятся: нейроинфекции, тяжелые травмы и оперативные вмешательства, физические и психические перегрузки в период созревания репродуктивной системы (в пубертатном периоде), а также химиолучевое лечение злокачественных заболеваний [13].

### **Репродуктивная функция у пациенток с ЛХ**

И у женщин, и у мужчин, заболевших ЛХ, репродуктивная функция страдает как вследствие самого заболевания, так и в результате лечения [14].

Реальная возможность выздоровления большого контингента молодых больных с ЛХ поставила перед врачами совершенно новую проблему: бесплодие как у мужчин, так и у женщин [5]. Оно является одним из наиболее частых отдаленных последствий специфической терапии ЛХ [15, 16]. У женщин моложе 25 лет, получивших в качестве первичного лечения стандартную полихимиотерапию (ПХТ) с включением алкилирующих препаратов, аменорея возникает в 28% случаев, у женщин старше 25 лет — в 86% и у пациенток старше 40 лет — почти в 100%. Такие закономерности отмечены и при использовании лучевой терапии: облучение пахово-подвздошных областей в дозе более 40–50 Гр вызывает стойкую аменорею у 40% женщин до 20 лет и у 90–95% женщин в возрасте старше 35 лет. Преждевременная яичниковая недостаточность длится от нескольких месяцев до 3 лет у молодых женщин или становится постоянной у большинства пациенток старше 35 лет [17, 18].

Известно, что быстро делящиеся клетки более чувствительны к цитотоксическим агентам (в первую очередь к алкилирующим препаратам), чем клетки в покое. Z. Blumenfeld и соавт. [5] предположили, что ингибирование гормонов гипофиза уменьшит скорость сперматогенеза и тем самым защитит герменогенный эпителий от химиотерапевтического воздействия. К сожалению, по данным литературы, у мужчин этого не удалось достигнуть [19]. У женщин предпринимаются различные попытки сохранения фертильности [20, 21]. Во время химиотерапии наблюдается ускоренная гибель фолликулов яичника, приводящая к первичному повреждению яичников и потере детородной функции. У молодых женщин утрата функции яичников влияет на КЖ, сексуальную сферу и репродуктивную функцию [9, 17].

Развитие первичного повреждения яичников при химиотерапии вызвано ускоренным уменьшением числа первичных фолликулов в яичнике. Как только фолликул входит в фазу развития, он обречен на овуляцию в течение определенного периода. Эту последовательность событий нельзя прервать или задержать в развитии. Предполагается, что под воздействием химиотерапии те фолликулы, которые уже вошли в фазу развития, или те, которые находятся в начальной фазе стимуляции, становятся атретическими (гибнут) [22, 23].

Механизм овариотоксического действия цитотоксических препаратов все еще до конца не выяснен, однако ясно, что риск развития первичного повреждения яичников при химиотерапии прямо зависит от количества первичных фолликулов, находящихся в яичнике и, следовательно, от возраста женщины [17, 24]. Риск развития первичного поражения яичников также зависит от кумулятивной дозы цитотоксических препаратов [9]. Описаны последствия воздействия на ткань яичников таких алкилирующих препаратов, как циклофосфамид, мустарген, лейкеран, прокарбазин, этопозид [17, 23]. При обследовании 84 пациенток с ЛХ и неходжкинскими лимфомами, которые получили 3 курса химиотерапии, оказалось, что у 30 (40,5%) женщин возникла преждевременная яичниковая недостаточность [25]. После терапии, состоящей из 6 циклов МОРР, только у 17 из 44 женщин продолжались регулярные менструации, а у 50% пациенток развилась стойкая аменорея [26].

Германская исследовательская группа по изучению ЛХ (German Hodgkin's Lymphoma Study Group — GHSG) провела клиническое исследование с 1994 по 1998 г. среди 3186 женщин со всеми стадиями ЛХ с целью анализа менструальной функции. Были установлены факторы, влияющие на развитие яичниковой недостаточности после лечения ЛХ: возраст на момент лечения, стадия заболевания, проведение химиотерапии и использование оральных контрацептивов во время лечения. Результаты этого исследования были дополнены в мае 2004 г. Из 405 женщин в возрасте до 40 лет у 89,6% менструальный цикл до начала лечения был регулярным. После проведения 8 курсов по схеме ВЕАСОРР эскалированный у 51,6% наблюдалась стойкая аменорея (период наблюдения 3,2 года). Следует отметить, что аменорея чаще наблюдалась у женщин, получивших 8 циклов ВЕАСОРР эскалированный, чем у тех, кто получал АВВД, СОПР/АВВД или стандартный ВЕАСОРР ( $p=0,0068$ ). Более того, аменорея после терапии наиболее часто встречалась у больных ЛХ при прогрессировании заболевания ( $p<0,0001$ ), у боль-

ных старше 30 лет ( $p=0,0065$ ) и у женщин, которые не принимали оральные контрацептивы на фоне лечения ( $p=0,0002$ ) [27, 28].

Такая же проблема возникает у женщин, которые получили лучевую терапию на пахово-подвздошные области, а иногда и при облучении забрюшинных лимфатических узлов. Повреждение яичников, по данным разных авторов, у женщин моложе 20 лет возникает при суммарной дозе циклофосфана 20–50 г, у женщин от 20 до 35 лет — при дозе циклофосфана 6–8 г, а в возрасте старше 45 лет достаточно 5 г. И в этом случае основными факторами риска являются кумулятивная доза и возраст больной [18].

В связи с этим возникла проблема защиты яичников от повреждающего воздействия химиопрепаратов [29].

При использовании сочетания химиотерапии, особенно комбинаций с алкилирующими агентами, и лучевого лечения у мужчин в 100% случаев возникает азооспермия, а аменорея возникает в 80% случаев у женщин старше 25 лет и в 30% — у женщин моложе 25 лет. Учитывая эти данные, вопрос о разработке новых высокоэффективных, но менее токсичных схем и программ лечения ЛХ остается актуальным [9, 30].

До настоящего времени как зарубежная, так и отечественная литература уделяет недостаточно внимания проблеме бесплодия у больных ЛХ. Сведения, нередко противоречивые, об объективном состоянии репродуктивной функции у обоих полов появились лишь в последние несколько лет.

**Нарушения менструальной функции.** В связи с повреждающим действием химиотерапии и лучевого лечения на репродуктивную систему возникает преждевременная яичниковая недостаточность: дисфункция, аменорея, а также синдром гиперторможения яичников. Торможение гормональной функции яичников применяют с терапевтической целью, используя аналоги ГРГ (золадекс, гозерилин, бусерилин). В клинической картине преждевременной яичниковой недостаточности преобладают вегетативно-сосудистые нарушения (73%) — приливы, потливость, тахикардия, аритмия, боли в сердце, гипертонические кризы, а также обменно-эндокринные (15%) — ожирение, гиперлипидемия, гипергликемия и психоэмоциональные нарушения (12%) — раздражительность, плаксивость, плохой сон, ослабление концентрации внимания, агрессивно-депрессивные состояния [13].

Изменения гормонального гомеостаза вследствие преждевременной яичниковой недостаточности обуславливают выраженные метаболические нарушения: изменение липидного профиля крови приводит к атеросклерозу и сердечно-сосудистым заболеваниям. Активация прокоагулянтного звена гемостаза способствует развитию тромбозов, эмболии и нарушениям микроциркуляции. Наиболее поздним проявлением метаболических нарушений является остеопороз. Обменно-эндокринные нарушения вследствие дефицита эстрогена (урогенитальные атрофические процессы, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз и остеопороз) свидетельствуют о важной биологической роли яичников в любом возрасте женщины [13].

#### **Современные возможности сохранения фертильности**

По мере того как продолжают увеличиваться показатели выживаемости пациентов с ЛХ, защита от ятрогенного бесплодия, вызванного химиотерапией, приобретает все большее значение [5].

Если фолликулы уничтожаются цитотоксическими препаратами, наступает преждевременная яичниковая недостаточность. Когда число первичных фолликулов сокращается до минимума, наблюдается необратимое повреждение яичников [5]. Преждевременное нарушение функции яичников является распространенным последствием химиотерапии и лучевой терапии (когда в зону облучения входят пахово-подвздошные области) [31, 32]. Несмотря на то что повреждения, индуцированные цитотоксическими препаратами, являются обратимыми во многих тканях организма, состоящих из быстро делящихся клеток (таких как костный мозг и желудочно-кишечный тракт), в яичниках эти повреждения часто становятся необратимыми, так как пул зародышевых (герменативных) клеток ограничен с момента внутриутробной жизни [5, 33].

В настоящее время обсуждаются различные терапевтические методы защиты яичников во время проведения химиотерапии. Они включают в себя фармакологические методы, такие как снижение секреции гонадотропинов и, соответственно, цикличности функции яичников при помощи антагонистов или оральных контрацептивов, агонистов ГРГ, а также криоконсервацию ооцитов, эмбрионов или ткани яичника [5, 9, 23].

**Половые стероидные гормоны.** При проведении химиотерапии для защиты яичников назначаются в непрерывном режиме в течение всего периода проведения химиотерапии гормональные препараты, подавляющие овуляцию (КОК — низкодозированные комбинированные оральные контрацептивы) — регулон, новинет, марвелон и др. [9, 17, 29].

В 1981 г. R.M. Chapman и S.B. Sutcliffe [34] показали, что использование комбинаций 50 мг этинилэстрадиола и 2,5 мг норэтистерона ацетата или 250–500 мг левоноргестрела позволяет сохранить функцию яичников во время химиотерапии MVPP. Помимо этого, при биопсии яичников до и после химиотерапии выявили, что число первичных фолликулов не снижается, если принимать гормональные препараты во время проведения химиотерапии. Хотя в это исследование были включены всего несколько женщин, оно до настоящего времени остается единственной клинической работой, в которой гистологическое изучение ткани яичников было выполнено до и после химиотерапии.

Механизм действия КОК реализуется через блокаду эстрогеновых и прогестероновых рецепторов клеток органов-мишеней репродуктивной системы. Следствием этого являются:

- торможение овуляции за счет снижения синтеза и выброса лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, что тормозит рост и созревание доминантного фолликула в яичнике;
- так называемая железистая регрессия — подавление процесса пролиферации и формирования секреторного эндометрия. В эндометрии происходят децидуоподобные изменения, переходящие в атрофические, при которых невозможна имплантация;
- изменение структуры цервикальной слизи — повышается ее вязкость, что затрудняет прохождение сперматозоидов в матку;
- торможение сократительной активности маточных труб.

Побочные эффекты КОК — тошнота, болезненное нагрубание молочных желез, межменструальные кровянистые выделения (обычно прекращаются на втором ме-

саяе приема КОК), утомляемость, увеличение массы тела, повышение аппетита, снижение либидо — проходят после отмены препарата. На фоне приема КОК возможны зуд, жжение, бели, которые эффективно купируются вагинальным введением тержинана [13].

Абсолютными противопоказаниями для КОК являются тромбофлебит, тромбоэмболия, сосудистые заболевания мозга в анамнезе, нарушение функции печени, маточные кровотечения неустановленного генеза [13]. Относительные противопоказания: мигрени, диабет, желтуха во время предыдущих беременностей, желчнокаменная болезнь, холецистит с частыми обострениями, гипертоническая болезнь (развившаяся в возрасте до 35 лет), эпилепсия, миома матки размерами более 6–7 нед беременности, язвенный колит [13].

**Аналоги ГРГ.** Z. Blumenfeld [35, 36] представил данные об эффективной защите яичников аналогами ГРГ во время химиотерапии у молодых женщин [35, 36]. ГРГ синтезируется и выделяется гипоталамусом в пульсовом режиме (1 раз в 90 мин). Он поступает в гипофиз, индуцируя синтез гонадотропинов (лютеинизирующего и фолликулостимулирующих гормонов). Гонадотропины, в свою очередь, стимулируют секрецию половых стероидов в гонадах (эстрогенов и прогестерона). В процессе регуляции участвует гипоталамо-гипофизарно-яичниковая система.

Непрерывное воздействие аналогов ГРГ на рецепторный аппарат гипофиза приводит к связыванию большей части рецепторов и, соответственно, к пиковому выбросу гонадотропинов.

При дальнейшей стимуляции к 7–14-му дню применения аналогов ГРГ происходит исчезновение рецепторов ГРГ, которые не успевают ресинтезироваться, что приводит к длительной блокаде синтеза гонадотропинов в гипофизе и, соответственно, половых стероидов. Эта блокада является обратимой, и после отмены аналогов ГРГ полностью восстанавливается чувствительность аденогипофиза к гипоталамической стимуляции.

