

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Лечение пожилых пациентов
с множественной миеломой**

**Факторы риска
цитомегаловирусной инфекции
у пациентов после ТГСК**

**Инфантильная
(злокачественная) форма
остеопетроза**

**Молекулярные механизмы
лейкозогенеза:
цикл лекций для врачей**

4

Энплейт ромиплостим

ПРЕПАРАТ НОВОГО ТИПА! Новый подход к лечению хронической ИТП у взрослых



Уверенность в оптимальном уровне тромбоцитов

- Энплейт — это первый препарат, благодаря которому контролируется уровень тромбоцитов¹⁻².
- Энплейт эффективен у 83% больных в исследованиях 3-й фазы в сравнении с 7% пациентов в контрольной группе³.
- Стойкий ответ со снижением потребности в иммунодепрессантах.

Краткая информация о препарате ЭНПЛЕЙТ (NPLATE) ромиплостим (romiplostim)

Порошок для приготовления раствора для подкожного введения 250 мкг, 500 мкг (500 мкг/мл).

ПОЖАЛУЙСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ПОЛНОЙ ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ПРЕПАРАТА.

Регистрационный номер: ЛСР-007739/09 от 01.10.2009 г.

● **Фармакологические свойства.** Ромиплостим производится путем рекомбинантной ДНК-технологии с использованием штамма *Escherichia coli* (E. coli). Ромиплостим представляет собой Fc-пептидированный белок (пептидное антигено), участвующий в проведении сигнала и активации внутриклеточной транскрипции посредством связывания с рецепторами тромбопоэтина и индуцирующий увеличение образования тромбоцитов. ● **Показания к применению.** Хроническая идиопатическая (иммунная) тромбоцитопеническая пурпура у взрослых пациентов после спленэктомии, резистентных к другим видам лечения (например, глюкокортикостероидам, иммуноглобулинам). Энплейт может применяться в качестве терапии второй линии у пациентов с сохраненной селезенкой при противопоказаниях к спленэктомии. ● **Противопоказания.** Гиперчувствительность к действующему веществу препарата, к любому из вспомогательных веществ или к белкам E. coli. ● **Способ применения.** После разведения порошка раствором для инъекций Энплейт следует вводить подкожно. Объем инъекции может быть очень небольшим. Следует использовать шприц с делениями по 0,01 мл. ● **Начальная доза.** Начальная доза ромиплостима составляет 1 мкг/кг фактической массы тела. При расчете дозы ромиплостима в начале лечения всегда следует использовать расчет относительно массы

тела. При последующей коррекции дозы следует основываться исключительно на изменениях количества тромбоцитов и увеличивать дозировку на 1 мкг. ● **Подбор дозы.** Ежедневную дозу ромиплостима следует повышать с шагом 1 мкг/кг массы тела до тех пор, пока количество тромбоцитов у пациента не достигнет $\geq 50 \times 10^9/\text{л}$. Количество тромбоцитов следует оценивать ежедневно до тех пор, пока не будет достигнуто стабильное количество ($\geq 50 \times 10^9/\text{л}$ по крайней мере в течение 4 недель без коррекции дозы). В дальнейшем следует оценивать количество тромбоцитов ежемесячно. Не следует превышать максимальную ежедневную дозу 10 мкг/кг. ● **Прекращение лечения.** Лечение ромиплостимом следует прекратить, если количество тромбоцитов не увеличивается до уровня, достаточного для предотвращения клинически значимого кровотечения после 4 недель терапии ромиплостимом в максимальной дозе 10 мкг/кг. Необходимо периодическое клиническое обследование пациента, и на индивидуальной основе врач должен принимать решение о продолжении лечения. После отмены лечения возможен рецидив тромбоцитопении. Подробная информация о режиме дозирования приведена в инструкции по применению препарата. ● **Побочное действие.** Очень часто ($\geq 1/10$) отмечалась головная боль; часто ($>1/100$ — $<1/10$) — изменения костного мозга, тромбоцитопения, бессонница, головокружение, парестезии, мигрень, гиперемия, легочная эмболия, тошнота, диарея, боль в животе, диспепсия, запор, зуд, экхимозы, сыпь, артралгия, миалгия, боль в конечностях, мышечный спазм, боль в спине, боль в костях, утомляемость, покраснение в месте инъекции, боль в месте инъекции, периферический отек, гриппоподобный синдром, боль, астения, лихорадка, озноб, гематома в месте инъекции, уплотнение в месте инъекции, ушиб. Также поступали отдельные сообщения о развитии следующих реакций: тромбоцитоз, тромбоцитопения

после прекращения лечения, повышение концентрации ретикулина в костном мозге. ● **Особые указания.** Как и все терапевтические протеины, ромиплостим обладает потенциальной иммуногенностью. В случае подозрения на образование нейтрализующих антител следует связаться с официальным представителем компании в Российской Федерации для проведения анализа на антитела. После отмены ромиплостима возможен рецидив тромбоцитопении. В случае если отмена ромиплостима происходит на фоне применения антикоагулянтов или антиагрегантов, повышается риск кровотечения. Перед началом и во время лечения ромиплостимом рекомендуется проводить исследования мазка периферической крови и подсчет количества клеток крови, в т.ч. для своевременного определения повышения концентрации ретикулина. В случае потери эффективности, или обнаружения патологии в мазке периферической крови у пациента следует отменить ромиплостим, провести физикальное обследование и рассмотреть вопрос о проведении биопсии костного мозга с окрашиванием на ретикулин. Стимуляторы рецепторов ТПО являются факторами роста, которые приводят к росту клеток — предшественников гемопоэза, дифференцировке и выработке тромбоцитов. Рецепторы ТПО преимущественно располагаются на поверхности клеток миелоидного ряда. Существует теоретический риск, что стимуляторы рецепторов ТПО могут стимулировать прогрессирование имеющихся злокачественных заболеваний системы кроветворения или МДС. При потере ответа на лечение или невозможности поддержания стабильного количества тромбоцитов при лечении ромиплостимом в рекомендованных дозах необходимо установить причинные факторы, включая иммуногенность и увеличение концентрации ретикулина в костном мозге.

AMGEN

000 «Амджен»

123317, Москва, Пресненская набережная, дом 10, блок С, 4-й этаж.

Тел.: +7 (495) 641-18-68 • Факс: +7 (495) 641-18-72

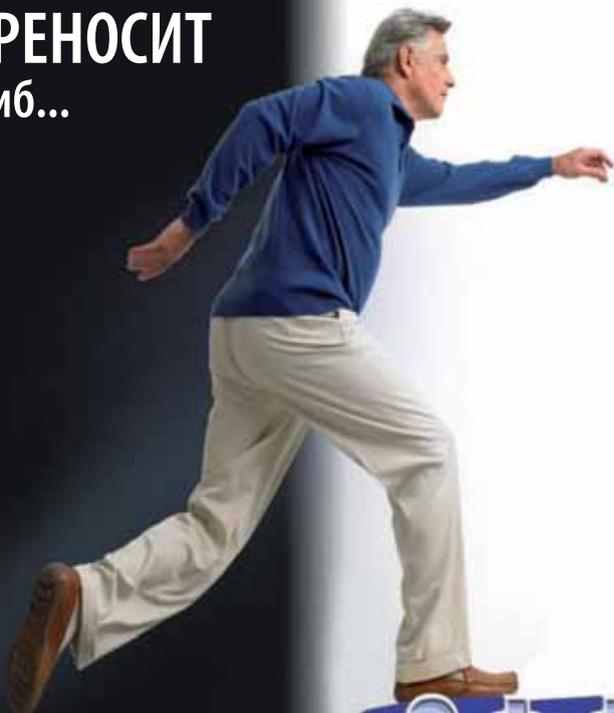
AMG-RU-NPL-013-2010

Ссылки: 1. Инструкция по препарату Энплейт. 2. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J. Clin. Invest. 2005; 115: 3339—3347. 3. Kuter D. J., Bussell J. B., Lyons R. M., et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. Lancet. 2008; 371: 395—403.

Если пациент
в хронической фазе
хронического
миелолейкоза

РЕЗИСТЕНТЕН
к иматинибу или
НЕ ПЕРЕНОСИТ
иматиниб...

ПЕРЕВЕДИТЕ ПАЦИЕНТА
НА СПРАЙСЕЛ В ДОЗЕ 100 МГ
ОДИН РАЗ В СУТКИ



НЕУДАЧА
НА ИМАТИНИБЕ*

ЭФФЕКТИВНО
НАДЕЖНО
ПРОСТО

Спрайсел показан для лечения взрослых пациентов с хроническим миелолейкозом в хронической фазе, фазе акселерации или фазе миелоидного или лимфоидного бластного криза при резистентности или непереносимости предыдущей терапии, включая иматиниб

Спрайсел также показан для лечения взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом с положительной Филадельфийской хромосомой при резистентности или непереносимости предыдущей терапии

(1) Спрайсел. Инструкция по медицинскому применению препарата. Росздравнадзор.

(*) в соответствии с рекомендациями ELN 2009

 Bristol-Myers Squibb

СПРАЙСЕЛ
Дазатиниб

Эральфон®

эпоэтин альфа

Эра новой жизни!



Препарат рекомбинантного эритропоэтина человека
Средство для профилактики и лечения анемии:

- Нефрология/Гемодиализ
- Онкология
- Акушерство/Гинекология
- ВИЧ (СПИД)
- Ревматология
- Неонатология

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

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOHEMATOLOGY

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

проф., д.м.н. Е.В. Самочатова

Заместители главного редактора

д.м.н. В.В. Птушкин,

проф., д.м.н. Б.В. Афанасьев

Ответственный секретарь

к.м.н. Ю.В. Румянцева

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

проф., д.м.н. О.В. Алейникова (Минск)

проф., д.м.н. А.К. Голенков (Москва)

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

д.м.н. Е.Н. Паровичникова (Москва)

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

доц., д.м.н. М.Л. Минков (Австрия)

д.м.н. Н.В. Мякова (Москва)

к.м.н. Е.А. Никитин (Москва)

проф., д.м.н. О.А. Рукавицын (Москва)

проф., д.м.н. С.А. Румянцев (Москва)

д.м.н. Г.И. Сидорович (Москва)

к.м.н. Л.Г. Фечина (Екатеринбург)

д.м.н. А.Л. Усс (Минск)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

проф., д.м.н. Е.А. Лукина (Москва)

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

чл.-корр. РАМН А.Г. Румянцев (Москва)

к.м.н. В.А. Россиев (Самара)

проф., д.м.н. А.Г. Талалаев (Москва)

EDITOR-IN-CHIEF

Prof. Ye.V. Samochatova

Deputy Editor

D. Sci. V.V. Ptushkin,

Prof. B.V. Afanasiev

Executive Secretary

PhD Yu.V. Rumyantseva

EDITORIAL BOARD

Prof. O.V. Aleynikova (Minsk)

Prof. A.K. Golenkov (Moscow)

Prof. A.I. Karachunskiy (Moscow)

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

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

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

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

PhD Ye.A. Nikitin (Moscow)

Prof. O.A. Rukavitsyn (Moscow)

Prof. S.A. Rumyantsev (Moscow)

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

PhD L.G. Fechina (Yekaterinburg)

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

EDITORIAL COUNCIL

Prof. Ye.A. Lukina (Moscow)

Prof. I.V. Poddubnaya (Moscow)

Prof. A.G. Rumyantsev (Moscow)

PhD V.A. Rossiye (Samara)

Prof. A.G. Talalayev (Moscow)

О с н о в а н в 2 0 0 5 г.

Адрес редакции:
Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.

Тел./факс: +7 (499) 929-96-19

www.abvpress.ru

e-mail: abv@abvpress.ru

Заведующая редакцией Т.В. Клоковкина

Корректор А.Ф. Фомина

Дизайн и верстка Е.В. Степанова

Служба подписки и распространения

В.Ю. Тимохина, +7 (499) 929-96-19,

baza@abvpress.ru

Служба рекламы

В.А. Клоковкин, +7 (499) 929-96-19,

gm@abvpress.ru

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

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

Редакция не несет ответственности за содержание публикуемых рекламных материалов.

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

ISSN 1818-8346
Онкогематология. 2010. №4. 1—60
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2010

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии
ООО «Графика»

Тираж 1500 экз.

2010

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

С.С. Бессмельцев, Л.В. Стельмашенко, Е.В. Карягина, Н.В. Степанова, Г.Н. Салогуб, Т.Л. Шелковская, Т.А. Малахова, И.А. Скороход, Э.И. Подольцева, Н.О. Сараева, О.И. Ковалев, А.В. Климович, Н.В. Медведева, К.М. Абдулкадыров, Л.И. Крылова, Т.Г. Потрачкова, М.А. Новикова, Е.Р. Мачюлайтене, Е.И. Дарская, Л.М. Матюхина, Н.А. Котова, О.Я. Костина, И.А. Новокрещенова

Лечение пожилых пациентов с множественной миеломой на современном этапе 6

В.Н. Чеботкевич, В.В. Бурyleв, Е.И. Кайтанджан, С.С. Бессмельцев, Е.Р. Шилова, С.Б. Яцышина, А.В. Кудрявцева

Этиологические и клинические особенности инфекционных осложнений при гемобластозах 14

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Д.Н. Балашов, П.Е. Трахтман, Е.В. Скоробогатова, Ю.В. Скворцова, И.П. Шипицына, А.А. Масчан

Факторы риска цитомегаловирусной инфекции у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток 20

РЕДКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ

От редакции 27

Е.Л. Сахаровская, Р.У. Stepensky, L.I. Rheingold, М.М. Дубровин, Д.А. Игнатова, А.Ю. Щербина, И.Б. Резник
Клинические проявления инфантильной (злокачественной) формы остеопетроза 28

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

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

Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на чувствительность лейкомиических клеток к противолейкемическим препаратам *in vitro* 33

О.В. Акинфиева, Л.Н. Бубнова, С.С. Бессмельцев

НКТ-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа 39

ЛЕКЦИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Вступление 48

Д.А. Домнинский

Молекулярные механизмы лейкозогенеза 49

КОНФЕРЕНЦИИ, СИМПОЗИУМЫ, СОВЕЩАНИЯ

Д.Ю. Качанов

Сообщение о XXI Всемирном противораковом конгрессе. 57

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ 59

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 61

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

S.S. Bessmeltsev, L.V. Stelmashenko, E.V. Kariagina, N.V. Stepanova, G.N. Salogub, T.L. Shelkovskaya, T.A. Malakhova, I.A. Skorokhod, E.I. Podoltseva, N.O. Saraeva, O.I. Kovalev, A.V. Klimovich, N.V. Medvedeva, K.M. Abdulkadyrov, L.I. Krylova, T.H. Potrachkova, M.A. Novikova, E.R. Machulaitene, E.I. Darskaya, L.M. Matukhina, N.A. Kotova, O.Ya. Kostina, I.A. Novokreshchenova

Modern strategies in therapy of elderly patients with multiple myeloma. 6

V.N. Chebotkevich, V.V. Burylev, E.I. Kaytandzhan, S.S. Bessmeltsev, E.R. Shilova, S.B. Yatsyshina, A.V. Kudryavtseva

Etiological and clinical features of infectious complications in hemoblastosis. 14

HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

D.N. Balashov, P.E. Trakhtman, E.V. Skorobogatova, Yu.V. Skvortsova, I.P. Schipitsyna, A.A. Maschan

Risk factors of cytomegalovirus infection in patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation 20

RARE DISEASES: DIFFERENTIAL DIAGNOSIS AND THERAPY APPROACHES

From edition 27

E.L. Sakharovskaya, P.Y. Stepensky, L.I. Rheingold, M.M. Dubrovin, D.A. Ignatova, A.Yu. Shcherbina, I.B. Reznik
Clinical features of infantile (malignant) osteopetrosis. 28

BASIC RESEARCH

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

Influence of allogeneic mesenchymal stem cells on leukemic cells *in vitro* sensitivity to antileukemic drugs 33

O.V. Akinfieva, L.N. Bubnova, S.S. Bessmeltsev

NKT cells: characteristic features and functional significance in the immune response regulation 39

LECTURES

Preface 48

D.A. Domninskiy

Molecular mechanisms of leukemogenesis 49

CONFERENCES, SYMPOSIUMS, MEETINGS

D.Yu. Kachanov

XXI World Cancer Congress. 18-21 August 2010, Shenzhen (China). 57

CORRESPONDENCE 59

INFORMATION FOR THE AUTHORS. 61

ЛЕЧЕНИЕ ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

С.С. Бессмельцев¹, Л.В. Стельмашенко¹, Е.В. Карягина², Н.В. Степанова³, Г.Н. Салогуб³, Т.Л. Шелковская², Т.А. Малахова², И.А. Скороход⁴, Э.И. Подольцева⁴, Н.О. Сараева^{5,6}, О.И. Ковалев⁷, А.В. Климович⁴, Н.В. Медведева⁴, К.М. Абдулкадыров¹, Л.И. Крылова², Т.Г. Потрачкова⁵, М.А. Новикова⁷, Е.Р. Мачулайтене³, Е.И. Дарская⁸, Л.М. Матюхина⁹, Н.А. Котова⁴, О.Я. Костина⁹, И.А. Новокрещенова⁷

¹ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург; ²Городская больница №15, Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; ⁴ГУЗ Городская больница №31, Санкт-Петербург; ⁵ГУЗ Иркутская областная клиническая больница; ⁶Иркутский государственный медицинский университет; ⁷НУЗ Отделенческая больница на ст. Смоленск ОАО «РЖД»; ⁸Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; ⁹НУЗ Дорожная клиническая больница ОАО «РЖД», Санкт-Петербург

Контакты: Станислав Семенович Бессмельцев bsshem@hotmail.com

Мы использовали бортезомиб в сочетании с дексаметазоном (VD) и бортезомиб в сочетании с мелфаланом и преднизолоном (VMP) в лечении 56 ранее не леченых пожилых пациентов с множественной миеломой (ММ). Возраст больных колебался от 65 до 89 лет. При использовании VMP общий ответ составил 83%. Полной ремиссии достигли 33,3% больных (суммарный показатель полной и близкой к полной ремиссии) (критерии EBMT). В группе больных, получавших VD, общий ответ составил 73%. У 34,6% больных была получена полная ремиссия. Медиана общей выживаемости больных, получавших VD или VMP, не достигнута. Медиана бессобытийной выживаемости составила 15 и 17 мес соответственно. Побочные эффекты бортезомиба предсказуемы и управляемы. В преобладающем большинстве случаев наблюдались астения, нейропатия, нейтропения и анемия. Серьезные осложнения встречались крайне редко. Результаты применения VMP и VD позволяют отнести эти схемы к новым подходам в лечении пожилых больных с впервые выявленной ММ. VMP и VD высокоэффективны и хорошо переносятся пожилыми пациентами (> 65 лет) с впервые выявленной ММ.