Подобно ГРГ синтетические аналоги в I фазе своего действия стимулируют синтез гонадотропинов в гипофизе. Однако при многократном введении синтетические ГРГ вызывают противоположный эффект — ингибирование секреции гонадотропинов и блокаду гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, вследствие чего уровень половых стероидов снижается до постменопаузальных значений.

После подкожного введения постепенное высвобождение препарата обеспечивает постоянную концентрацию действующего вещества в крови в течение 28 дней — надежное снижение синтеза эстрогенов до постменопаузальных значений.

В настоящее время GHSB проводит исследование, в котором анализируется эффективность аналогов ГРГ. В исследование включены женщины репродуктивного возраста (от 18 до 40 лет) неблагоприятной прогностической группы, которым проводится лечение по программе BEACOPP — 8 циклов. Пациенткам предлагают принимать КОК (микрогонон) ежедневно или аналоги ГРГ (гозерелин) ежемесячно на протяжении всей полихимиотерапии с последующим определением уровня фолликулостимулирующего гормона через 6 мес после окончания лечения. Исследование в настоящее время проводится Немецкой исследовательской группой SLE, результаты этих исследований планируется опубликовать в 2006 г. [23].

**Криоконсервация ооцитов, эмбрионов и ткани яичников.** Криоконсервация оплодотворенных ооцитов — процедура, которая широко используется при лечении бесплодия, однако она требует присутствия партнера (мужчины) [16, 37]. Криоконсервация неоплодотворенных ооцитов технически востребована, но на сегодняшний день процент успешного оплодотворения после размораживания низок. Кроме того, все эти процедуры имеют ограниченную эффективность из-за необходимости гормональной стимуляции и низкого числа ооцитов и эмбрионов, пригодных для криоконсервации и дальнейшей трансплантации [38, 39].

Первая криоконсервация ткани яичников была выполнена в начале 1950-х годов, когда D.M.V. Parrot [40] провел экспериментальную трансплантацию замороженной ткани яичников мыши.

В дальнейшем R.G. Gosden и соавт. [41] смогли доказать выживаемость фолликулов после криоконсервации, используя ту же экспериментальную модель. Разнообразные процедуры криоконсервации были использованы K. Oktay, O. Novatta и их коллегами [42]. В 2000 г. K. Oktay и соавт. [43] сообщили о росте фолликулов после подкожной трансплантации ткани яичников и в том же году опубликовали данные о первой ретрансплантации ткани яичника человека с развитием последующей овуляции. После данной трансплантации наблюдались спонтанное созревание фолликулов, восстановление эндокринного статуса [44].

Совсем недавно J. Donnez и соавт. [39] сообщили о первой беременности после ортотопической ретрансплантации криоконсервированной ткани яичника спустя 6 лет после окончания лечения ЛХ. В результате этого произошло рождение здорового ребенка. Хотя концепция криоконсервации ткани яичника с целью защиты детородной функции убедительна, существует ряд нерешенных проблем. Нельзя исключить вероятность наличия опухолевых клеток в биопсийном материале яичника и разрастания опухолевых клеток после ретрансплантации, что может привести к рецидиву заболевания [45].

Наиболее эффективной является криоконсервация оплодотворенной яйцеклетки или эмбриона после оплодотворения *in vitro* до начала химиотерапии. Однако эта альтернатива уместна для замужних женщин и почти не применима для юных и одиноких пациенток. Кроме того, для этой процедуры необходима гормональная стимуляция яичников, что предполагает отсроченное начало химиотерапии, а это часто невозможно при гематологических заболеваниях [19, 46]. В настоящее время имеются предварительные клинические результаты, свидетельствующие о возможности восстановления незрелой яйцеклетки из развивающегося антрального фолликула с целью оплодотворения *in vitro* при помощи инъекции спермы и последующей криоконсервации эмбриона. Этот метод более приемлем, так как не требуется отсрочки в начале проведения специфического лечения, стимуляции яичников и не возникает гиперэстрогенизма, что крайне неблагоприятно для пациенток с эстрогенчувствительными опухолями и аутоиммунными заболеваниями [5, 19].

Таким образом, с помощью криоконсервации ткани яичников или оплодотворенной яйцеклетки возможно сохранение детородной функции у пациенток с ЛХ [16].

Несмотря на использование современных методов защиты яичников на фоне химиотерапии, у части паци-

Таблица 1. СОД и менструальная функция в зависимости от объема лучевой терапии (n=26)

Показатель	«Мантия» (n=3)		
	2 этапа (n=18)	РЛТ	3 этапа (n=5)
Возраст, годы	15–41	18–33	21–36
СОД на лимфатические узлы, Гр:			
выше диафрагмы	50	45	50
ниже диафрагмы	0	44	44
пахово-подвздошные	0	0	28
Менструальная функция после лечения, число больных (%):			
цикл сохранен	3(100)	18(100)	0
аменорея	0	0	5(100)

енток наступает преждевременная менопауза и детородная функция не может быть реализована [47].

Многосторонний анализ лечения большой группы больных ЛХ с позиций современных взглядов и объективная оценка не только объема обследования и лечения, но и состояния репродуктивной системы с целью уменьшения поздних осложнений лечения поможет как увеличить число излечившихся, так и повысить качество их жизни.

В РОНЦ оценка состояния репродуктивной функции до лечения и после его окончания была проведена у 247 женщин, больных ЛХ, у которых имелись сведения о менструальной функции. Все женщины обратились в РОНЦ в период с 1968 по 2005 г., медиана наблюдения составила 55 мес, разброс от 7 до 426 мес (35,5 года). Возраст пациенток составил от 14 до 44 лет, в возрасте до 25 лет было 147 (59,3%) женщин, старше 25 лет – 101 (40,7%) женщина, медиана возраста 24 года. У всех пациенток диагноз ЛХ верифицирован гистологически по биоптату лимфатического узла в патологоанатомическом отделении РОНЦ, всем больным было рекомендовано лечение в соответствии с программами терапии, принятыми в РОНЦ в период их обращения. Все больные были прослежены после окончания лечения не менее 6 мес. У всех больных женщин оценены эффективность первой программы лечения, ее непосредственные и поздние осложнения.

I клиническая стадия установлена у 13 (5,3%), II – у 172 (69,6%), III – у 30 (12,2%), IV – у 32 (12,9%) пациенток. Общее состояние больных оценивали по шкале ECOG-ВОЗ: статус 1–2 был у 240 (97,2%) женщин, 3–4 – у 7 (2,8%). Симптомы интоксикации отсутствовали у 156 (63,2%) женщин и были у 91 (36,8%) пациентки, из них повышение температуры выше 38°C отмечалось у 75 (30,4%), ночные профузные поты – у 50 (20,2%), снижение массы тела на 10% и более – у 39 (15,8%).

Повышение СОЭ до лечения отмечено у 81 (32,8%) больной. К началу лечения анемия ниже 10 г/дл имела у 52 (21,1%) пациенток, лейкоцитоз выше 104 выявлен у 90 (36,4%) больных.

В соответствии с критериями, предложенными GHSg, все 247 женщин были разделены на 3 прогностические группы в соответствии с объемом опухолевой массы: благоприятную, промежуточную, неблагоприятную. Благоприятную прогностическую группу составили 38 (15,4%) больных, промежуточную прогностическую группу – 78 (31,6%), неблагоприятную – 131 (53,0%).

Сведения о менструальной функции до начала лечения ЛХ имелись у 146 (58,9%) женщин, из них до начала лечения регулярность менструального цикла не была на-

рушена у 130 (89,0%; медиана возраста – 24 года), а у 16 (11,0%; медиана возраста – 23 года) менструальная функция была нарушена. Нерегулярный менструальный цикл до начала терапии ЛХ статистически значимо чаще наблюдался у женщин с наличием симптомов интоксикации ( $p=0,004$ ). При проведении корреляционного анализа выявлена четкая зависимость регулярности менструального цикла до начала лечения ЛХ от наличия В-симптомов ( $p=0,0004$ ): уменьшения массы тела более чем на 10% ( $p=0,04$ ), повышения температуры тела выше 38°C ( $p=0,003$ ) и наличия профузных потов ( $p=0,002$ ), а также от числа симптомов интоксикации ( $p=0,04$ ). Нарушение менструальной функции до начала лечения коррелировало с анемией ( $p=0,009$ ) и объемом опухолевой массы ( $p=0,01$ ). Регулярность менструального цикла до начала терапии ЛХ, по данным корреляционного анализа, не зависела от возраста пациенток в дебюте заболевания.

Так как наблюдение за больными проводилось в течение 37 лет, программы лечения за это время изменялись, но виды лечения ЛХ – радикальная лучевая терапия (РЛТ), ПХТ, комбинированное химиолучевое лечение – использовались на протяжении всего этого времени.

Только РЛТ получили 26 (10,5%) больных, химиотерапию – 221, из них только ПХТ – 44 (17,7%) женщины, а комбинированное химиолучевое лечение – 177 (71,8%) пациенток.

Из 26 пациенток, получивших РЛТ, 3 этапа РЛТ (облучались все лимфатические коллекторы, включая пахово-подвздошные области) получили 5 (19,2%), 2 этапа РЛТ (в облучение включены лимфатические коллекторы выше и ниже уровня диафрагмы, но без облучения пахово-подвздошных областей) – 18 (69,2%) и 3 (11,6%) женщинам проводилось облучение только лимфатических коллекторов выше диафрагмы («мантия»). Данные о суммарных очаговых дозах (СОД) и сохранности менструальной функции в зависимости от объема лучевой терапии у женщин больных ЛЖ, представлены в табл. 1.

Препараты для защиты яичников на фоне проведения радикальной лучевой терапии не получала ни одна больная. Менструальный цикл сохранился у всех женщин, у которых в программу лучевой терапии не были включены пахово-подвздошные лимфатические узлы, независимо от числа облученных зон и СОД. Аменорея наступила у всех 5 (100%) пациенток, получивших лучевую терапию на пахово-подвздошные области. Таким образом, проведенный анализ показал, что лучевая терапия без облучения пахово-подвздошных областей не приво-

Таблица 2. Состояние репродуктивной системы после окончания терапии у женщин, больных ЛХ, получавших лечение по различным программам ПХТ без защиты и с защитой яичников (число больных, в скобках — %)

Функция яичников	6 циклов ABVD (n=17)	1–4 цикла CVPP, CVPP/ABV, 5–8 циклов CVPP/ABVD (n=38)	5 и более CVPP или 10 VD (n=78)	4–8 циклов BEACOPP с защитой яичников (n=58)
Сохранена	14 (82,4)	25 (65,8)	38 (48,7)	30 (51,7)
Дисфункция	3 (17,6)	9 (23,7)	20 (25,6)	18 (31,1)
Аменорея	0	4 (10,5)	20 (25,6)	10 (17,2)

дит к наступлению аменореи, поэтому при анализе влияния комбинированной терапии на функцию яичников учитывалось только воздействие химиотерапии. Согласно данным литературы, разные схемы ПХТ приводят к различным нарушениям репродуктивной системы и критической суммарной дозой циклофосфана является доза 6–8 г [39, 40]. При использовании схемы CVPP такая доза достигается за 4 цикла. В соответствии с этими данными с целью определения влияния ПХТ на функцию яичников все пациентки, получавшие ПХТ, были разделены на 4 группы. В 1–3-й группах (157 больных) лишь 24 женщины получали КОК с целью защиты яичников: 9 в 1-й группе, 12 во 2-й и 3 в 3-й; они исключены из оценки влияния химиотерапии на функцию яичников. Также исключены из анализа 6 больных 4-й группы, получавших лечение по программе BEACOPP без защиты яичников.

Таким образом, 1-ю группу составили 17 женщин, которые в качестве первой линии терапии получали лечение по программе ABVD — 6 циклов. 2-ю группу составили 38 пациенток в возрасте от 16 до 44 лет, которым лечение проводилось по программе 1–4 цикла CVPP, 4–8 циклов по схеме CVPP/ABV-гибрид или 5–8 чередующихся циклов CVPP/ABVD; суммарная курсовая доза циклофосфана в этой группе не превышала критической величины 8 г. 3-ю группу составили 78 больных в возрасте 14–43 года, которым лечение проводилось по программам 5–10 циклов CVPP или 10 циклов VD и суммарная курсовая доза циклофосфана превышала величину 8 г. 4-ю группу составили 58 пациенток в возрасте от 15 до 36 лет, которым проводилось лечение по программе BEACOPP стандартный от 4 до 8 циклов с защитой яичников. В этой программе суммарная курсовая доза циклофосфана равна или превышает 8 г (табл. 2).

В 1-й группе у 14 (82,4%) женщин после лечения менструальный цикл не был нарушен и у 3 (17,6%) развилась дисменорея. Аменорея не наступила ни у одной больной. Таким образом, лечение по программе ABVD не приводит к стойкому нарушению менструального цикла — аменорее. Этот факт является дополнительным подтверждением обоснованности формирования 2-й группы не только из больных, получивших 4 цикла CVPP, но и из больных, получивших 4–8 чередующихся циклов CVPP и ABVD или 4–8 циклов CVPP/ABV-гибрид. Таким образом, во 2-й группе больных оценивалось влияние на функцию яичников только ПХТ по программе CVPP. Сведения о состоянии репродуктивной системы после окончания терапии у женщин, больных ЛХ, получавших лечение по программе 6 циклов ABVD, представлены в табл. 2.

Возраст женщин 2-й группы составлял от 16 до 44 лет. У 25 (65,8%) пациенток после лечения менструаль-

ный цикл не нарушен, у 9 (23,7%) констатирована дисменорея и у 4 (10,5%) наступила аменорея (см. табл. 2).

Таким образом, программы терапии, включающие суммарные курсовые дозы циклофосфана до 8 г, малотоксичны для ткани яичников.

В 3-й группе после окончания терапии менструальный цикл не был нарушен лишь у 38 (48,7%) женщин, у 20 (25,6%) развилась дисменорея и у 20 (25,6%) наступила аменорея (см. табл. 2). При корреляционном анализе выявлена высокая степень корреляции частоты возникновения аменореи от возраста. В подгруппе больных до 25 лет аменорея наступила у 5 (10,6%) из 47 больных, в подгруппе больных старше 25 лет — у 15 (48,4%) из 31 ( $p=0,0002$ ).

Программа BEACOPP стандартный стала использоваться для больных неблагоприятной прогностической группы с 1998 г. Так как к этому времени в зарубежной и отечественной литературе были опубликованы данные о повреждающем действии химиопрепаратов на ткань яичников и о возможном протективном действии КОК, пациентки 4-й группы получали с целью защиты яичников КОК все время проведения химиотерапии, а с 2003 г. — золадекс.

В отличие от других групп 4-я группа состояла исключительно из больных с неблагоприятным прогнозом. Суммарная курсовая доза циклофосфана была равна или превышала критическую величину 8 г. 47 (81,2%) больных получали КОК (марвелон непрерывно, регулон непрерывно на протяжении всего лечения) и 11 (20,4%) пациенток — золадекс (6–8 подкожных введений 1 раз в 28 дней). Более 50% больных золадекс вводился в I фазе менструального цикла, до начала терапии проходило около 2 нед, однако у части пациенток в связи с бурным ростом опухоли такой режим введения был невозможен, и препарат вводился независимо от фазы менструального цикла с немедленным последующим началом ПХТ по жизненным показаниям. После окончания терапии менструальный цикл не нарушен у 30 (51,7%) женщин (см. табл. 2), из них 20 (66,7%) получали КОК и 10 (33,3%) — золадекс. Дисменорея развилась у 18 (31,1%), из них 17 (94,4%) пациенток получали КОК и 1 (5,6%) — золадекс. У 10 (17,2%) пациенток, получавших КОК, наступила аменорея. В подгруппе женщин, получавших золадекс, аменореей не было отмечено ни у одной больной.

В группе больных, получавших лечение по программе BEACOPP, в возрасте до 25 лет аменорея наступила статистически значимо реже — у 3 (8,8%) из 34 больных, старше 25 лет — у 7 (29,2%) из 24 больных ( $p=0,04$ ).

При корреляционном анализе в группе женщин до 25 лет риск наступления аменореей зависел только от числа циклов BEACOPP ( $p=0,038$ ). Выявлена высокая сте-

пень корреляции частоты возникновения аменореи в группе больных старше 25 лет с наличием симптомов интоксикации ( $p=0,04$ ).

Таким образом, программы терапии, содержащие 5 и более циклов CVPP и 6–8 циклов VEACOPP, суммарные курсовые дозы циклофосфана в которых составляют 8 г и более, высокотоксичны для ткани яичников, причем чем старше пациентка, тем выше токсичность. Поэтому при выборе программ лечения, включающих курсовую дозу циклофосфана более 8 г, необходимо планировать защиту яичников, особенно у женщин старше 25 лет.

Сравнительный анализ частоты наступления аменореи в 3-й и 4-й группах показал, что при использовании защиты яичников аменорея наступает достоверно реже ( $p=0,034$ ; см. табл. 2). Таким образом, использование гормональных препаратов с целью защиты яичников при проведении химиотерапии, включающей высокие дозы алкилирующих препаратов, позволяет сохранить менструальную функцию у большего числа больных.

При проведении корреляционного анализа в группе в целом (247 больных) выявлено, что сохранность менструального цикла после лечения ЛХ зависит от возраста женщин ( $p=0,000001$ ), наличия В-симптомов – за счет больных с уменьшением массы тела более чем на 10% ( $p=0,04$ ), стадии заболевания ( $p=0,00004$ ), общего состояния больных (статус по ECOG-ВОЗ 3–4;  $p=0,002$ ), наличия анемии ( $p=0,04$ ), альбуминемии ( $p=0,008$ ) и от облучения пахово-подвздошных лимфоузлов ( $p=0,003$ ).

При проведении корреляционного анализа также выявлено, что частота наступления менопаузы после лечения ЛХ зависит от возраста больных на момент проведения лечения ( $p=0,000005$ ), наличия В-симптомов ( $p=0,03$ ), стадии заболевания ( $p=0,006$ ), альбуминемии ( $p=0,003$ ), облучения пахово-подвздошных лимфатических узлов ( $p=0,001$ ), проведения поддерживающего лечения ( $p=0,001$ ) и общего числа циклов ПХТ ( $p=0,02$ ).

### Выводы

1. Нерегулярный менструальный цикл до начала терапии ЛХ статистически значимо чаще наблюдался в группе

женщин с наличием симптомов интоксикации ( $p=0,0004$ ).

2. Лучевая терапия без облучения пахово-подвздошных областей не вызвала аменорею ни у одной женщины независимо от возраста, числа полей и СОД на каждое поле (до 50 Гр). Облучение пахово-подвздошных областей вызвало аменорею у всех женщин, даже в дозах, не превышающих 30 Гр.
3. Для женщин детородного возраста, больных ЛХ с небольшой опухолевой массой (больные с благоприятным и промежуточным прогнозом), методом выбора должна быть программа ABVD, так как при аналогичной остальным схемам эффективности она не вызывает стойкого повреждения ткани яичников.
4. Программы терапии, содержащие менее 8 г циклофосфана, малотоксичны для ткани яичников – аменорея наступила лишь у 10,5% женщин. При использовании таких лечебных программ зависимости частоты наступления аменореи от возраста, симптомов интоксикации, прогностической группы, а также от состояния функции яичников до начала терапии ЛХ выявлено не было. Назначение гормональных препаратов с целью защиты яичников для этих больных должно быть индивидуализировано, но желательно их применение у женщин старше 25 лет.
5. Лечение по программам, в которых доза циклофосфана превышает 8 г, вызывает аменорею у 25,6% пациентов. Выявлена высокая степень корреляции частоты возникновения аменореи с возрастом больных ( $p=0,0002$ ). Необратимое повреждение ткани яичников выявлено у 48,4% у женщин старше 25 лет.
6. Пациенткам, которым планируется проведение лечения по программе, включающей суммарную курсовую дозу циклофосфана более 8 г, особенно женщинам старше 25 лет, целесообразно назначение гормональных препаратов с целью защиты яичников. Возможно использование КОК (регулон в непрерывном режиме на протяжении всего лечения) или агонистов ГРГ (золадекс).

## Л и т е р а т у р а

1. Гарин А.М. Вклад лекарственной терапии в повышении общей выживаемости онкологических больных. Материалы IX Российского онкологического конгресса. М., 2005. с. 22–4.
2. Mauch P., Ng A., Aleman B. et al. Report from Rockefeller Foundation Sponsored International Workshop on reducing mortality and improving quality of life in long-term Survivors of Hodgkin's disease. Eur J Haematol 2005;75(66):68–76.
3. Демина Е.А. Лимфома Ходжкина. М., РЛС; 2004. с. 605–14.
4. Демина Е.А. Современная терапия первичных лимфомой Ходжкина. Автореф. дис. ... докт. мед. наук.
5. Blumenfeld Z., Dann E., Avivi I., Epelbaum R. Fertility for Hodgkin's disease. Ann Oncol 2002;13 (Suppl 1): 138–47.
6. Peters M.V. A study of survival in Hodgkin's disease treated radiologically. Am J Roentgenol 1950;63:299–311.
7. Gilbert R. Radiotherapy in Hodgkin's disease (malignant granulomatosis). Anatomic and clinical foundations. Governing principles. Results. Am J Roentgenol 1939;41:198–241.
8. De Vita V., Serpick A. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. Proc Am Assoc Cancer Res 1967;8:13.
9. Cancer: Principles and Practice of Oncology. DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.) 6th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers; 2001. vol 2, ch. 45.
10. Hodgkin's disease. Mauch P.V., Armitage J.O., Diehl V. et al. (eds.). Philadelphia, 1999.
11. Шмаков Г.С., Комова Т.Д., Демина Е.А. Беременность и роды у женщин с лимфомой Ходжкина. Материалы VI Российской онкологической конференции. М., 2002. с. 59–60.
12. Кулаков В.И. Репродуктивное здоровье населения России: медицинские, социальные и демографические проблемы. Поликлиническая гинекология. М., 2005. с. 263–73.
13. Манухин И.Б., Тумилович Л.Г., Геворкян М.А. Физиология репродуктивной системы. В кн.: Клинические лекции по гинекологической эндокринологии. М., 2003. с. 6–26.
14. Демина Е.А. Лимфогранулематоз. В кн.: Клиническая онкогематология. М., 2001. с. 314–36.
15. Glaser S.L. Reproductive factors in Hodgkin's disease in women: a review. Am J Epidemiol 1994;139:237–46.
16. Radford J.A., Shalet S.M., Lieberman V.A. Fertility after treatment for cancer. Br Med J 1999;319:935–6.
17. Демина Е.А., Махова Е.Е., Сузулева Н.А., Ильященко В.А. Возможность сохранения детородной функции у женщин с лимфомой Ходжкина. РМЖ 2005;(1):26–8.
18. Cancer: Principles and Practice of