Ключевые слова: бортезомиб, множественная миелома, лечение, полная ремиссия, общая выживаемость, нейропатия

MODERN STRATEGIES IN THERAPY OF ELDERLY PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

S.S. Bessmeltsev¹, L.V. Stelmashenko¹, E.V. Kariagina², N.V. Stepanova³, G.N. Salogub³, T.L. Shelkovskaya², T.A. Malakhova², I.A. Skorokhod⁴, E.I. Podoltseva⁴, N.O. Saraeva^{5,6}, O.I. Kovalev⁷, A.V. Klimovich⁴, N.V. Medvedeva⁴, K.M. Abdulkadyrov¹, L.I. Krylova², T.H. Potrachkova⁵, M.A. Novikova⁷, E.R. Machulaitene³, E.I. Darskaya⁸, L.M. Matukhina⁹, N.A. Kotova⁴, O.Ya. Kostina⁹, I.A. Novokreshchenova⁷

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg; ²City Hospital 15, St.-Petersburg; ³St.-Petersburg State Pavlov Medical University; ⁴City Hospital 31, St.-Petersburg; ⁵Irkutsk Region Clinic Hospital; ⁶Irkutsk State Medical University; ⁷Department of Hospital in station Smolensk; ⁸Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Pediatric Hematology and Transplantology; ⁹Road Clinic Hospital, St.-Petersburg

We used the bortezomib plus dexamethasone (VD) and bortezomib plus MP (VMP) in 56 previously untreated elderly patients with multiple myeloma. The patients were 65–89 years old. For patients who received bortezomib plus MP the overall response rate was 83%. 33.3% of patients achieved complete response (near-complete response + complete response) (based on EBMT criteria). For patients who received bortezomib plus dexamethasone the overall response rate was 73%. 34.6% of patients achieved complete response. Median overall survival in patients treated with bortezomib plus dexamethasone and bortezomib plus MP has not been reached. Median event-free survival was 15 and 17 months respectively. Side effects of bortezomib were predictable and manageable. The most common adverse events reported were asthenia, neuropathy, neutropenia and anemia. Serious adverse events were rare. These results establish VMP and VD as modern strategies in therapy of elderly untreated patients with multiple myeloma. VMP and VD is highly effective and well tolerated in elderly patients (> 65 years) with newly diagnosed multiple myeloma.

Key words: bortezomib, multiple myeloma, treatment, complete remission, overall survival, neuropathy

Для лечения пожилых пациентов с множественной миеломой (ММ) в течение многих лет использовали комбинацию мелфалана с преднизолоном (MP), которая считалась «золотым» стандартом. Однако при назначении MP частота объективного ответа (ОО) не превышала 50–56%, количество полных ремиссий (ПР) — 5%, а медиана общей выжива-

емости (ОВ) — 36 мес [1, 2]. В последние годы в лечении ММ все большее значение придается новым лекарственным препаратам, обладающим иммуномодулирующей активностью (талидомид и леналидомид) и ингибиторам протеосомы (бортезомиб) [3, 4]. Внедрение в клиническую практику препаратов нового поколения дало возможность более оптимистично взглянуть на

прогноз этого тяжелого заболевания [4, 5, 6]. У больных пожилого возраста талидомид, леналидомид и бортезомиб хорошо зарекомендовали себя в сочетании с МР (мелфалан—преднизолон—талидомид, мелфалан—преднизолон—бортезомиб (VMP), мелфалан—преднизолон—леналидомид). Так, при использовании схемы мелфалан—преднизолон—леналидомид/ревлид (MPR) у пожилых пациентов с впервые выявленной ММ ОО составил 81%, при этом у 47,6% больных удалось достичь очень хорошего частичного ответа, а у 23,8% — полного ответа [7]. Крупное многоцентровое исследование III фазы VISTA было посвящено сравнению эффективности схем лечения VMP и МР у больных с впервые выявленной ММ [8]. Превосходство VMP перед МР продемонстрировано по всем анализируемым показателям: времени до прогрессии болезни, беспрогрессивной выживаемости, ОВ, времени до начала следующего курса терапии, частоте ПР.

Ранее мы уже сообщали о нашем опыте применения бортезомиба в лечении больных с впервые выявленной ММ. Причем мы использовали бортезомиб в сочетании с дексаметазоном (VD) в различных возрастных группах. Большинство больных ММ, независимо от возраста и функциональной способности почек, отвечали на терапию. ОО при использовании схемы VD в целом составил 72,7%, а показатель ПР — 33,7% [9], что согласуется с данными литературы [10]. У больных пожилого возраста мы также применяли программу VMP [11]. По результатам исследования ответ составил 74,9%, включая 33,2% ПР. Медиана ОВ и бессобытийной выживаемости (БСВ) не достигнута. Важно отметить, что VMP зарекомендовала себя и у пожилых больных, и у лиц старческого возраста (< 75 и ≥ 75 лет) [8, 11]. В настоящей работе мы представляем результаты сопоставления эффективности программ лечения VD и VMP у пожилых пациентов с впервые выявленной ММ.

Цель исследования

Сопоставить эффективность схем VD и VMP при лечении больных ММ пожилого возраста (≥ 65 лет) и оценить переносимость бортезомиба в указанных комбинациях.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 56 больных с впервые выявленной ММ в возрасте 65—89 лет, которые в зависимости от получаемого вида терапии были разделены на 2 группы, а именно: 1-ю группу составили 26 больных, получавших лечение по схеме VD, 2-ю группу — 30 больных, лечившихся по схеме VMP. Это нерандомизированное многоцентровое исследование, в котором приняли участие несколько гематологических центров РФ, а именно: Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, городские больницы №15 и №31 (Санкт-Петербург), Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Дорожная клиническая больница ОАО

«РЖД» (Санкт-Петербург), Иркутская областная клиническая больница, Иркутский государственный медицинский университет, Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой (Санкт-Петербург), Областной гематологический центр НУЗ Отделенческая больница на ст. Смоленск ОАО «РЖД».

Больным 1-й группы назначена комбинация VD: бортезомиб (велкейд) 1,3 мг/м² внутривенно (в/в) в 1, 4, 8, 11-й дни с последующим 10-дневным перерывом (дни 12—21) + дексаметазон по 20 мг внутрь или в/в в 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12-й дни каждого 21-дневного цикла; до 8 циклов индукционной терапии. После достижения ОО больные получали еще 2 таких же цикла консолидирующей терапии, а далее они переводились на поддерживающее лечение, которое заключалось в назначении этих же циклов, но с интервалом в 3 мес. Поддерживающее лечение продолжалось до развития рецидива или прогрессии заболевания. Оценка эффективности лечения проводилась у больных ММ, получивших не менее трех 3-недельных циклов VD. Суммарное количество циклов (с учетом консолидирующих и поддерживающих циклов), которые получили больные за время наблюдения, колебалось от 3 до 16. Во 2-й группе больные ММ в качестве индукционной терапии получали программу VMP: 1—4-й циклы включали велкейд 1,3 мг/м² в/в в 1, 4, 8, 11, 22, 25, 28, 32-й дни и мелфалан 9 мг/м² + преднизолон 60 мг/м² в 1—4-й дни; в 5—9-м циклах велкейд назначался по 1,3 мг/м² в/в в 1, 8, 22, 29-й дни и мелфалан 9 мг/м² + преднизолон 60 мг/м² в 1—4-й дни. На момент анализа результатов исследования каждый больной получил от 4 до 9 циклов. Для профилактики *herpes zoster* всем больным в течение всего периода лечения бортезомибом назначался ацикловир. Ежемесячно (но не более 2 лет) вводились бисфосфонаты (золедронат, бондронат). При развитии глубокой нейтропении (IV степень) назначались колониестимулирующие факторы (нейпоген, граноцит), при снижении гемоглобина < 100 г/л — рекомбинантные эритропоэтины (эпрекс, рекормон, эпокрин), < 80 г/л — трансфузии эритроцитарной массы, при тяжелой тромбоцитопении — тромбоконцентраты.

У всех пациентов заболевание выявлено впервые. Диагноз ММ подтверждался высоким содержанием общего белка в сыворотке крови; выявлением при электрофорезе сывороточных белков М-градиента или экскреции легких цепей с мочой; результатами миелограммы, гистологического исследования трепаната подвздошной кости и рентгенографией костей скелета. Длительность заболевания перед назначением схем VD или VMP колебалась от 3 до 12 мес. До включения в настоящее исследование пациентам специальной терапии не проводилось. Характеристика больных представлена в таблице 1.

Как видно из таблицы, в целом больные обеих групп были вполне сопоставимы по всем основным анализируемым показателям. Так, у 14 (53,8%) больных из 1-й группы и у 16 (53,3%) из 2-й группы установлена III ста-

Таблица 1. Характеристика больных ММ (n=56)

Характеристика	Схема VD (n=26)	Схема VMP (n=30)
Средний возраст, годы	72 (65–86)	73 (65–89)
Больные ≥ 75 лет	11	13
Мужчины/женщины	10/16	12/18
Варианты:		
G/A	16/8	18/9
Бенс-Джонса	2	3
Стадии ММ по Durie, Salmon		
II/III степень	12/14	14/16
Подстадии:		
А/В	18/8	20/10
β ₂ -микροглобулин		
3,5 мкг/мл	5	5
5,5 мкг/мл	11	15

для заболевания, а у 8 (30,8%) и 10 (33,3%) пациентов соответственно обнаружено нарушение функции почек (уровень креатинина в сыворотке крови > 177 мкмоль/л, клиренс креатинина > 30 мл/мин, но < 60 мл/мин). Пять (19,2%) больных из 1-й группы (в зависимости от уровня β₂-микροглобулина в сыворотке крови) относились к группе промежуточного риска (> 3,5 мкг/мл) и 11 (42,3%) – к группе высокого риска (> 5,5 мкг/мл). Во 2-й группе больных в аналогичные группы риска вошли 5 (16,7%) и 15 (50%) больных соответственно.

Результаты лечения больных ММ оценивали с использованием критериев ЕВМТ [12]. Выделяли ПР, частичную ремиссию (ЧР), минимальный ответ (МО) и стабилизацию опухолевого процесса. Для уточнения полноты ремиссии использовали тест иммунофиксации, что позволяло верифицировать у больных ПР при отрицательном результате теста либо ремиссию, близкую к полной (бПР), при положительном результате. Прогрессирование болезни (рецидив) устанавливали при 25% увеличении (появлении) уровня моноклонального иммуноглобулина (в сыворотке крови > 10 г/л, а в моче > 200 мг/сут), выявлении новых очагов деструкции в костях скелета или плазмцитомы, появлении или усугублении гиперкальциемии, необъяснимых какими-либо иными причинами.