- Oncology. DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.) 4th ed. Philadelphia, 1993. Vol. 2.
19. Blumenfeld Z., Avivi I., Riter M., Rowe J.M. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. *J Soc Gynecol Invest* 1999;6:229—39.
20. Blumenfeld Z., Haim N. Preservation of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med* 1997;29:1323—206.
21. Sutcliffe S.B. Cytotoxic chemotherapy and gonadal function in patients with Hodgkin's disease. *JAMA* 1979;242:1898—901.
22. Hillier S.G., Zeleznik A.J., Knazek R.A., Ross G.T. Hormonal regulation of pre-ovulatory follicle maturation in the rat. *J Reprod Fertil* 1980;60(1):219—29.
23. Mattle V., Behringer K., Engert A., Wildt L. Femal fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases. *Eur J Haematol* 2005; 75(Suppl 66):77—82.
24. Bittl A., Beck E., Jager W., Wildt L. Untersuchungen zur Amenorrhoe unter adjuvanter CMF-Chemotherapie bei Mammakarzinom-Patientinnen. In: Lang N., Jager W. (eds.). *Zytostatikabedingte Nebenwirkungen*. Munchen, Zuckschwerdt Verlag; 1993. p. 14—20.
25. Franchi-Rezgui P., Rousselot P., Espie M. et al. Fertility in young women after chemotherapy with alkylating agents for Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. *Hematol J* 2003;4(2):116—20.
26. Whitehead E., Shalet S.M., Blackledge G. et al. The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. *Cancer* 1983;52:988—93.
27. Behringer K., Breuer K., Reineke T. et al. Secondary amenorrhoea after Hodgkin's lymphoma. A report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG). *Blood* 2004;(11): 370a (abstr 1314).
28. Behringer K., Breuer K., Reineke T. et al. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7555—64.
29. Демина Е.А., Перилова Е.Е., Шамаков Р.Г. Использование комбинированных пероральных контрацептивов для профилактики повреждения функции яичников у больных лимфомой Ходжкина. М., РЛС; 2004. с. 1352—4.
30. Tesch H., Engert A., Lathan B. et al. Therapy of Hodgkin's disease. *Oncologie* 1993;16:407—15.
31. Chartman R.M. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 1982;9:84—135.
32. Shafet S.M., Beardwell C.G., Morris P.H. et al. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood. *Br J Cancer* 1976;33:655—8.
33. Atay K.M., McKanna J.A., Weintraub A.M. et al. Prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. *Cancer Res* 1985;45:3651—6.
34. Chapman R.M., Sutcliffe S.B. Protection of ovarian function by oral contraceptives in women receiving chemotherapy for Hodgkin's disease. *Blood* 1981;58:849—51.
35. Blumenfeld Z. Ovarian rescue/protection from chemotherapeutic agents. *J Soc Gynecol Invest* 2001;8:60—4.
36. Blumenfeld Z. Oreservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and -B as markers. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187(1—2):93—105.
37. Oktay K., Kan M.T., Rosenwaks Z. Recent progress in oocyte tissue cryopreservation and trasplantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:263—8.
38. Doll D.C., Ringerberg O.S., Yarbrow J.W. Antineoplastic agents and pregnancy. *Semin Oncol* 1989;16:337—46.
39. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lanset* 2000;364:1405—10.
40. Parrot D.M.V. The fertility of mice with orthopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1954;1:230—41.
41. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at —196°C. *Hum Reprod* 1994;9:597—603.
42. Hovatta O., Silye R., Krause T. et al. Cryopreservation of ovarian tissue using DMSO and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;11:1268—72.
43. Oktay K., Newton H., Gosden R.C. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 2000;73:599—603.
44. Oktay K., Bujuk E., Veeck L. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837—40.
45. Kim S.S., Gosden R.G., Radford J.A. et al. A model to test the safety of human ovarian tissue transplantation after cryopreservation: xeno-grafts of ovarian tissues from cancer patients into NOD/LtSz-Scid mice. Program and Abstracts of the ASRM/CFAS Conjoint Annual Meeting, Toronto, Ontario, Canada, September 25—30, 1999. *Fertil Steril* 1999;72(Suppl):S1 (abstr 003).
46. Meirov D., Epstein M., Lewis H. et al. Administration of cyclo-phosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Human Reprod* 2001;16:632—7.
47. Игнашина Е.В., Пивник А.В., Шилин Д.Е. и др. Профилактика репродуктивных нарушений, возникающих в процессе химиотерапии у женщин детородного возраста, страдающих болезнью Ходжкина. *Тер арх* 1998;(7):49—53.

# XI КОНГРЕСС ЕВРОПЕЙСКОЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ АССОЦИАЦИИ

**С** 15 по 18 июня 2006 г. в Амстердаме состоялся XI международный конгресс Европейской гематологической ассоциации (ЕНА). Прошло около 30 заседаний и 25 спутных симпозиумов, посвященных актуальным проблемам гематологии, в том числе вопросам патогенеза и терапии лейкозов и лимфом. Ниже мы очень кратко знакомим наших читателей с основными направлениями научных исследований и их результатами, которые обсуждались на конгрессе.

## Острые лейкозы

(Подготовлено М.А. Волковой, РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН)

Основные направления исследований — изучение механизмов, связанных с патогенезом лейкозов, и совершенствование терапии.

Одним из широко применяемых методов исследования острых лейкозов стало использование микрочипов, позволяющее сравнивать профиль экспрессии генов при разных вариантах лейкозов и в разных прогностических группах. Использование этой техники показало, что при экспрессии определенных генов, отражающей активность энзимов, участвующих в репарации повреждений ДНК, очень высок уровень ошибок при восстановлении нарушений ДНК. Это может повышать риск развития лейкоза.

Одним из интереснейших результатов применения техники микрочипов явилось установление того факта, что при различных вариантах острых лейкозов нередко экспрессируются гены, которые не являются маркерами той или иной гемопоэтической линии, но участвуют в патогенезе солидных опухолей. Этот факт свидетельствует о сходстве биологии различных опухолей.

## Острые нелимфобластные лейкозы (ОНЛЛ)

С помощью микрочипов был подтвержден различный профиль экспрессии генов при ОНЛЛ с различными хромосомными абберациями. Теперь можно быстро и более дешевым методом диагностировать известные транслокации — t(8;21), t(15;17), inv (16), t(11q23)MLL.

Установлен профиль экспрессии генов, характерный для ОНЛЛ с мультилинейной дисплазией, что подтверждает ее значимость в патогенезе этой группы лейкозов, несмотря на то что при современной терапии она в значительной степени утратила свое неблагоприятное прогностическое значение.

Выявление различного профиля экспрессии генов при ОНЛЛ, относящихся к одной прогностической группе, показывает, что современная классификация не полностью отражает биологическое разнообразие лейкозов. Возможно, лейкозы, сейчас относящиеся к одной прогностической группе, на самом деле должны относиться к разным группам, требующим применения различной терапии. Наиболее убедительными примерами являются обнаружение прогностического значения мутаций гена *FLT3*-тирозинкиназы и гена нуклеоплазмина (*NPM1*). Мутации гена *FLT3*-тирозинкиназы — наиболее частые нарушения генома при ОНЛЛ (обнаружены почти у 30% больных), преимущественно у больных с отсутствием хромосомных аббераций и у больных с М3-вариантом ОНЛЛ. Мутации этого

гена ассоциированы с высокой частотой рецидивов ОНЛЛ. В то же время показано, что мутации гена *NPM1* являются прогностически благоприятными. Установлены 116 генов, экспрессия которых характерна для мутаций гена *NPM1* при отсутствии мутаций гена *FLT3*.

Недавно было установлено, что определенный профиль генов при ОНЛЛ ассоциирован с резистентностью к индукционной терапии.

Исследование экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости показало, что одновременное обнаружение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок Pgp, и гена лекарственной устойчивости, обнаруженного при раке молочной железы (ген *BCRP*), у пожилых больных с высоким уровнем CD34-позитивных клеток предвещает очень низкий уровень ремиссий и плохие показатели выживаемости.

В докладах, посвященных лечению, подчеркивалось, что при хорошем соматическом состоянии больные старше 60 лет обязательно должны получать консолидацию с использованием высоких или средних доз цитозин-арабинозида. Исключение высокодозной консолидации резко снижает показатели выживаемости этой группы больных. Показано, что экспрессионный профиль *NPM1*+/*FLT3*- у пожилых исключительно благоприятен, у этих больных при проведении стандартной терапии в обычных дозах получено 66% полных ремиссий, а использование высокодозной консолидации позволяет получить выживаемость, почти равную выживаемости больных моложе 60 лет.

В настоящее время стало понятно, что терапия ОНЛЛ с использованием антрациклинов, особенно ида-рубицина и митоксантрона, цитозин-арабинозида в стандартных (при проведении индукции) и в высоких (при консолидации) дозах в комбинации с этопозидом не может дать более высоких результатов при увеличении доз используемых препаратов, поскольку такое увеличение сопряжено с большим риском жизненно опасных осложнений. Кроме того, накоплен опыт, показывающий, что резистентность к указанной терапии чрезвычайно редко удается преодолеть комбинацией других цитостатических средств. В настоящее время ведутся очень активные исследования эффективности ряда препаратов, механизм действия которых направлен на устранение биологических эффектов, вызванных имеющимися при острых лейкозах нарушениями генома. Уже показал свою эффективность у больных с мутациями гена *FLT3* ингибитор *FLT3*-тирозинкиназы PKC412.

Опубликованы результаты трех больших исследований (142 больных ОНЛЛ), посвященных изучению эффективности антител к антигену CD33, экспрессирующему на большинстве бластных клеток при ОНЛЛ. Пока исследования проведены только при рецидивах у больных старше 60 лет, которые из-за плохого соматического состояния не могли получать повторную цитостатическую терапию. Ремиссии получены у 26% больных. При комбинации анти-CD33-антител (препарат гемтузумаб) с химиотерапией для лечения первичных больных ремиссии получены у 54% больных в возрасте 61—75 лет, у которых частота ремиссий обычно значительно меньше.



них гемопоэтических клеток, что обуславливает высокую специфичность и эффективность терапии. Особый интерес вызвали сообщения о результатах 5-летней терапии гливеком, методах контроля за МОБ и обсуждение механизмов резистентности и путей их преодоления.

**Выбор оптимальной терапии.** Целью международного исследования IRIS (International Randomized Study IFN +Ara-C vs Imatinib) было проанализировать выживаемость больных в хронической фазе ХМЛ в зависимости от метода терапии. С июня 2000 г. по январь 2001 г. в исследование были включены 1106 больных с вновь диагностированным ХМЛ, которые были рандомизированно разделены на 2 группы, получающие различное лечение: интерферон- $\alpha$  в комбинации с цитозаром (IFN- $\alpha$  +Ara-C) или монотерапию гливеком по 400 мг в день. Как сообщалось ранее, полный цитогенетический ответ через 12 мес терапии гливеком по 400 мг в день удалось получить у 76 % больных против 8 % у больных, получавших комбинированную терапию IFN- $\alpha$  +Ara-C. Последующий анализ через 54 мес наблюдения подтвердил эти впечатляющие данные. Из 553 больных, рандомизированных для лечения IFN- $\alpha$  +Ara-C, только 4% продолжают лечение, в то время как на терапии гливеком остаются 72% больных, поэтому провести сравнение выживаемости при использовании этих двух методов на основании данного исследования невозможно. При лечении гливеком большинство больных достигли большого цитогенетического ответа (БЦО) к 6 мес лечения, а полного цитогенетического ответа (ПЦО) — к 12 мес. Частота полной гематологической ремиссии (ПГО), БЦО и ПЦО составила 97, 88 и 82% соответственно.

Общая 5-летняя выживаемость больных ХМЛ при лечении гливеком составила 90%, а выживаемость без прогрессирования до фазы акселерации (ФА) и бластного криза (БК) — 93%. Следует особо подчеркнуть, что частота развития ФА/БК на четвертом году была самой низкой (менее 1%) по сравнению с тремя предыдущими годами (1,5, 2,8 и 16%). При подведении итогов через 12 мес наблюдения частота достижения ПЦО в значительной степени зависела от группы риска прогрессирования ХМЛ (Sokal): самые низкие результаты были у больных с высоким риском прогрессирования ХМЛ — 69%, тогда как у больных с промежуточным и низким риском — 85 и 96% соответственно. Однако через 5 лет терапии установлено, что выживаемость больных с ПЦО не зависит от группы риска (получение ПЦО для долгосрочной выживаемости важнее, чем группа риска), а частота ПЦО составила 87, 92 и 98% у больных с высоким, промежуточным и низким риском соответственно.

**Молекулярные методы мониторинга МОБ.** В исследовании IRIS выявлено, что частота больших молекулярных ремиссий, (под большим молекулярным ответом — БМО, или ремиссией, подразумевают снижение уровня BCR-ABL-транскрипта по сравнению с таковым до начала терапии в 1000 раз — на 3 log) при монотерапии гливеком (39%) значительно выше, чем при использовании комбинированной терапии ИФ- $\alpha$  +Ara-C (2%). Кроме того, через 60 мес наблюдения подтвердилось предположение о том, что БМО является ранним предвестником благоприятного прогноза. Пятилетняя выживаемость без прогрессирования в группе пациентов с ПЦО, достигших к 12 мес терапии снижения уровня BCR-ABL- транскрипта более чем на 3 log, составила

100% против 95% у больных со снижением уровня транскрипта менее чем на 3 log. У больных без ПЦО 5-летняя выживаемость составила 88%.

Поскольку при терапии гливеком у большинства пациентов с ПЦО с помощью молекулярных методов удается выявить BCR-ABL-транскрипт, целесообразно проводить определение его уровня. Во многих гематологических центрах методом выбора при мониторинге МОБ стал метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Динамические исследования остаточного уровня BCR-ABL-транскрипта позволяют своевременно изменить тактику терапии — увеличить дозу препарата или выбрать альтернативный путь лечения. С другой стороны, обсуждается вопрос о необходимости выделения некоего порогового уровня остаточной болезни (БМО), выше которого у пациента имеется высокий риск развития рецидива, а ниже которого, как правило, сохраняется полная ремиссия. Однако до настоящего времени существенной проблемой остаются стандартизация метода и сама характеристика молекулярного ответа. Помимо приведенного выше в литературе встречается также определение БМО как соотношения BCR-ABL/ABL, выраженное в процентах (менее 0,05%).