Статистическая обработка данных проведена с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2003 и STATISTICA 6.0 в среде Windows XP. Расчет выживаемости осуществлялся по методу Каплана–Майера. Вычисляли время ОВ (промежуток времени от даты включения в протокол (среди всех больных) до смерти от любой причины или до даты последней явки больного) и БСВ (промежуток времени от момента включения в протокол (среди ответивших больных) до любого события (прогрессии, перехода на другую линию терапии, рецидива, смерти от любой причины)). Кроме того определяли время до прогрессирования

заболевания – срок от даты включения в протокол до даты первого обнаружения прогрессии заболевания (или рецидива) у больных, достигших ответа. Медиану выживаемости вычисляли с использованием 50-го перцентиля. Для сравнения кривых выживаемости в группах больных применяли Log-rank-тест, различие считали статистически достоверным при $p < 0,05$. Токсичность велкейда оценивали согласно критериям ВОЗ. Тяжесть астенического синдрома и нейротоксичность оценивали с использованием критериев Национального ракового института США (the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria – NCI CTC), версия 3.0 (Cancer Therapy Evaluation Program, Department of Health and Human Services, December 2003).

Период наблюдения за больными, включенными в исследование, колебался от 3 до 29 мес (медиана 14,8 мес), кроме 1 пациента, получавшего схему VMP, который наблюдался нами в течение 65 мес. Все расчеты полученных результатов для данного сообщения произведены в июле 2010 г.

Результаты

Отчетливый ОО (ПР+ЧР) в 1-й группе больных независимо от возраста, стадии болезни, функции почек и группы риска составил 57,6%, а с учетом МО – 73%. Как видно из рисунка 1, у 5 (19,2%) больных удалось получить ПР и у 4 (15,4%) – бПР, т. е. суммарный показатель ПР+бПР равен 34,6%. Частичная ремиссия зарегистрирована у 6 (23%), а МО – у 4 (15,4%) пациентов; еще у 5 (19,2%) больных наблюдалась стабилизация опухолевого процесса. Только у 2 (7,7%) пациентов не удалось добиться положительного ответа. Для получения ПР потребовалось проведение 5–8 циклов VD. ЧР или МО нередко наблюдались уже после 3–4 циклов терапии. Аналогичные результаты зарегистрированы во 2-й группе больных, которые получали лечение по программе VMP. Так, положительный ответ независимо от стадии болезни, функции почек и уровня β₂-микροглобулина в сыворотке крови был получен у 21 (69,9%) из 30 больных, а с учетом МО – у 25 (83%). При этом количество ПР+бПР составило 33,3%, еще у 11 (36,6%) больных достигнута ЧР (рис. 1). Только у 2 (6,6%) больных лече-

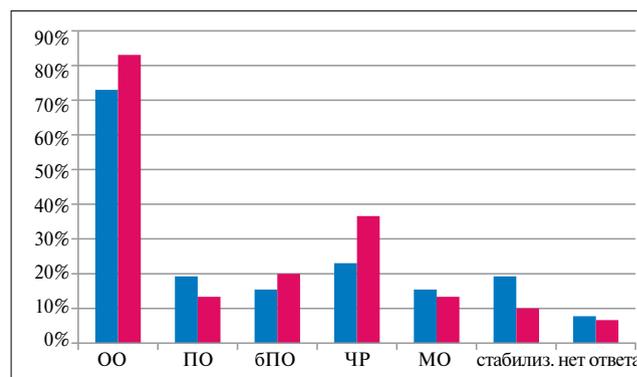


Рис. 1. Результаты лечения пожилых пациентов с ММ по программе VD (синий цвет) и VMP (красный цвет); ОО – объективный ответ (ПО+бПО+ЧР+МО); стабилиз. – стабилизация

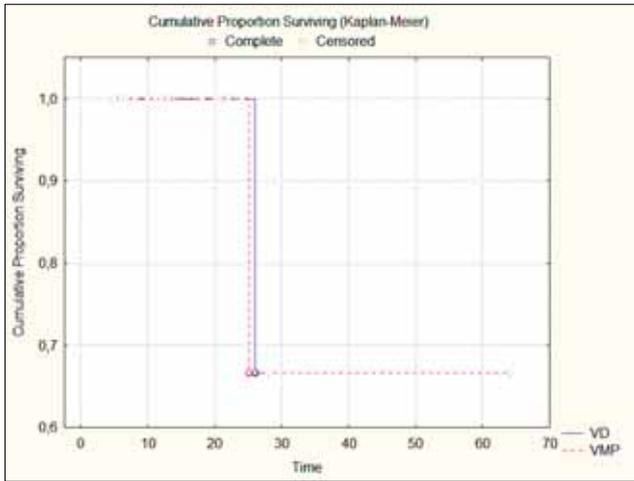


Рис. 2. Общая выживаемость пожилых пациентов с ММ, получавших лечение по схеме VD или VMP

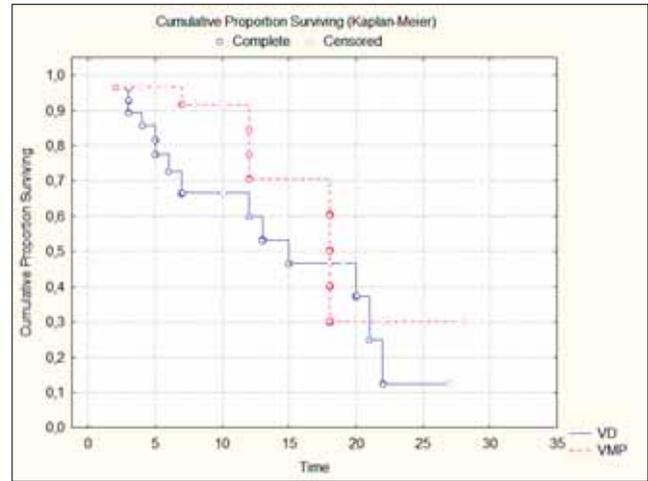


Рис. 3. Бесобытийная выживаемость больных ММ, получавших лечение по схеме VD или VMP

ние оказалось неэффективным.

Кривые ОВ больных, включенных в исследование, за весь период наблюдения показаны на рисунке 2, из которого видно, что медиана ОВ по Каплану—Майеру как в 1-й, так и во 2-й группе больных не достигнута. Различий между показателями ОВ в группах больных не получено. Кривые БСВ всех больных за этот же период наблюдения показаны на рисунке 3. Статистически достоверные различия в медианах БСВ в анализируемых группах больных не обнаружены. Медиана БСВ больных 1-й группы составила 15 мес, а 2-й группы — 17 мес ($p > 0,05$). Мы вычислили время до прогрессирования болезни среди всех больных ММ, получавших терапию по схеме VD или VMP (рис. 4). В группе больных, получавших лечение по программе VD, медиана времени до прогрессии составила 24,6 мес, а в группе больных, ле-

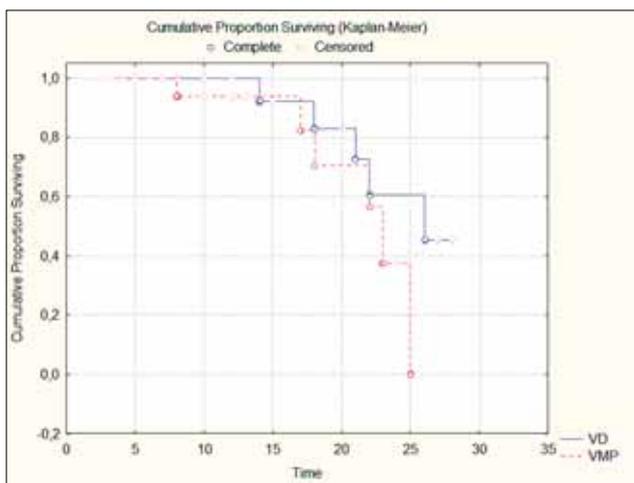


Рис. 4. Время до прогрессии заболевания у больных ММ, получавших лечение по схеме VD или VMP

чившихся по программе VMP — 24,8 мес ($p=0,21$).

В целом больные переносили лечение независимо от используемой программы вполне удовлетво-

рительно. Мы уже сообщали о побочных эффектах велкейда при использовании его как в качестве 1-й линии терапии, так и при рефрактерных/рецидивирующих формах ММ [9, 11, 13]. Как видно из таблицы 2, среди негематологических побочных явлений чаще всего в обеих группах больных наблюдался астенический синдром, тяжесть которого лишь у отдельных пациентов превышала I—II степень. Астенический синдром главным образом возникал на фоне проведения первых 3 циклов VD или 2 циклов VMP. Однако все больные, несмотря на появление усталости, могли продолжать лечение. Значительно реже встречались гастроинтестинальные проявления (тошнота, рвота, диарея, запоры, боли в животе). Обращало на себя внимание, что частота подобных осложнений во 2-й группе больных была выше. Так, тошнота встречалась у 19,2% больных 1-й группы и у 30% — во 2-й группе ($p=0,05$). Во 2-й группе у 10% больных наблюдалась выраженная энтеропатия III степени, чего не было у больных 1-й группы. В то же время эти побочные эффекты были преходящими, возникали при проведении первых циклов терапии, а самочувствие и состояние больных полностью восстанавливалось в интервале между циклами. Изредка на первых циклах терапии регистрировалось умеренное повышение сахара в крови или он выявлялся в суточной моче.

Из других негематологических побочных явлений мы наблюдали преходящую лихорадку (подъем температуры до 38 °С в день введения бортезомиба или на следующий день, не связанный с присоединением инфекции) и инфекции (см. табл. 2). Среди инфекционных осложнений преобладал *herpes zoster*, который отмечен у 11,5% больных 1-й группы и у 10% — 2-й группы. У 1 больного, получившего 3 цикла VD, и еще у 1, получившего 2 цикла VMP, развился герпетический ганглионеврит, что было основанием для временной отмены бортезомиба. Реже встречались отиты, конъюнктивиты, инфекции верх-

Таблица 2. Побочные эффекты у больных ММ, получавших терапию по схемам VD и VMP

Побочные эффекты	VD (n=26)	VMP (n=30)
Астенический синдром (усталость, недомогание, слабость)	11 (42,2%)	13 (43,3%)
I степень	6 (23%)	7 (23,3%)
II степень	4 (15,4%)	5 (16,7%)
III степень	1 (3,8%)	1 (3,3%)
Тошнота	5 (19,2%)	9 (30%)
Рвота	4 (15,3%)	5 (16,7%)
Жидкий стул, в том числе	5 (19,2%)	6 (20%)
энтеропатия II степени	2 (7,6%)	2 (6,7%)
энтеропатия III степени	—	3 (10%)
Запоры	3 (11,5%)	3 (10%)
Боли в эпигастральной области	2 (7,6%)	3 (10%)
Гипергликемия/гликозурия	2 (7,6%)	3 (10%)
Периферическая нейропатия	11(42,3%)	12 (40%)
I степень	4 (15,4%)	4 (13,3%)
II степень	4 (15,4%)	4 (13,3%)
III степень	2 (7,7%)	3 (10%)
IV степень	1 (3,8%)	1 (3,4%)
Лихорадка	3 (11,5%)	4 (13,3%)
Гипертензия	2 (7,6%)	4 (13,3%)
Ортостатическая гипотония	2 (7,6%)	3 (10%)
Пароксизмы мерцательной аритмии	1 (2,6%)	1 (3,3%)
Артралгии	—	2 (3,6%)

Побочные эффекты	VD (n=26)	VMP (n=30)
Поражение кожи	1 (2,6%) — эритематозная сыпь	1 (3,3%) — токсико-дермия
Острый тромбоз сосудов нижних конечностей	1 (3,8%)	1 (3,3%)
Инфекции	7 (26,9%)	10 (33,3%)
отит	1	—
конъюнктивит	2	1
цистит	—	1
<i>herpes zoster</i>	3	3
острая респираторная аденовирусная инфекция	2	2
кандидоз слизистой полости рта	1	2
синуситы	1	2
бронхит	1	2
пневмония	1	—
Анемия	6 (23%)	8 (27%)
I–II степень	4 (15,3%)	4 (13,5%)
III степень	2 (7,7%)	4 (13,5%)
Нейтропения	8 (30,8%)	14 (46,6%)
I–II степень	4 (15,4%)	7 (23,4%)
III степень	2 (7,7%)	5 (16,6%)
IV степень	2 (7,7%)	2 (6,6%)
Снижение уровня тромбоцитов	6 (23%)	14 (46,6%)
I–II степень	4 (15,3%)	8 (26,7%)
III степень	2 (7,7%)	4 (13,3%)
IV степень	—	2 (6,6%)

них дыхательных путей, кандидоз слизистой полости рта и синуситы, которые были быстро купированы, и поэтому в целом не повлияли на ход лечения основного заболевания. Наиболее серьезным осложнением была пневмония, возникновение которой наблюдалось у пациента с миеломой Бенс-Джонса III степени с высоким риском (повышенное содержание плазматических клеток в костном мозге, β_2 -м > 5,5 мкг/мл) после 5 циклов лечения по схеме VD и достигшего только стабилизации опухолевого процесса.

Еще реже при использовании бортезомиб-содержащих режимов наблюдались преходящие подъемы артериального давления или, наоборот, ортостатическая гипотония в ответ на введение препарата, в отдельных случаях — пароксизмы мерцательной аритмии, артралгии и кожные проявления, а у 2 пациентов (по одному из каждой группы) раз-

вился острый тромбоз сосудов нижних конечностей.

Частым осложнением при применении велкейда в обеих группах больных была периферическая нейропатия (ПН), которая наблюдалась у 12 (40%) больных, получавших VMP, и у 11 (42,3%) — VD. Появление первых симптомов сенсорной нейропатии у 2 пациентов зарегистрировано после 1 цикла VMP, у остальных — после 3–5 циклов. Нейропатическая боль чаще возникала после проведения 3–5 циклов VMP. У 26,6% больных диагностирована нейропатия I–II степени токсичности, у 13,4% — III–IV степени. Следует отметить, что у 6 (20%) больных 2-й группы уже исходно наблюдались признаки сенсорной/сенсомоторной нейропатии I–II степени, в том числе у 2 больных с нейропатической болью, что потребовало предварительного лечения. У 2 больных исходная дистальная сенсорная нейропатия I и II сте-

пени не имела тенденции к нарастанию. Они успешно прошли 9 циклов VMP, а признаки ПН, наоборот, были купированы через 1 мес после возникновения на фоне сопроводительной терапии. Среди больных, получавших лечение по схеме VD, в преобладающем большинстве случаев также была диагностирована нейропатия I–II степени токсичности и только у 11,5% больных – III–IV степени. В этой группе больных признаки ПН исходно наблюдались в 6 (23%) случаях (в 2 – с нейропатической болью), в 4 (15,4%) из них – сенсомоторная нейропатия II степени (у 2 больных – диабетическая), а в 2 (7,7%) – сенсорная I степени. Полученные данные по развитию ПН при использовании бортезомиба в 1-й линии терапии согласуются с нашими предыдущими результатами [9, 11].

При использовании бортезомиба, правилом №1 следует считать своевременную диагностику ПН, уточнение степени ее тяжести и строгое соблюдение рекомендаций по коррекции дозы бортезомиба [14, 15]. При обнаружении признаков сенсорной/сенсомоторной нейропатии I степени исходной или возникшей на фоне применения бортезомиба больным назначались витамины группы B и альфа-липоевая кислота. Однако это не являлось противопоказанием для назначения бортезомиба или снижения его разовой дозы. При нейропатии I степени с болевым синдромом или II степени нами производилась редукция разовой дозы бортезомиба с 1,3 мг/м² до 1,0 мг/м². Развитие нейропатии III степени либо II степени с нейропатическими болями было основанием для временного прекращения терапии, а в последующем – редукции дозы бортезомиба до 0,7 мг/м² 2 раза в нед или 1,0 мг/м² 1 раз в нед. Нейропатия IV степени была показанием для отмены бортезомиба. При нарастании симптоматики ПН, появлении болевого синдрома лечение дополняли габапентином или прегабалином, а в тяжелых случаях – карбамазепимом или amitриптилином. На фоне указанной сопроводительной терапии наблюдалось улучшение самочувствия больных, отчетливо снижалась интенсивность болей в конечностях, постепенно восстанавливалась их чувствительность и подвижность. Более чем у 70% больных с ПН ≥ II степени независимо от используемой программы терапии (VD или VMP) удалось либо полностью купировать ее симптоматику, либо существенно снизить тяжесть (до сенсорной нейропатии I степени). Медиана времени до снижения проявлений ПН составила 63 дня. Отмена бортезомиба в связи с его нейротоксичностью произведена у 2 (7,6%) больных 1-й группы и у 2 (6,7%) больных 2-й группы, у которых тяжелая нейропатия с болевым синдромом и нарушением функции конечностей сохраняется уже в течение 8–12 мес.

Бортезомиб вызывает миелосупрессию. Как видно из таблицы 2, у больных на фоне применения схем VD и VMP наблюдалось развитие анемии, ней-

тропении и тромбоцитопении. В преобладающем большинстве случаев тяжесть гематологической токсичности была умеренной, что не было основанием для редукции дозы или отмены бортезомиба и других препаратов, входящих в указанные программы. Снижение уровня тромбоцитов регистрировалось к 11-му дню лечения и восстанавливалось в период отдыха. Крайне редко встречалась III–IV степень гематологической токсичности. Однако при сравнении частоты и тяжести миелосупрессии в группах больных следует обратить внимание на пациентов, получавших лечение VMP. В этой группе анемия, гранулоцитопения и тромбоцитопения развивались чаще и были более выраженными. Выяснилось, что при использовании схемы VMP в 2 раза чаще ($p < 0,05$) встречались анемия, нейтропения и тромбоцитопения III степени. В этой же группе пациентов была выявлена тромбоцитопения IV степени. Обращало на себя внимание, что анемия и нейтропения III–IV степени чаще обнаруживались у больных после 6–8 циклов VD или 3–4 циклов VMP, причем у больных, не ответивших на лечение, или достигших лишь стабилизации/минимального ответа. Следует также отметить, что исходно у 42% больных 1-й группы и 43% больных 2-й группы была обнаружена анемия I–II степени. На фоне успешной терапии при достижении полного или частичного ответа наблюдалось восстановление уровня гемоглобина. Нейтропения, так же как и тромбоцитопения, чаще была преходящей, т. е. содержание гранулоцитов снижалось к концу цикла терапии и восстанавливалось в период отдыха. При развитии нейтропении IV степени назначались колониестимулирующие факторы, что быстро восстановило содержание гранулоцитов. При снижении уровня гемоглобина < 100 г/л использовались рекомбинантные эритропоэтины, а < 80 г/л – трансфузии эритроцитарной массы.