**Механизмы резистентности.** О молекулярных механизмах первичной резистентности (отсутствие ответа на терапию) на сегодняшний день известно мало. Причиной возникновения вторичной резистентности (рецидив) часто является реактивация гена BCR-ABL, которая в 50–90% случаев обусловлена мутациями BCR-ABL-тирозинкиназы. В настоящее время у больных с гематологической резистентностью к гливеку определены более 40 различных мутаций. В этих случаях выявляют различные аминокислотные замены как в локусе связывания гливека с тирозинкиназой, так и в участках, ответственных за изменение структуры белка p210. Около 10% мутаций связаны с гиперпродукцией гена BCR-ABL или образованием дополнительной Ph+ хромосомы. Поскольку в ряде случаев при увеличении дозы гливека удается получить ответ, можно предположить, что в этих случаях внутриклеточная концентрация гливека недостаточна для подавления активности тирозинкиназы, а повышение внутриклеточной концентрации вызывает гибель клеток.

**Доза гливека.** Для лечения больных в хронической фазе ХМЛ доза гливека составляет 400 мг. Увеличение дозы препарата до 600–800 мг/сут позволяет преодолеть резистентность и улучшить результаты у 25–40% больных в хронической фазе ХМЛ.

В сообщении, сделанном G. Rosti и соавт., приводятся результаты кооперированных исследований из 23 итальянских центров, которые для улучшения результатов терапии у больных с промежуточным риском прогрессирования ХМЛ назначали гливек в дозе 800 мг/сут в качестве терапии первой линии. Такая тактика позволила не только увеличить частоту цитогенетических и молекулярных ответов, но и сократить сроки их достижения. Частота ПЦО и БМО к 6 мес составила 87 и 53%, к 12 мес — 90 и 56% соответственно. Аналогичные результатам получены в MD Anderson Cancer Center.

Обнадешивающие данные получены при использовании других ингибиторов тирозинкиназ.

**Перспективные направления в лечении ХМЛ.** Впервые результаты I фазы клинических испытаний по оценке эффективности препаратов BMS-354825 и AMN 107

были представлены в мае 2005 г. на ежегодной встрече Американского общества клинических онкологов (ASCO). Учитывая небольшой срок наблюдения, в настоящее время нельзя делать окончательных выводов о стабильности полученных результатов.

Дазатиниб (BMS-354825) является новым представителем класса ингибиторов тирозинкиназ и структурно отличается от гливека. Кристаллический анализ установил, что он не только связывается с активной (открытой) частью ABL-тирозинкиназы, но и ингибирует семейство SRC-киназ. В доклинических исследованиях выявлено, что его активность в 300 раз превосходит таковую гливека и он эффективен практически при всех известных мутациях, кроме T315I. Первые больные начали прием дазатиниба в ноябре 2003 г.

С февраля по август 2005 г. в многоцентровое международное исследование, посвященное оценке эффективности дазатиниба, были включены 387 больных в хронической фазе ХМЛ. Для подведения итогов терапии были доступны данные 186 больных. Показанием к назначению дазатиниба были резистентность к гливеку (127 человек) и непереносимость препарата (59 человек). Медиана длительности ХМЛ до начала лечения дазатинибом у них составила 61 мес. Полная гематологическая ремиссия была получена в 90% случаев, БЦО — в 45%. В группе пациентов с резистентностью к терапии гливеком частота БЦО была меньше (31%), чем в группе с непереносимостью (73%). У 65 пациентов с выявленными мутациями BCR-ABL частота БЦО составила 37%. В исследовании по оценке эффективности дазатиниба в фазе акселерации были включены 174 пациента с медианой длительности заболевания до начала лечения 82 мес. Гематологический ответ получен у 59% больных (из них ПГО — у 33%). Интересно отметить, что выявление мутаций BCR-ABL у 56 больных не повлияло на частоту гематологических ответов (66%). Цитогенетический ответ достигнут у 33% больных, из них ПЦО — у 22%.

Препарат AMN 107 (nilotinib) является структурным дериватом гливека. Как и иматиниб, он связывается с ABL-тирозинкиназой в неактивной конформации, но обладает в 25–30 раз более высокой активностью и, что более важно, активен против большинства ее мутантных форм, кроме мутации T315I. Подведены предварительные итоги II фазы международного многоцентрового исследования, включившего 67 больных в хронической фазе ХМЛ, у которых терапия гливеком была неэффективной. У 83% больных была достигнута полная гематологическая ремиссия, а цитогенетический ответ отмечен у 43% больных, в том числе БЦО — в 19%. В фазе акселерации из 22 пациентов, получивших лечение AMN 107, гематологический и цитогенетический ответы получены у 64 и 25% соответственно. Результаты терапии больных с миелоидным вариантом бластного криза значительно хуже: частота ПГО и ПЦО составила 33 и 4% соответственно.

Следует учесть, что, поскольку у большинства больных ХМЛ при использовании стандартных доз гливека с помощью молекулярных методов удается выявить МОБ, которая может быть субстратом для появления новых мутаций BCR-ABL и развития резистентности, необходимо тщательное мониторинговое наблюдение МОБ для своевременной коррекции доз или смены тактики лечения.

### **Хронический лимфолейкоз: новое понимание биологии хронического лимфолейкоза, новые подходы к лечению**

(Подготовлено Е.А. Никитиным, Гематологический научный центр РАМН)

Представленная на конференции программа отличалась широким спектром обсуждаемых тем в различных областях фундаментальных исследований и практических методов терапии В-клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ). Анализ результатов последних исследований выявил несколько направлений в изучении этого заболевания:

- характеристика биологически разных вариантов болезни;
- разработка адаптированной к риску терапии В-ХЛЛ;
- переход от паллиативной тактики к куративной, когда целью лечения является достижение полных ремиссий.

**Патогенез В-ХЛЛ.** Последние достижения в области патогенеза В-ХЛЛ были обобщены проф. Ferrarini. Он отметил, что в последние годы окончательно опровергнут тезис о том, что В-ХЛЛ возникает из наивных, не контактировавших с антигеном клеток. Изучение генов иммуноглобулинов позволило подразделить В-ХЛЛ на 2 варианта в зависимости от наличия или отсутствия мутаций генов варибельного региона (VH) иммуноглобулинов, радикально различающихся по прогнозу. Оба варианта возникают из иммунокомпетентных клеток. Об этом свидетельствуют молекулярные признаки перенесенного контакта с антигеном. Дифференцировка лимфоцитов от клетки-предшественницы до плазматической сопровождается многочисленными изменениями генов иммуноглобулинов, причем каждый этап характеризуется своими особенностями. Анализ генов иммуноглобулинов в опухолевых клетках позволяет понять, на какой стадии развития находился лимфоцит до опухолевой трансформации. Клетки-предшественницы В-ХЛЛ во всех случаях контактируют с антигенами. У многих больных наблюдается структурное сходство варибельных регионов иммуноглобулинов клеток В-ХЛЛ, что может говорить об общности антигенов. Использование некоторых часто повторяющихся VH-генов, например VH3-21, говорит о неблагоприятном прогнозе. Неслучайный характер использования VH-генов при В-ХЛЛ отмечен в работах исследователей из Северной Ирландии и Украины.

В-ХЛЛ имеет уникальный иммунофенотип. В частности, клетки В-ХЛЛ экспрессируют CD5, CD23 и характеризуются слабой экспрессией поверхностных иммуноглобулинов. Длительное время усилия исследователей были сосредоточены на поиске соответствующей нормальной популяции В-лимфоцитов. Сегодня ясно, что такой субпопуляции в норме не существует. Больше данных за то, что В-ХЛЛ возникает из клеток маргинальной зоны. Клетки маргинальной зоны сильно отличаются по иммунофенотипу от клеток В-ХЛЛ, однако их фенотип сильно меняется при активации, приобретая сходство с иммунофенотипом В-ХЛЛ. Проф. Ferrarini привел основные доводы в пользу этой концепции:

- сходный профиль экспрессии генов, определяемый с помощью микрочипов;
- отсутствие в клетках В-ХЛЛ сдвига изотипа при наличии признаков соматической гипермутации, в то

время как известно, что большая часть нормальных В-лимфоцитов проделявает одновременно и сдвиг изотипа, и соматическую гипермутацию;

- приобретение клетками маргинальной зоны характерных для В-ХЛЛ маркеров при активации;
- полиспецифичность антител, продуцируемых клетками В-ХЛЛ и клетками маргинальной зоны.

Еще одним важным шагом к пониманию биологии В-ХЛЛ является смена представлений о роли апоптоза в патогенезе этой болезни. Долгое время считалось, что ведущим механизмом накопления клеток В-ХЛЛ является дефект апоптоза. Основным доводом в пользу этого служил тот факт, что клетки В-ХЛЛ медленно делятся, что хорошо видно по слабой экспрессии маркеров пролиферации. Ошибочность этой концепции была показана в экспериментах с мечением ДНК клеток В-ХЛЛ с помощью дейтерия, в которых установлено, что период обновления клеток В-ХЛЛ весьма непродолжителен. В случаях В-ХЛЛ, характеризующихся наиболее активной пролиферацией, половина опухолевого клона полностью обновляется в течение 3 мес, причем ежедневно отмирает и рождается примерно 2% клеток В-ХЛЛ. В случаях с наименьшей пролиферативной фракцией период обновления примерно вдвое больше. Клетки В-ХЛЛ активно пролиферируют в структурах, именуемых псевдофолликулами, которые обнаруживаются как в костном мозге, так и в периферических лимфоидных органах. До сих пор при В-ХЛЛ не было описано ни одного дефекта генов апоптоза, ни внешнего, ни внутреннего пути. Клетки В-ХЛЛ подвергаются спонтанному апоптозу *in vitro*, их довольно трудно культивировать. Это также подтверждает второстепенную роль апоптоза. Таким образом, накопление клеток В-ХЛЛ больше связано с активной пролиферацией, а дефект апоптоза если и имеет значение, то второстепенное.

**Разработка адаптированной к риску терапии.** Адаптация терапии к риску означает определение в дебюте факторов прогноза для решения вопроса о том, когда начинать лечение и какой вариант терапии предпочтителен. Известно, что течение В-ХЛЛ крайне вариабельно. В многочисленных исследованиях показано, что назначение хлорамбуцила вскоре после установления диагноза на ранних этапах развития В-ХЛЛ всем больным без учета групп риска не увеличивает выживаемость по сравнению с его назначением при возникновении показаний к терапии. В настоящее время появилась возможность получать полные молекулярные ремиссии при приемлемой токсичности с помощью аналогов пуринов и моноклональных антител. Кроме того, лучше изучен патогенез В-ХЛЛ и появилась возможность выделять биологически различные группы больных. Распределение больных на классические группы риска по стадиям — низкий (стадии 0 по Rai, А по Binet), промежуточный (стадии I/II по Rai, В по Binet) и высокий (стадии III/IV по Rai или С по Binet) — предсказывает выживаемость. Однако в многофакторном анализе распределение по стадиям утрачивает значение при условии, что в модель включаются мутационный статус VH-генов и хромосомные aberrации. Это показывает, что стадии в значительной степени отражают массу опухоли и в меньшей — ее биологические особенности. Сегодня нельзя исключить, что если бы в эпоху больших исследований эффективности хлорамбуцила была возможность анализировать мутационный

статус и цитогенетику, преимущество в выживаемости при раннем назначении хлорамбуцила могло быть получено для определенных категорий больных.

Факторам прогноза В-ХЛЛ посвящено 12 работ, в том числе 2 работы российских авторов. Эти работы открывают новый, перспективный этап в изучении прогностических факторов. В большинстве исследований 1990-х годов генетические факторы прогноза оценивались ретроспективно: пациенты могли получать разные виды терапии, основным анализируемым показателем была общая выживаемость. Это было оправданно, поскольку до сих пор не опубликовано ни одного рандомизированного исследования, где было бы получено различие в общей выживаемости в зависимости от варианта терапии, кроме исследований результатов трансплантации. В настоящее время появляется все больше работ, в которых новые факторы прогноза анализируются проспективно в рамках клинических испытаний.