Обсуждение

Таким образом, результаты применения бортезомиба в комбинации с дексаметазоном (схема VD) или мелфаланом–преднизолоном (схема VMP) в 1-й линии терапии пожилых больных MM заслуживают внимания. Большинство больных независимо от стадии болезни, функциональной способности почек и уровня β_2 -микроглобулина отвечали на терапию. В 2008 г. закончено многоцентровое рандомизированное исследование III фазы VISTA, которое показало, что у больных MM пожилого возраста (> 65 лет) весьма эффективно и безопасно применение VMP [8, 16]. Это исследование выявило явное превосходство VMP перед MP, в том числе у пациентов > 75 лет группы высокого и стандартного риска. Ранее опубликованные нами результаты применения схемы VMP у лиц пожилого возраста также продемонстрировали ее эффективность [11]. У 62,4% больных удалось достичь ПР или ЧР. Мы также отметили, что медиана выживаемости больных в разных возрастных

группах (< 75 и ≥ 75 лет) вполне сопоставима. Мы сообщали об использовании в 1-й линии терапии бортезомиба в сочетании с дексаметазоном (VD) и установили, что большинство больных ММ независимо от возраста отвечали на терапию [9]. Цель настоящего исследования – сопоставить эффективность этих 2 программ (VD против VMP) у пожилых пациентов с ММ.

В результате проведенного исследования установлено, что для лечения пожилых пациентов могут успешно использоваться обе комбинации. Так, ОО при применении схемы VD независимо от стадии болезни, функции почек и группы риска по уровню β_2 -микроглобулина составил 73%, а при терапии VMP – 83%, а количество ПР составило 34,6% и 33,3% соответственно. Медиана ОВ по Каплану–Майеру как в 1-й, так и во 2-й группе больных не достигнута (период наблюдения 3–29 мес). Различий между показателями ОВ и БСВ в группах больных не выявлено. Кроме того, в группе больных, получавших лечение по схеме VD, медиана времени до прогрессии составила 24,6 мес, а по схеме VMP – 24,8 мес. Длительный период без прогрессии мы связываем с консолидирующей и поддерживающей терапией, что согласуется с нашими предыдущими результатами и данными литературы [9, 11, 17, 18]. Назначение больным поддерживающей терапии позволяло пролонгировать длительность ответа, ОВ и снижало частоту развития рецидивов.

В целом, как показало исследование, переносимость бортезомиба в комбинированной терапии с дексаметазоном или мелфаланом–преднизолоном вполне удовлетворительна. Наиболее часто встречались астенический синдром и периферическая нейропатия. Но тяжесть астенического синдрома была главным образом умеренной, что не отразилось на режиме введения велкейда. Гораздо реже возникали гастроинтестинальные проявления. Правда их частота во 2-й группе больных оказалась гораздо выше, что, вероятно, связано с назначением мелфалана, входящего в состав схемы VMP. Однако эти побочные эффекты были преходящими и практически не повлияли на своевременное введение бортезомиба в необходимых разовых дозах.

С одинаковой частотой в обеих группах больных встречалась ПН, которая у большинства пациентов была нетяжелой. Мы руководствовались существующими рекомендациями по коррекции дозы бортезомиба и своевременно назначали больным с признаками ПН различные лекарственные препараты (витамины группы В, мильгамму, альфа-липоевую кислоту, габапентин или прегабалин, карбамазепим, амитриптилин) [14, 15, 19]. В результате нам удалось значительно улучшить самочувствие больных. Более чем у 70% больных 1-й и 2-й группы ПН ≥ II степени была или излечена, или существенно снижена ее тяжесть и полностью купирована нейропатическая

боль. Отмена бортезомиба в связи нейротоксичностью произведена лишь у 7,6% больных, получавших комбинацию VD, и у 6,7% больных – на схеме VMP.

Инфекционные осложнения возникли у 26,9% больных 1-й группы и у 33,3% больных 2-й группы, причем они не были тяжелыми. Среди инфекционных осложнений преобладал *herpes zoster*. У отдельных больных в ответ на введение бортезомиба повышалась температура тела, что не было связано с присоединением инфекции, или снижалось артериальное давление сразу после введения препарата. Иногда регистрировалась гипергликемия (возможно связанная с приемом дексаметазона или преднизолона), появлялись кратковременные боли в суставах, возникали пароксизмы мерцательной аритмии.

Что касается гематологической токсичности, то в основном развивалась миелосупрессия I–II степени, что не было основанием для редукции дозы велкейда или его отмены. Снижение уровня тромбоцитов было преходящим, регистрировалось к 11-му дню лечения и восстанавливалось в интервале между циклами. По данным исследования VISTA различий в гематологической токсичности при использовании VMP и MP не выявлено. Так, частота нейтропении III и IV степени составила 40 и 38%, тромбоцитопении – 37 и 30%, анемии – 19 и 28% соответственно [9]. По данным нашего исследования нейтропения и тромбоцитопения III–IV степени возникла у 23,2 и 19,9% больных соответственно, а анемия III степени – у 13,5% больных, лечившихся по программе VMP. Сопоставляя частоту и тяжесть побочных эффектов у больных на фоне терапии VD и VMP, мы выявили важный факт. Оказалось, что гематологическая токсичность бортезомиба в сочетании с дексаметазоном ниже, чем бортезомиба с мелфаланом–преднизолоном. Нейтропения III–IV степени при использовании VD наблюдалась в 1,5 раза реже (15,4%). Тромбоцитопении и анемии IV степени не обнаружено ни в одном случае, а III степени – у 7,7% больных. Такое различие, вероятно, связано с применением мелфалана, входящего в состав VMP. Однако в целом частота миелосупрессии в группах больных была невысокой. Нейтропения и тромбоцитопения чаще были преходящими. Важно отметить, что развитие анемии и нейтропении III–IV степени в основном выявлялось у больных, не ответивших на VD или VMP, или достигших лишь стабилизации/МО. На фоне успешной терапии, достижения полного или частичного ответа, наоборот, наблюдалось восстановление уровня гемоглобина.

Таким образом, результаты проведенного многоцентрового исследования эффективности бортезомиба с дексаметазоном (схема VD) и бортезомиба с мелфаланом–преднизолоном (схема VMP) позволяют рекомендовать их в качестве 1-й линии терапии пожилых больных ММ. Применение указанных комбинаций дает возможность достичь одинаково высо-

ких результатов лечения больных в возрасте > 65 лет, как в благоприятной, так и в неблагоприятной прогностической группе. Следует помнить лишь о необходимости тщательного наблюдения за больными и в первую очередь отслеживать ранние проявления нейротоксичности. Остальные побочные эффек-

ты – в основном умеренной степени тяжести и мало влияют на ход лечения по той или иной программе. Бортезомиб вызывает миелосупрессию, однако она обратима. Правильное использование бортезомиба расширит терапевтические возможности гематологов и приведет к улучшению помощи больным ММ.

Л и т е р а т у р а

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома. Современный взгляд на проблему. Алматы, 2007. 480 с.
2. Westin J. Conventional chemotherapy in multiple myeloma. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47:169–71.
3. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Multiple myeloma. *Blood* 2008;111(6):2962–72.
4. Ohashi K. Clinical implications of bortezomib in frontline treatment of newly-diagnosed multiple myeloma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;35:1029–32.
5. Richardson P.G., Weller E., Lonial S. et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010;116:679–86.
6. Blade J., Rosicoll L. Advances in therapy of multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 2008;20(6):697–704.
7. Palumbo A., Falco P., Corradini P. et al. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA–Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol* 2007;25:4459–65.
8. San Miguel J.F., Schlag R., Khuageva N.K. et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008;359:906–17.
9. Бессмельцев С.С., Стельмашенко Л.В., Карягина Е.В., Степанова Н.В., Абдулкадыров К.М., Мачюлайтене Е.Р., Салогуб Г.Н., Медведева Н.В., Скороход И.А., Подольцева Э.И., Матюхина Л.М., Костина О.Я. Бортезомиб в терапии 1-й линии при лечении множественной миеломы. *Российские медицинские вести* 2009;Т. XIV(4):29–37.
10. Harousseau J-L., Attal M., Leleu X. et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica* 2006;91:1498–505.
11. Бессмельцев С.С., Стельмашенко Л.В., Степанова Н.В., Абдулкадыров К.М., Салогуб Г.Н., Мачюлайтене Е.Р., Карягина Е.В. Бортезомиб (велкейд) и мелфалан с преднизолоном в лечении множественной миеломы у пожилых больных. *Онкогематология* 2010;2:40–5.
12. Blade J., Samson D., Reece D. et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998;102:1115–23.
13. Бессмельцев С.С., Карягина Е.В., Стельмашенко Л.В., Степанова Н.В., Мачюлайтене Е.Р., Салогуб Г.Н., Абдулкадыров К.М., Малахова Т.Р., Скороход И.А., Медведева Н.В., Крылова Л.И., Подольцева Э.И., Матюхина Л.М., Низамутдинова А.С., Костина О.Я., Илюшкина Е.Ю. Бортезомиб (велкейд) в комбинации с дексаметазоном в лечении рефрактерных/ рецидивирующих форм множественной миеломы. Результаты заключительного анализа. *Клиническая онкогематология* 2009;2(3):236–44.
14. Бессмельцев С.С., Карягина Е.В., Стельмашенко Л.В. и др. Частота, характеристика и методы лечения периферической нейропатии у больных множественной миеломой, получающих бортезомиб (велкейд). *Онкогематология* 2008;3:52–62.
15. Richardson P.G., Xie W., Mitsiades C. et al. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J Clin Oncol* 2009;27:3518–25.
16. Mateos M.V., Hernández J.M., Hernández M.T. et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica* 2008;93(4):560–5.
17. Mihelic R., Kaufman J.L., Lonial S. Maintenance therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 2007;21:1150–7.
18. Denz U., Haas P.S., Einsele H. et al. State of the art therapy in multiple myeloma and future perspectives. *Eur J Cancer* 2006;42:1591–600.
19. Pérez C., Navarro A., Saldaña MT. et al. Pregabalin and gabapentin in matched patients with peripheral neuropathic pain in routine medical practice in a primary care setting: Findings from a cost-consequences analysis in a nested case-control study. *Clinical Therapeutics* 2010;32:1357–70.

ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

В.Н. Чеботкевич¹, В.В. Бурyleв¹, Е.И. Кайтанджан¹, С.С. Бессмельцев¹, Е.Р. Шилова¹,
С.Б. Яцьшина², А.В. Кудрявцева²

¹ФГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург;

²ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Контакты: Виталий Николаевич Чеботкевич vitnikcheb@mail.ru

Целью работы явилось изучение этиологии инфекционных осложнений у онкогематологических больных. Исследовали 2 группы пациентов. Первую группу составили больные с различными формами гемобластозов, у которых были диагностированы инфекционные осложнения (n=50). Вторую группу составили онкогематологические больные, у которых не были клинически выявлены инфекционные осложнения (группа сравнения) (n=35). Материал от больных (мазки из носа и зева, кровь) исследовались методом ПЦР в мультипраймерном формате с детекцией в режиме реального времени на выявление геномов респираторных вирусов (респираторно-синцитиального вируса, вирусов гриппа, парагриппа, риновирусов, аденовирусов, коронавируса, метапневмовируса и бокавируса); герпесвирусов (вирусов герпеса 1 и 2 типов, герпеса 6 типа, Эпштейна-Барр вируса и цитомегаловируса), *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, а также с помощью культуральных бактериологических и микологических методов. В целом возбудители респираторных инфекций были выявлены у 62% больных в группе с инфекционными осложнениями и только в 22,8% – в группе сравнения. В 42% случаев респираторные инфекции протекали на фоне выявления геномов герпесвирусов в крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти данные дают основание предположить, что герпесвирусные инфекции значительно повышают риск развития респираторных инфекционных осложнений и указывают на необходимость тщательного мониторинга респираторных и герпесвирусных инфекций у онкогематологических больных.

Ключевые слова: онкогематологические больные, инфекционные осложнения, респираторные вирусы, герпесвирусы

ETIOLOGICAL AND CLINICAL FEATURES OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN HEMOBLASTOSIS

V.N. Chebotkevich¹, V.V. Burylev¹, E.I. Kaytandzhan¹, S.S. Bessmeltsev¹, E.R. Shilova¹, S.B. Yatsyshina², A.V. Kudryavtseva²

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

The aim of the study was to analyze the etiologies of infectious complications (especially the role of respiratory viruses in patients with hematological malignancies). The supervised patients were divided into two subgroups: the first was patients with hemoblastosis and clinically evidence of infectious complications (n=50), and the second – patients without clinical features of infection (control group) (n=35). We analyzed the pharyngeal flora of patients by means of bacteriological and mycological methods and the frequency of respiratory viruses (Respiratory syncytial virus, Influenza A and B, Parainfluenza – 1, 2, 3, 4, rhinoviruses, adenoviruses, coronaviruses, metapneumovirus, bocavirus); herpesviruses (herpes simplex type 1 and 2, herpes type 6, Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus), *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* by means of PCR. Respiratory infections were detected in 62% in subgroup with clinically evidence of infectious complications and only in 22.8% in the second subgroup. In many cases herpesvirus infection (Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus) was associated with respiratory viral infections. So, respiratory and herpes viral infections must be carefully controlled in immunosuppressed patients with hematological malignancies.

Key words: patients with hematological malignancies, infectious complications, respiratory viruses, herpes viruses

Лечение онкогематологических больных на современном этапе связано с использованием интенсивной противоопухолевой и иммуносупрессивной терапии. Это привело к значительному увеличению числа полных ремиссий и повышению выживаемости больных. Однако одним из основных препятствий, возникающих при лечении больных с гемобластозами, являются инфекционные осложнения, продолжающие оставаться одной из ведущих причин гибели онкогематологических больных. В связи с этим установление этиологии инфекционного процесса играет первостепенную роль в

разработке стратегии своевременной и целенаправленной терапии этих тяжелых осложнений. Число возможных возбудителей инфекционного процесса достаточно велико. Это бактерии, грибы, микоплазмы и вирусы. Среди возбудителей бактериальных инфекций у данной категории больных значительное место занимают условно патогенные микробы. Разработка эффективных схем антибиотикотерапии позволила снизить летальность от бактериальных инфекций у больных с гемобластозами к концу минувшего века более чем в 5 раз (с 50% в 1970-е гг. до 10% в 90-е гг.) [1]. Следует

также отметить, что в большинстве работ рассматривается роль только определенных групп возбудителей — бактерий, грибов или вирусов — без учета их возможной роли в развитии ассоциированных инфекций.

Целью данного исследования явилось изучение этиологических и клинических особенностей инфекционных осложнений у иммуносупрессированных онкогематологических больных с учетом возможности наличия смешанных инфекций (бактериальных, грибковых и вирусных).

Материалы и методы

В период с ноября 2008 по июль 2010 г. под нашим наблюдением в гематологической клинике РосНИИ гематологии и трансфузиологии находилось 85 пациентов с различными формами гемобластозов (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, у 15 больных была диагностирована множественная миелома (ММ), в том числе у 2 — миелома Бенс-Джонса, у 12 — различные варианты острого лимфобластного (ОЛЛ) и миелобластного лейкоза (ОМЛ), у 33 — хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), у 4 — хронический миелолейкоз (ХМЛ), у 2 больных — хронические миелопролиферативные заболевания (у 1 — идиопатический миелофиброз, у другого — эссенциальная тромбоцитемия) и у 19 — злокачественные лимфомы: у 4 — лимфома Ходжкина (ЛХ), у 15 — различные варианты неходжкинских лимфом (НХЛ). Среди последних 15 пациентов: 6 больных с фолликулярной лимфомой, 2 — с лимфомой зоны мантии, 2 — с диффузной крупноклеточной лимфомой, 1 — с лимфомой маргинальной зоны, 1 — с волосатоклеточным хроническим лейкозом, 1 — с синдромом Сезари, 1 — с Т-клеточной неутонченной лимфомой и 1 — с лимфоплазмочитарной лимфомой.

Диагноз у больных подтверждали данными исследования периферической крови, пунктата костного мозга, трепанобиоптата подвздошной кости, цитогенетических, биохимических и иммунологических показателей крови и костного мозга, результатами рентгенологического исследования органов грудной клетки и костей скелета, ультразвукового исследования органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Диагноз ММ подтверждался также высоким содержанием общего белка в сыворотке крови, обнаружением при электрофорезе сывороточных белков М-градиента или экскреции легких цепей с мочой. Диагностический процесс при лимфомах включал в себя иммуногистохимические исследования опухолевой ткани лимфатического узла, иммунофенотипирование клеток крови и костного мозга, компьютерную томографию, а при необходимости, магнитно-резонансную томографию. При диагностике ХМЛ обязательным было обнаружение в клетках крови и костного мозга Ph'-хромосомы и химерного гена *BCR/ABL*.

Среди пациентов с острым лейкозом 9 больных обследованы в первом остром периоде заболевания, 2 (ОЛЛ — 1, ОМЛ — 1) — при рецидиве заболевания и 1 пациент с ОМЛ — в фазе ремиссии. Четырем больным с ХЛЛ и НХЛ и 1 больному с ММ обследование проведено в фазе ремиссии. Среди обследованных пациентов 7 больным с впервые выявленным заболеванием исследования проводились до начала специфической терапии: 3 больных с ХЛЛ, 1 — с острым лейкозом, 1 — с ЛХ, 2 — с ММ, 1 — с ХМЛ. Шесть больных с ХЛЛ и НХЛ получали терапию препаратами моноклональных антител (ритуксимаб, кэмпас). Двум больным с ММ проводилась монотерапия велкейдом. Остальные пациенты получали курсовую цитостати-

Таблица 1. Характеристика обследованных больных

Клинический диагноз	Число больных (n)	В том числе:		Возраст
		мужчин	женщин	
Множественная миелома	15	5	10	26–70
ОЛ:				
ОЛЛ	2	1	1	18 и 52
ОМЛ	10	5	5	28–73
Итого:	12			
ХЛ:				
ХЛЛ	33	19	14	46–81
ХМЛ в хронической фазе	4	3	1	34–52
идиопатический миелофиброз	1	1	—	60
эссенциальная тромбоцитемия	1	1	—	44
Итого:	39			
Злокачественные лимфомы	19	9	10	27–66
Всего	85	44	41	

ческую химиотерапию. На момент обследования клинически значимая лейкогранулоцитопения (стадия III–IV) выявлялась у 10 пациентов: 7 больных с ОМЛ, 1 – с НХЛ, 1 – с ХЛЛ, 1 – с ММ.

Инфекционные осложнения диагностировали на основании клинических, микробиологических, микологических и молекулярно-биологических методов исследования. В период глубокой нейтропении 4 степени (содержание нейтрофилов в периферической крови менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$) инфекционные осложнения клинически диагностировали на основании однократного повышения температуры тела более $38,5^\circ\text{C}$ или повторного повышения более $38,0^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, не объяснимых течением основного заболевания и проводимой терапией.

Инфекционные осложнения (ИО) с характерной клинической симптоматикой, возникшие на фоне проведения специфической терапии или после ее завершения, были обнаружены у 50 обследованных больных. У 35 больных клинических признаков ИО не было, эти пациенты составили группу сравнения.

Для обнаружения геномов возбудителей респираторных инфекций использовали разработанные в ЦНИИ эпидемиологии наборы реагентов на основе ПЦР в мультипраймерном формате с детекцией в режиме реального времени: респираторно-синцитиального (РС-вируса), 4 типов вируса парагриппа (ПГ), риновирусов, коронавирусов (OC43, 229E, NL63, HKU1), метапневмовируса, аденовирусов и бокавируса человека.