Доктор Stilgenbauer в своем докладе привел результаты 3 крупных клинических испытаний, в которых проведена проспективная оценка роли прогностических факторов. В исследовании немецкой группы CLL4, сравнивающим монотерапию флударабином и комбинацию флударабин плюс циклофосфан, показано, что наличие делеции 17p достоверно коррелирует с плохим ответом на терапию (53,8% против 89,6%,  $p=0,001$ ), худшей беспрогрессивной (медианы 11 и 24,1 мес,  $p=0,002$ ) и общей выживаемостью (15,9 мес против «не достигнута»,  $p<0,001$ ). Делеция 11q коррелировала с худшей беспрогрессивной выживаемостью (17,4 мес против 26,8 мес,  $p=0,044$ ). В исследовании ECOG 2997, в котором также сравнивались монотерапия флударабином и комбинация FC, по данным многофакторного анализа, беспрогрессивную выживаемость достоверно предсказывали монотерапия флударабином ( $p=0,0001$ ), делеция 17p или мутации Trp53 ( $p=0,0005$ ), а также вариант В-ХЛЛ без мутаций VH-генов ( $p=0,03$ ).

В британском исследовании (UK LRF CLL4), сравнивающим монотерапию хлорамбуцилом, монотерапию флударабином и комбинацию ФЦ, выявлена корреляция между ответом на лечение, мутационным статусом VH генов ( $p=0,05$ ), делецией Trp53 ( $p=0,02$ ) и делецией 11q ( $p=0,01$ ). Мутационный статус VH-генов не предсказывал ответ на флударабин и комбинацию ФЦ: частота ремиссий у больных с мутациями и без мутаций VH-генов была одинакова. Недостоверная зависимость получена по частоте ремиссий у больных, получавших хлорамбуцил: у больных без мутаций VH-генов было получено 25% полных и нодулярных частичных ремиссий, у больных с мутациями — 42% ремиссий ( $p=0,07$ ). Достоверные различия получены по беспрогрессивной выживаемости: у больных с мутациями VH-генов общая 5-летняя выживаемость составила 69%, без мутаций — 53% ( $p=0,001$ ).

Таким образом, частота ремиссий у больных с разным мутационным статусом при современной терапии, по-видимому, одинакова. Мутационный статус предсказывает время до рецидива и общую выживаемость. Напротив, все три исследования показывают чрезвычайно неблагоприятный прогноз у больных с делецией 17p (утрата Trp53). Хромосомные aberrации, приводящие к нарушениям пути Trp53 (del 17p и del 11q), в дебюте заболевания встречаются нечасто. Так, по данным российского исследования, делеция 17p выявлена у 8 больных из 135

(6%). Однако частота этих нарушений, по-видимому, значительно возрастает при прогрессии болезни. Ответ на терапию в этой группе больных значительно хуже. Таким образом, у этих пациентов логично применять лечение, которое действует независимо от инактивации пути Tr53. В этом смысле интересны результаты представленного на конференции исследования САМ 307.

**Исследование САМ 307: Кэмпас в первой линии терапии В-ХЛЛ.** На специальном заседании, проведенном в рамках конференции, были обнародованы предварительные результаты международного рандомизированного открытого исследования III фазы САМ307, в котором сравнивались эффективность и безопасность моноклонального антитела Кэмпас и хлорамбуцила у первичных больных ХЛЛ.

Моноклональное антитело Кэмпас к CD52 было получено много лет назад в Кембриджском университете (отсюда название Cambridge Pathology). В 2001 г. Кэмпас был зарегистрирован в США и странах ЕС для лечения рецидивов у больных В-ХЛЛ, получивших лечение алкилирующими препаратами и аналогами пуринов. Основанием для такой регистрации послужили результаты исследования САМ 211, в котором изучались эффективность и безопасность монотерапии Кэмпасом у больных с резистентностью к флударабину. Медиана выживаемости у больных с резистентностью к флударабину или ранним рецидивом не превышает 10 мес, что сопоставимо с выживаемостью больных с рецидивом ОЛЛ. У 93 больных с доказанной резистентностью к флударабину в САМ 211 медиана выживаемости достигших ремиссии больных была 32 мес, а во всей группе — 16 мес. Эти результаты значительно превосходили ожидаемые для данной категории больных (ожидаемый результат для всей группы — 20 мес). Отсутствие терапевтической альтернативы и крайне неблагоприятный прогноз у больных с резистентностью к флударабину дали основание для регулирующих организаций США (FDA) и Европы (ЕМЕА) зарегистрировать препарат на основании клинического исследования II фазы в виде исключения. При этом компании Genzyme и Schering AG взяли на себя обязательство провести рандомизированное исследование III фазы. Исследование САМ 307 проведено в рамках выполнения этих пострегистрационных обязательств. После получения окончательных данных по основному критерию эффективности (беспрогрессивной выживаемости) Genzyme и Schering AG намерены подать заявку о включении в перечень показаний применение Кэмпаса у первичных больных В-ХЛЛ. Это дало бы возможность применять Кэмпас (возможно, в комбинации с другими цитостатиками) в первой линии терапии В-ХЛЛ у больных с крайне неблагоприятным прогнозом, в частности, с нарушениями пути Tr53 (делеция 17p и делеция 11q), поскольку у большинства этих пациентов стандартная терапия флударабином и алкилирующими препаратами неэффективна.

Кэмпас вводили внутривенно в дозе 30 мг/м<sup>2</sup> 3 раза в неделю, продолжительность курса до 12 нед. Хлорамбуцил назначали перорально в дозе 40 мг/м<sup>2</sup> внутрь сразу всю дозу, раз в 28 дней, всего 12 циклов. Сравнение с хлорамбуцилом было проведено по требованию FDA. В исследование включено 297 больных в 44 центрах из 13 стран (США и европейские страны). Кэмпас получили 149 больных, хлорамбуцил — 148

больных. Предварительный анализ результатов исследования показал, что общий ответ у получавших Кэмпас пациентов был почти на 30% выше, чем в группе хлорамбуцила (83% против 56%,  $p < 0,0001$ ). Кроме того, у пациентов, закончивших терапию Кэмпасом, было получено в 12 раз больше полных ремиссий (24% против 2%,  $p < 0,0001$ ). Особенно интересен анализ ответа на терапию в зависимости от цитогенетических aberrаций. У больных с высоким риском (делеция 17p) на хлорамбуциле не удалось получить ни одной полной ремиссии, а на Кэмпасе — 27%. Общий ответ на Кэмпас в подгруппе больных с делецией 17p был в 3 раза выше (64%), чем на хлорамбуциле (20%).

Важнейшая задача исследования САМ 307 состояла в установлении характера токсичности монотерапии Кэмпасом у первичных больных. Если применение более токсичных вариантов лечения оправдано в ситуации рецидива, то использование их в терапии первой линии должно быть жестко обосновано. Это объясняет дизайн исследования. В качестве препарата сравнения выбран хлорамбуцил, который, по мнению многих врачей, является наименее токсичным и до сих пор наиболее часто используется у первичных больных В-ХЛЛ. Токсические осложнения III/IV степени наблюдались у 41,5% больных, получавших Кэмпас, и у 21,1% получавших хлорамбуцил. Существенная часть токсических осложнений Кэмпас III/IV степени (13,6%) была связана с внутривенным введением препарата (лихорадка, озноб, тошнота, рвота и гипотензия), что в значительной степени объясняет различие в токсичности. Частота тромбоцитопении и анемии III–IV степени была сравнимой в обеих терапевтических группах. Нейтропения и лейкопения III–IV степени, а также серьезные инфекции (преимущественно обусловленные цитомегаловирусом — ЦМВ) чаще встречались в группе Кэмпаса. В группе хлорамбуцила был зарегистрирован один летальный исход, в группе Кэмпаса смертей не было. Как и ожидалось, частота ЦМВ-инфекции была выше у больных, получавших Кэмпас. Однако частота вирусемии и явной ЦМВ-инфекции была невысока — менее 7%. С каждым случаем вирусемии/инфекции ЦМВ удалось успешно справиться.

Таким образом, исследование САМ307 показывает, что Кэмпас незначительно превосходит хлорамбуцил по токсичности.

Применение Кэмпаса в терапии первой линии В-ХЛЛ можно рассматривать в случаях, если у больного в дебюте или во время прогрессии имеются делеция 17p или 11q.

**Предварительные результаты многоцентрового рандомизированного исследования UK LRF CLL4.** Исследование UK LRF CLL4 (LRF — Leukemia Research Foundation), сравнивающее монотерапию хлорамбуцилом, монотерапию флударабином и комбинацию флударабина и циклофосфана (ФЦ), — одно из наиболее крупных из проведенных до сих пор клинических испытаний в области ХЛЛ. Всего за 5 лет и 9 мес (февраль 1999 г. — ноябрь 2004 г.) включены 783 первичных больных. 78% больных — в Великобритании и 12% — в других странах (Аргентина, Ирландия, Италия, Новая Зеландия и Россия). В группу хлорамбуцила были включены 387 больных, флударабина — 194, ФЦ — 196. Результаты этого исследования были доложены доктором P. Hillmen. Частота полных ремиссий составила 37,5% на комбинации

ФЦ, 15% на монотерапии флударабина и 8% на монотерапии хлорамбуцила. Получены достоверные различия в беспрогрессивной выживаемости. У больных, получавших ФЦ, 5-летняя беспрогрессивная выживаемость составила 32%, у получавших флударабин и хлорамбуцил — 17 и 10% соответственно. Различий в общей выживаемости не было. В исследовании допускалось применение флударабинсодержащих курсов по поводу рецидива. Назначение терапии 2-й линии потребовалось 176 больным: 120 (68%) после хлорамбуцила, 45 (26%) после флударабина и 11 (6%) после ФЦ. Таким образом, при 5-летнем сроке наблюдения число больных, которым потребовалось назначение противорецидивной терапии, было в 10 раз больше в группе хлорамбуцила, чем в группе ФЦ. Данный факт доктор Р. Hillmen назвал ведущей причиной отсутствия преимуществ в общей выживаемости между группами.

Комбинация ФЦ оказалась значительно эффективнее во всех возрастных группах. Из 783 больных 30% были моложе 60 лет, 30% — старше 70 лет. Частота полных и частичных ремиссий у больных старше 70 лет, получавших ФЦ, составила 59%, у больных моложе 60 лет — 62%. Существенных различий в токсичности в зависимости от возраста не было. Это показывает, что флударабинсодержащие курсы могут применяться и у пожилых больных.

Токсичность курса ФЦ превосходила токсичность хлорамбуцила, однако различий в смертности и частоте угрожающих жизни инфекций не было. Основные различия касались частоты нейтропении. ФЦ вызвал нейтропению III/IV степени на 55% курсов, флударабин — на 40% и хлорамбуцил — на 29%. Интересно, что частота развития аутоиммунной гемолитической анемии была наибольшей у больных, получавших хлорамбуцил (13%), и наименьшей у больных, получавших ФЦ (4%). Монотерапия флударабином осложнилась аутоиммунной гемолитической анемией (АИГА) у 10% больных. Важнейший вывод этого исследования состоит в том, что частота АИГА у получавших ФЦ была значительно ниже. Этот вывод подтверждается данными немецкого исследования GCLLSG CLL4. Таким образом, это исследование наряду с другими ставит точку в истории длительных опасений частой провокации флударабином аутоиммунного гемолиза. Развитие гемолитической анемии — свойство ХЛЛ. Адекватный контроль над опухолью снижает вероятность АИГА.

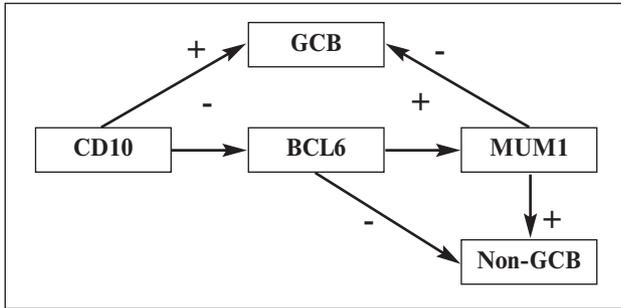
Таким образом, обзор докладов, представленных на ЕНА 2006, показывает значительный прогресс в тактике ведения В-ХЛЛ. Основные изменения состоят в том, что терапия становится адаптированной к риску, а также в том, что на смену паллиативному подходу приходит новая тактика — достижение как можно более полных и длительных ремиссий. Это обусловлено расширением терапевтического арсенала и лучшим пониманием биологии В-ХЛЛ. Имеются реальные предпосылки к пересмотру классификации В-ХЛЛ. До сих пор выбор тактики ориентирован на стадии параметр, который в большей степени отражает массу опухоли, но не реальную биологическую гетерогенность. Сегодня появилась возможность выделять биологически гетерогенные группы больных, в каждой из которых могут применяться специфические варианты лечения.

### Злокачественные лимфомы

(Подготовлено Г.С. Тумян,  
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН)

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) является наиболее распространенным гистологическим вариантом неходжкинских лимфом и объединяет большую гетерогенную группу опухолей, различающихся по морфологической характеристике, клиническому течению и прогнозу. Молекулярно-генетический анализ опухолевой ткани, включающий изучение примерно 12 000 генов, выявил различия в профиле экспрессии ключевых генов, на основании которых были идентифицированы 3 основных подтипа ДВКЛ (А.А. Alizadeh; Nature 2000;403:503–11). Лимфома из В-клеток герминального центра (germinal center B-cell like type — GCB) является наиболее частым подтипом ДВКЛ, при котором опухолевые клетки экспрессируют большинство генов, характерных для экспрессии нормальных В-клеток герминального центра (*CD10*, *BCL6*, *SERPINA9*, *GCET2*). Этот подтип лимфомы ассоциируется с благоприятным течением заболевания — 5-летняя выживаемость больных составляет 60% (А. Rosenwald; N Engl J Med 2002;346:1937–47). Второй подтип ДВКЛ по профилю экспрессии генов относится к активированным В-клеткам крови (activated B-cell — ABC), для которых характерна высокая экспрессия ядерных транскрипционных факторов (NFkB). Этот подтип ДВКЛ имеет наиболее неблагоприятный прогноз — 5-летняя выживаемость больных не превышает 35%. И, наконец, идентифицирована третья молекулярная подгруппа ДВКЛ, характерная для первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (primary mediastinal large B-cell lymphoma — PMBL), которая по профилю экспрессии генов отличается от GCB- и ABC-подтипов ДВКЛ и в то же время имеет большое сходство на молекулярном уровне с лимфомой Ходжкина. Это наиболее благоприятная по клиническому течению группа больных, у которых 5-летняя выживаемость превышает 60%. Результаты последних исследований показали, что примерно в 25% случаев диагноз первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы был установлен ошибочно на основании клинических и иммуноморфологических данных, в то время как по профилю экспрессии генов эти случаи относятся либо к GCB-, либо к ABC-подтипу ДВКЛ с преимущественным массивным поражением ростостения. Эти данные могут объяснить несколько противоречивые результаты оценки эффективности лечения и прогноза при первичной медиастинальной лимфоме, полученные разными исследовательскими центрами.

Поскольку анализ профиля экспрессии генов не может выполняться рутинно во всех лечебных учреждениях, С.Р. Hans и соавт. предложили менее сложный алгоритм иммуногистохимического исследования опухолевой ткани, учитывающий экспрессию антигенов *CD10*, *BCL6*, *MUM1* (см. рисунок). Результаты этого анализа позволяют разделить ДВКЛ на две подгруппы в зависимости от отношения к герминальному центру — GCB и non-GCB (из В-клеток негерминального центра). Такое разделение имеет важное клиническое значение (М. Berglund; Mod Pathol 2005;18:1113–20), поскольку различия в сроках жизни больных в этих подгруппах сохраняются (благоприятное течение при ДВКЛ GCB-типа и неблагоприятное при ДВКЛ non-GCB-типа).



Алгоритм иммуногистохимического исследования опухолевой ткани (по Hans C.P. и соавт.; Blood 2004; 103:275–82)

Помимо разного молекулярного профиля экспрессии генов в основе развития ДВКЛ лежат различные онкогенные события и патогенетические механизмы. Так, гиперэкспрессия антиапоптотического белка BCL2 при ДВКЛ типа является итогом транслокации t(14;18)(q32;q21), которая встречается при этом подварианте лимфом примерно в 45% случаев. В то же время гиперэкспрессия белка BCL2 при ДВКЛ ABC-типа связана с активацией ядерных транскрипционных факторов NFκB. Этим можно объяснить несоответствие результатов различных исследовательских групп, изучающих влияние экспрессии BCL2 на прогноз ДВКЛ. В частности, неблагоприятное влияние экспрессии BCL2 на течение заболевания сохраняется только в подгруппе больных с ДВКЛ ABC-типа (J. Iqbal; J Clin Oncol 2006).

Таким образом, становится очевидным, что различия в клиническом течении ДВКЛ имеют под собой молекулярно-генетическое обоснование, и задачей ученых становится практическое применение полученных научных данных. Пока же при составлении программ лечения учитываются первичная локализация болезни (нодальная/экстранодальная лимфома), возраст больных и разная степень распространения опухолевого процесса, которая оценивается согласно Международному прогностическому индексу (International Prognostic Index – IPI). Определены 3 прогностические группы больных ДВКЛ, которым необходимо планировать разный объем лечения:

- молодые больные с благоприятным прогнозом (IPI=0,1);
- молодые больные с неблагоприятным прогнозом (IPI≥2);
- пожилые больные.

Стандартом лечения молодых больных ДВКЛ с благоприятным прогнозом являются 6 курсов химиотерапии по программе R+СНОР-21. Преимущества схемы СНОЕР-14 над стандартной схемой СНОР-21, выявленные немецкой группой по изучению лимфом в большом рандомизированном исследовании, были нивелированы добавлением ритуксимаба (M. Pfreundschuh; Blood 2004;04:48a). Необходимость проведения лучевой терапии на исходные зоны поражения в данной подгруппе больных оспаривается некоторыми исследовательскими группами. В частности, французские ученые (GELA) не выявили различий в отдаленных результатах лечения в группах больных, получавших только химиотерапию или химиолучевое лечение (F. Reyes; Blood 2002;100:93).

На сегодняшний день единый подход в лечении молодых больных ДВКЛ с неблагоприятным прогнозом не

разработан. Нет четких данных, которые бы показали преимущества добавления ритуксимаба к химиотерапии, в то же время проведение контролируемых исследований в этом направлении затруднено (очевидно, что схема СНОР не является адекватной для данной группы больных, в связи с чем оставлять эту программу в качестве одного из рандомизационных направлений неэтично по отношению к больным). В настоящее время продолжается сравнительное изучение эффективности различных режимов для молодых больных с неблагоприятным прогнозом (8R+СНОЕР-14 против 4R+ABCVP). Проведение высокодозного лечения с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток в качестве консолидации в первой ремиссии рекомендовано только в рамках клинических исследований.

Пожилым больным с ДВКЛ рекомендовано лечить по программе 6R+СНОР-14. Не рекомендовано проводить поддерживающее лечение ритуксимабом в том случае, если больные на этапе индукции уже получили ритуксимаб в комбинации с химиотерапией.

Для корректного проведения клинических исследований и правильной оценки полученных результатов в 2002 г. была создана международная группа, которая занимается стандартизацией подходов при злокачественных лимфомах (International Harmonization of Parameters in Malignant Lymphoma). Широкое внедрение новых методов, как имеющих диагностическое значение, так и расширяющих возможности оценки резидуальной болезни (позитронно-эмиссионная томография – ПЭТ, иммуногистохимический анализ, проточная цитометрия), требует пересмотра старых критериев эффективности лечения. Окончательные итоги международного проекта планируется опубликовать в декабре 2006 г. (B.D. Cheson; Blood 2005;106:A18).

Терапия больных лимфомой Ходжкина (ЛХ) основана на дифференцированном подходе к различным прогностическим группам. Эти группы формируются с учетом неблагоприятных факторов риска, отражающих, по сути, объем опухолевой массы (bulky disease, E-стадия, более 3 зон поражения). Больным с благоприятным прогнозом (ранние I–II стадии без факторов риска) рекомендовано лечение по схеме АВВД с дальнейшим облучением зон исходного поражения. Задачей ученых в настоящее время является уточнение оптимального объема химиотерапии (2ABVD против 4ABVD) и максимально эффективной дозы лучевого воздействия (30 Гр против 20 Гр). Необходимы длительные сроки наблюдения, чтобы определить, является ли редуцированный объем лечения достаточным для контроля болезни и способствует ли его использование уменьшению частоты поздних осложнений, индуцированных противоопухолевым лечением (вторые опухоли, кардиопульмональные осложнения).

Больным промежуточной прогностической группой (ранние I–II стадии с факторами риска) проводится лечение по схеме 6 АВВД+облучение исходных зон поражения. Широкое внедрение новых методов диагностики (ПЭТ) позволяет изменять объем лечения в зависимости от полученного противоопухолевого ответа. Так, в настоящее время проводится клиническое исследование, в котором больным с ЛХ после 2 курсов АВВД выполняется ПЭТ, при констатации полной ремиссии больные получают еще 4 курса АВВД без дальнейшей лучевой терапии, при позитивных результатах ПЭТ рекомендована интен-



Результаты исследований по использованию велкейда у больных с рецидивами ММ не выявили неблагоприятного влияния на непосредственную эффективность и выживаемость повышения уровня  $\beta_2$ -микроглобулина и делеции 13q. Это показывает, что прогностические факторы, имеющие значение у пациентов, получающих стандартную химиотерапию и ВДХ, не являются универсальными и при лечении велкейдом не оказывают неблагоприятного влияния.

**Лечение пожилых больных.** Выбор программы терапии больных ММ с впервые установленным диагнозом зависит в значительной степени от возраста. Для лечения пациентов моложе 65 лет терапией выбора является ВДХ мелфаланом с трансплантацией аутологичных ГСК, в то время как химиотерапия в стандартных дозах остается наиболее подходящей для лечения больных пожилого возраста. Тем не менее проводятся исследования по изучению эффективности ВДХ с аутотрансплантацией ГСК у пожилых больных. На основании анализа результатов ВДХ с аутотрансплантацией ГСК у пожилых пациентов сделан вывод о том, что токсичность, связанная с ВДХ, обычно сводит на нет преимущество ВДХ над стандартной химиотерапией. Однако у отдельных больных при отсутствии медицинских противопоказаний ВДХ мелфаланом в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> может быть выполнена. Не следует исключать больных из программы ВДХ только из-за пожилого возраста.

#### Новые лекарственные препараты

**Талидомид.** Представлены данные об эффективности талидомида при рецидивах и резистентной ММ на большом клиническом материале. Согласно результатам многочисленных исследований, в которые вошло более 1200 больных, эффективность препарата составляет от 25 до 66% (медиана 42%). В 30% случаев удается получить частичную ремиссию.

Так как препарат не вызывает серьезной миелосупрессии, его успешно используют в сочетании с известными химиопрепаратами и новыми лекарственными средствами. Выявлена высокая эффективность сочетания талидомида с дексаметазоном при лечении рефрактерной ММ. От 35 до 55% (медиана 47%) больных достигают как минимум частичной ремиссии. Частота достижения частичного ответа еще выше (55–75%) при сочетании талидомида с циклофосфаном, мелфаланом или вепезидом.

Данные, представленные на конгрессе, свидетельствуют также об успешном использовании комбинированной терапии талидомидом, дексаметазоном и велкейдом у больных с рефрактерной ММ. Показано, что частота достижения как минимум частичных ремиссий составляет 71%.

В настоящее время использование талидомида в монорежиме или в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами рассматривают как стандартную терапию для лечения рецидивов и рефрактерной ММ.

Последней ступенью изучения эффективности талидомида стала оценка его противоопухолевого действия у первичных больных ММ. Согласно представленным данным, сочетание талидомида и дексаметазона позволяет получить как минимум частичную ремиссию в 63–76% случаев первичной ММ, что превосходит по эффективности лечение дексаметазоном и терапию по схеме ВАД.

На конгрессе обсуждали данные сравнительного исследования эффективности индукционной терапии по схеме ТАД (талидомид, дексаметазон, доксорубин) и традиционной полихимиотерапии (ПХТ) по схеме ВАД перед ВДХ с аутотрансплантацией ГСК, проведенного группой HOVON/GMMG. Хотя лечение по схеме ТАД оказалось эффективнее ПХТ по схеме ВАД (частота достижения частичных и полных ремиссий составила 80 и 63% соответственно), после ВДХ разницы в эффективности лечения по этим двум программам выявлено не было. Но еще раз был подтвержден факт, что использование талидомида перед ВДХ не препятствует сбору ГСК и приживлению аутотрансплантата.

Интересной представляется информация о поддерживающей терапии талидомидом. В исследовании французской группы показано, что при поддерживающем лечении талидомидом 4-летняя выживаемость, свободная от прогрессирования, составляет 50%, в то время как в контрольной группе — 39%.

**Леналидомид** (Ревлимид, СС-5013) является новым иммуномодулирующим лекарственным средством — аналогом талидомида. Согласно данным III фазы клинического исследования, сочетание леналидомида с дексаметазоном, вводимыми внутрь, является эффективным и хорошо переносимым методом лечения рецидивов и рефрактерной ММ. При длительности исследования 18 мес медиана времени до прогрессирования в группе больных, получавших леналидомид с дексаметазоном, составила 13,3 мес, а в группе больных, леченных дексаметазоном, — 5,1 мес. Общая эффективность лечения была выше у пациентов, получавших леналидомид с дексаметазоном, чем при лечении дексаметазоном в монорежиме (58 и 22% соответственно).

Эффективность леналидомида при рецидивах и рефрактерной ММ оценена и в сочетании с другими противоопухолевыми средствами, такими как липосомальный доксорубин, винкристин и дексаметазон (ДВД-Р). По предварительным данным, частота достижения полных и частичных ремиссий составляет 60%. При использовании сочетания леналидомида и велкейда в 59% случаев при рецидивах и рефрактерной ММ можно получить как минимум частичную ремиссию.

Предварительные данные свидетельствуют о высокой эффективности сочетания леналидомида с дексаметазоном и сочетания леналидомида с кларитромицином и дексаметазоном у первичных больных, частота достижения как минимум частичных ремиссий составила 91 и 86% соответственно. Наиболее частыми нежелательными явлениями при лечении леналидомидом являются нейтропения (III степени в 17–30% случаев) и тромбозы глубоких вен (8–15%).

**Актимид** (СС-4047) является вторым новым иммуномодулирующим лекарственным средством — аналогом талидомида. Опыт применения актимиды пока небольшой. При оценке эффективности препарата у 44 больных с рефрактерной ММ в 77% случаев получен полный или частичный эффект. К сожалению, отмечена значительная токсичность. У 57% больных отмечена нейтропения, в 16% случаев тромбозы глубоких вен и выявлен факт тератогенности препарата.

**Велкейд** (бортезомиб, PS-341) представляет собой новый класс противоопухолевых лекарственных средств и является ингибитором протеосомного комплекса. Результаты

клинических исследований показали высокую эффективность велкейда при рецидивах и резистентной ММ.

На конгрессе обсуждали результаты двух исследований II фазы SUMMIT и CREST, в которых оценена эффективность препарата при рецидивах и рефрактерной ММ. Велкейд назначали в дозе 1,3 мг/м<sup>2</sup> в 1, 4, 8 и 11-й дни цикла каждые 3 нед. При недостаточном эффекте терапии добавляли дексаметазон. Общая эффективность лечения составила 35%, в 10% случаев получена полная ремиссия, медиана выживаемости 17 мес.

Представлены данные исследования III фазы APX, в котором показана более высокая эффективность велкейда, чем дексаметазона (43 и 18% соответственно). Медиана выживаемости до прогрессирования в группе больных, леченных велкейдом, составила 6,2 мес, а в группе больных, получавших дексаметазон, — 3,4 мес, выживаемость в течение года составила 80 и 67% соответственно.

Кроме того, представлены данные об эффективности сочетания велкейда с химиопрепаратами и дексаметазоном, а также новыми лекарственными средствами при рецидивах и рефрактерной ММ. В этих исследованиях показана высокая эффективность сочетания велкейда с мелфаланом (50%), доксилом (73%). Добавление дексаметазона к велкейду и химиопрепаратам повышает частоту достижения ответа до 75–88%. Сочетание велкейда с талидомидом или ревлимидом эффективно приблизительно у 70% больных. С 2005 г. в США и Европе препарат вошел в клиническую практику для лечения рецидивов и резистентной ММ.

Высокая эффективность велкейда показана у первичных больных ММ. В 59% случаев получен ответ, при этом в 11% — полная ремиссия. Добавление к велкейду дексаметазона существенно улучшает результаты лечения и повышает эффективность до 80–90%. Подобные результаты (90% общая эффективность, 15–20% полных или почти полных ремиссий) получены при применении схемы ПАД (PS-341, адриамицин и дексаметазон) и схемы ВТД (велкейд, талидомид, дексаметазон). Кроме того, было показано, что применение сочетания велкейда с дексаметазоном, а также схем химиотерапии ПАД и ВТД не препятствует сбору ГСК и приживлению трансплантата.

Важным аспектом всех исследований стало выявление токсичности велкейда как в монорежиме, так и в сочетании с химиопрепаратами. Сообщено, что из нежелательных явлений III степени наиболее часто встречаются следующие: слабость, желудочно-кишечные симптомы,

циклическая тромбоцитопения, периферическая нейропатия, проявления которой полностью проходят или уменьшаются у большинства больных после прекращения или прерывания лечения препаратом.

### **Новые режимы химиотерапии для лечения больных ММ, которые не являются кандидатами для ВДХ**

**Талидомид.** Представлены результаты двух крупных рандомизированных исследований, посвященных сравнению эффективности сочетания талидомида с мелфаланом и преднизолоном (МПТ) и терапии мелфаланом и преднизолоном (МП) у первичных пожилых больных ММ. В исследовании итальянской группы (GIMEMA) больные получали курсы МП или МПТ с ежедневным приемом 100 мг талидомида во время МП-терапии и затем в качестве поддерживающей терапии до рецидива. Полные или почти полные ремиссии получены у 27,9% больных, получавших МПТ, а при МП — в 7,2% случаев. Бессобытийная 2-летняя выживаемость составила 54% в группе больных, получавших МПТ, и 27% в группе МП. Токсичность, в частности тромбозы глубоких вен, инфекции и нейропатия, развивалась чаще при лечении по программе МПТ.

В исследовании французской группы больные получали МП или МПТ с ежедневной дозой талидомида от 400 мг до максимально переносимой без поддерживающего лечения. При медиане наблюдения 32,2 мес медиана выживаемости, свободной от прогрессирования, составила 17,1 и 27 мес для групп МП и МПТ соответственно, а общая выживаемость — 30,3 и 38,6 мес соответственно. Кроме того, третья группа больных получила ВДХ мелфаланом 100 мг/м<sup>2</sup>. Статистически достоверной разницы между лечением МП и ВДХ мелфаланом не выявили.

**Леналидомид.** В настоящее время проводится изучение эффективности сочетания леналидомида с МП-терапией. По предварительным данным, эффективность лечения составляет 70%, включая 10% полных ремиссий.

**Велкейд.** Представлены данные об эффективности сочетания велкейда с МП-терапией (ВМП) у первичных пациентов старше 65 лет. Частота достижения полных и частичных ремиссий составила 86%, из них в 30% получена полная ремиссия. По данным исторического контроля, частота полных и частичных ремиссий на МП-терапии составила 42%. Бессобытийная выживаемость в группе ВМП на 18 мес наблюдения составила 85%, а выживаемость, свободная от прогрессирования, — 93%. Нежелательные явления III степени включали миелосупрессию, периферическую нейропатию, инфекции и диарею.

*Уважаемые коллеги!*

**Подписаться на журнал «ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ»  
на 2007 г. можно в любом отделении связи.**

**Подписной индекс в каталоге «Почта России» — 12313.**

**Уважаемые коллеги!**

**Скоро выходит из печати  
второе издание руководства  
«КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ»  
под редакцией проф.  
М.А. Волковой.**

Второе издание значительно расширено по сравнению с первым, в нем нашло отражение то новое, что появилось как в понимании биологических процессов при гемобластозах, так и в их терапии за 6 лет, прошедших со времени выхода первого издания. Кроме того, в руководстве появились новые разделы, которых не было в предыдущем издании и которые нам кажутся полезными для читателей, например, большая глава об эпидемиологии гемобластозов, главы о теломерах и теломеразе, вирусных гемобластозах, механизме действия основных лекарственных средств, применяемых для лечения опухолевых заболеваний крови. Значительно расширена клиническая часть. Появились отдельная глава о патогенезе лимфопролиферативных заболеваний, главы о Т-клеточных хронических лейкозах и гистиоцитозах, что восполняет пробел первого издания. В главы о лимфомах и

лейкозах введено все новое, что является значительным для понимания сущности заболеваний и для их лечения. Например, приведены последние данные о результатах терапии хронического миелолейкоза гливекком, о причинах развития резистентности к гливекку и о новых ингибиторах abl-тирозинкиназы, отдаленных результатах терапии волосатоклеточного лейкоза кладрибином, новых препаратах в лечении множественной миеломы.

Руководство состоит из 5 разделов: кроветворение, молекулярно-биологические изменения в злокачественных клетках при гемобластозах, клеточно-молекулярные механизмы лекарственной терапии, гемобластозы (эпидемиология, классификация, диагностика, клиника и терапия), осложнения, возникающие при гемобластозах, и их лечение. В клиническом разделе представлена классификация гемопоэтических и лимфоидных опухолей ВОЗ 2001 г. и даны комментарии к ней, в отдельных главах приведены главные из уточнений и дальнейших разработок этой классификации. Нам кажется, что читателю должен быть весьма интересен последний раздел книги, в котором рассматриваются основные ос-

ложнения, возникающие в результате как самого патологического процесса, так и проводимой терапии. Особое внимание уделено метаболическим нарушениям, бактериальным и грибковым инфекциям.

В подготовке руководства приняли участие 54 специалиста, многие годы работающие над изучением проблем, освещенных в руководстве.

Книга снабжена многочисленными рисунками и цветными микрофотографиями, которые помогут в понимании изложенных материалов. В каждой главе имеется обширный библиографический указатель, который при желании может быть использован для более глубокого ознакомления с проблемой.

**По наименьшей цене руководство будет продаваться Ассоциацией медицинской литературы по адресу: 129323 Москва, Лазоревый пр., д. 3, стр. 2. ЗАО АМЛ.**

**Обращаться к САБЛИНУ**

**Михайлу Григорьевичу.**

**Телефон: (495) 189-77-53.**

**Книга может быть заказана  
и выслана почтой.**

## П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

1. Статьи, направляемые в журнал «Онкогематология», должны быть представлены на дискете или CD-носителях (электронная версия) с распечаткой на бумаге в одном экземпляре. Желательно 14-м шрифтом. К статьям, содержащим собственные данные (это относится и к описаниям случаев), должны быть приложены резюме на русском и желателно на английском языках объемом не более 1/3 машинописной страницы.
2. В выходных данных следует указать: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, название учреждения, город. В конце статьи обязательно следует дать контактные телефоны, адрес электронной почты и Ф.И.О. авторов или автора для связи.
3. Если статья сопровождается рисунками и таблицами, ссылки на них в тексте обязательны.
4. Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными подписями. На рисунке указываются: «верх» и «низ»; фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т.д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисовочной подписи. Если рисунки представляются только в электронном варианте, подписи к ним должны быть даны там же, а также на отдельном листе.
5. Все таблицы должны быть пронумерованы и иметь заголовки. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.
6. Список литературы приводится в порядке цитирования. Для каждого источника необходимо указать: Ф.И.О. авторов (если авторов не более четырех, то перечислить все их фамилии. Если более четырех, следует указать фамилии

и инициалы трех первых авторов, а вместо перечисления остальных ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском текстах). Также следует дать название книги или статьи, название журнала, год, том и номер выпуска (для книги — место издания, название издательства, год).

7. Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи при употреблении в первый раз должны быть полностью расшифрованы.
8. Все замечания, пожелания и предложения по тексту статьи, сделанные членами редколлегии или рецензентами, будут сообщены автору. После внесения автором необходимой правки статья снова будет просмотрена членом редколлегии и, если это будет необходимо, снова будет сообщено автору о сделанных замечаниях. Никакой правки без ведома автора вноситься не будет, поэтому не забывайте, пожалуйста, сообщать адрес той электронной почты или (в крайнем случае) телефона, по которым с вами можно связаться.

**Журнал «ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ» приглашает всех  
к активному сотрудничеству.**

**Связываться можно с любым из следующих членов редколлегии:**

**Главный редактор — Майя Александровна ВОЛКОВА.**

**Телефон: 324-28-24,**

**электронный адрес: volkova@orc.ru**

**Заместитель главного редактора —**

**Евгений Александрович ОСМАНОВ.**

**Телефон: 324-28-14**

**Ответственный секретарь — Антон Дмитриевич ШИРИН.**

**Телефон: 324-28-14, электронный адрес: shirin-crc@mtu-net.ru**

**Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24,**

**Отделение химиотерапии гемобластозов.**