Кроме того применяли коммерческие наборы реагентов «АмплиСенс» (ФГУН ЦНИИЭ, Москва) для выявления вирусов гриппа А и В, А/Н1N1 «свиного гриппа» (А/Н1N1_{sw}), *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, а также вирусов группы герпеса (герпеса простого 1 и 2 типов, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса 6 типа и вируса Эпштейна–Барр). Бактериологические исследования проводили в соответствии с нормативной документацией [2]. Выявление грибов рода *Candida* проводили культуральным методом [3]. В качестве исследуемого материала использовали мазки из носоглотки и ротоглотки и венозную кровь, а для бактериологических и микологических анализов – также мокроту и мочу.

Результаты

Были проанализированы результаты ПЦР-диагностики респираторных инфекций у онкогематологических больных с инфекционными осложнениями (табл. 2).

Как показано в таблице 2, РС-вирусная инфекция была диагностирована у 2 больных, причем в 1 случае наблюдалась смешанная РС-вирусная–*M. pneumoniae*-инфекция. Клиническим проявлением инфекции в обоих случаях служила лихорадка, причем при РС-вирусной моноинфекции температура достигала $39,0^\circ\text{C}$, а смешанная вирусно-микоплазменная инфекция проявлялась лишь субфебрильной температурой до $37,5^\circ\text{C}$.

Таблица 2. Частота выявления геномов возбудителей респираторных инфекций у онкогематологических больных с инфекционными осложнениями

Геном, выявленный методом ПЦР	ММ (n=9)	Клинический диагноз				НХЛ (n=11)
		ОЛ		ХЛ		
		ОЛЛ (n=2)	ОМЛ (n=6)	ХЛЛ (n=19)	ХМЛ (n=3)	
РС-вирус	0	0	1	1	0	0
Грипп А	2	0	0	0	0	2
Грипп В	0	0	0	0	0	0
Грипп А/Н1N1Sw	0	0	0	1	1	1
ПГ-1	0	0	0	0	0	0
ПГ-2	0	0	0	0	0	1
ПГ-3	1	0	1	0	0	1
ПГ-4	0	0	0	0	0	0
Риновирусы	2	1	0	6	0	2
Аденовирусы	0	0	0	0	0	0
Коронавирусы	1	0	0	2	0	0
Метапневмовирус	0	0	0	1	0	0
Бокавирус	0	0	0	0	0	1
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0	1	0	1	0	0

Вирус гриппа типа А выявлен у 4 больных в период эпидемического подъема в феврале 2009 г. Во всех 4 случаях инфекция сопровождалась лихорадкой до 39,0 °С и симптомами респираторной инфекции (кашель, насморк). У одной больной с НХЛ (лимфома маргинальной зоны) было диагностировано обострение хронического бронхита. Все случаи «свиного гриппа» наблюдались в ноябре 2009 г. У больного с ХЛЛ на фоне специфического лечения по программе флударабин–циклофосфамид выявлена смешанная инфекция из гриппа А/Н1N1_{sw} и риновирусов. У всех больных инфекция протекала с длительной лихорадкой (до 38,6 °С), а в 1 случае у больного с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой через 1 нед после завершения очередного цикла терапии по схеме R-СНОР диагностирована острая правосторонняя пневмония с характерной клинической симптоматикой, подтвержденная рентгенологически. Следует отметить, что лечение смешанной инфекции было более длительным и сложным, потребовавшим использования и антибиотиков, и противовирусных препаратов и применения внутривенных иммуноглобулинов.

Вирусы ПГ 2 и 3 типов выявлены у 4 пациентов. У больного с фолликулярной лимфомой после окончания очередного цикла R-СНОР вирус ПГ 3 типа обнаружен в ассоциации с бокавирусом. У больного с ОМЛ после курса терапии по схеме 7+3 наблюдалась тяжелая гранулоцитопения (4 степень), что осложнилось присоединением острой очаговой пневмонии. При дополнительном обследовании этого пациента обнаружен ПГ-3. Больной с ММ получал третий 21-дневный цикл лечения по программе бортезомиб (велкейд)—дексаметазон, что осложнилось развитием *herpes labialis* с выраженными поражениями кожи лица. При этом одновременно зарегистрирована парагриппозная инфекция 3 типа. Следующий цикл специфической терапии у этого больного был начат после полного купирования возникшей инфекции, а межкурсовой интервал увеличен в 2 раза. У всех 4 пациентов инфекция протекала с лихорадкой до 38,5 °С.

Наиболее часто у обследованных больных был выявлен геном риновирусов. Клинические проявления риновирусной инфекции были слабо выражены. Однако у одной больной с ОЛЛ была диагностирована острая левосторонняя пневмония, которая характеризовалась кашлем с мокротой, одышкой и повышением температуры тела до 38,0 °С. У 4 больных не было отмечено повышения температуры, еще у 4 наблюдался субфебрилитет (до 37,5 °С) и у 2 отмечено повышение температуры до 38,0 °С. У 1 пациента с ХЛЛ одновременно были обнаружены риновирусы и коронавируса 229Е.

Коронавирусы обнаружены в 3 случаях, причем, как указано выше, в 1 случае в ассоциации с риновирусами. У больных отмечались симптомы респираторного заболевания — кашель, озноб. Повышение температуры тела до 37,5 °С наблюдалось в 2 случаях.

Метапневмовирус был найден только у больного с ХЛЛ. Клинически инфекция характеризовалась субфебрильной температурой и симптомами респираторного заболевания — сухой кашель, заложенность носа. Бокавирусная инфекция обнаружена также у 1 больного, причем в ассоциации с вирусом ПГ 3 типа, ее клинические особенности описаны выше. Надо отметить, что геном бокавируса был выявлен в крови и не обнаружен в мазках из носа.

M. pneumoniae была выявлена в 2 случаях: 1 раз в ассоциации с РС-вирусом, и 1 раз в виде моноинфекции. В последнем случае она наблюдалась у больного с острым лейкозом на фоне состояния, расцененного как фебрильная нейтропения. Вирусы гриппа В, ПГ 1 и 4 типов, аденовирусы и *Chlamydomphila pneumoniae* в данном исследовании не выявлены ни в одном случае.

Исследование наличия геномов вирусов группы герпеса в крови показало, что в 42,0% случаев развитие респираторных инфекций протекало на фоне герпесвирусной вирусемии. Геном вирусов группы герпеса 1 и 2 типа выявлен в 5,2% случаев, вируса Эпштейна—Барр — в 26,3% и цитомегаловируса — в 10,5% случаев. Геном вируса герпеса 6 типа не был обнаружен ни в одном случае. При обнаружении в крови геномов вирусов простого герпеса и цитомегаловируса проводилась противовирусная терапия ацикловиром и ганцикловиром.

Проведенное бактериологическое исследование мазков из зева показало преобладание грамположительной флоры, характерной для полости рта — *Streptococcus viridians*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus anhaemolyticus*. Эта же флора превалировала в мокроте. Только в 5 случаях из мокроты были выделены грамотрицательные бактерии: в 3 случаях — *Escherichia coli*, причем 1 раз в ассоциации с метапневмовирусом, 1 раз — *Pseudomonas aeruginosa* и 1 раз — *Proteus mirabilis* в ассоциации с вирусом гриппа А.

Бактериemia, обусловленная *Escherichia coli*, была выявлена у больного с ХЛЛ, причем возбудители респираторных инфекций и геномы вирусов группы герпеса в этом случае выявлены не были.

В целом проведенное исследование позволило установить этиологию инфекционного процесса в 62% случаев инфекционных осложнений у онкогематологических больных (у 31 из 50 обследованных).

В группе сравнения (онкогематологические больные без выраженных признаков инфекционных осложнений) инфекционные агенты были выявлены у 8 из 35 (22,8%) пациентов. У 7 из этих больных в 3 случаях был выявлен геном риновирусов, в 2 — коронавируса и в 2 — *M. pneumoniae*. Клинических проявлений инфекционных осложнений у указанных больных не выявлено, противовирусная терапия не проводилась. У 1 больного с ХЛЛ одновременно были выявлены геномы вируса гриппа А и метапневмовируса. Кроме того, из мокроты были выделены *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Следует

отметить, что у указанного больного материал был получен в период цитостатической терапии. Возможно, иммуносупрессия, связанная с лечением основного заболевания, была причиной отсутствия выраженных клинических признаков развивающегося инфекционного осложнения.

Обсуждение

Инфекционные осложнения являются одной из основных причин снижения эффективности лечения онкогематологических больных. Применение цитостатических препаратов приводит к иммуносупрессии, в частности к подавлению Т-клеточного иммунитета [4]. В настоящее время разработаны эффективные схемы лечения бактериальных инфекций при гемобластозах. Их применение позволило значительно снизить летальность от гнойно-септических осложнений.

Не меньшую роль в развитии инфекций у онкогематологических больных играют вирусы. Хорошо изучены и разработаны методы лечения и профилактики герпесвирусных инфекций, вызывающих тяжелые осложнения у больных гемобластозами [5]. Респираторным вирусным инфекциям уделялось меньшее внимание. Частично это можно объяснить трудоемкостью и длительностью методов вирусологической диагностики респираторных инфекций. Кроме того, развитие пневмоний на фоне вирусных инфекций часто связано с присоединением бактериальной микрофлоры, а так как диагностика респираторных вирусов не проводилась, то бактериям приписывалась первичная и монополярная роль в возникновении пневмоний.

Между тем этиология пневмоний, составляющих до четверти инфекционных осложнений у онкогематологических больных, часто оставалась не установленной, и они выделялись в малопонятную и клинически бесполезную категорию «идиопатических пневмоний» или «пневмоний неясной этиологии».

Внедрение молекулярно-биологических методов позволило расширить возможности этиологической диагностики и установить значительную роль респираторных вирусов в этиологии пневмоний у иммунодепрессивных онкогематологических больных [6].

В данном исследовании был использован комплекс диагностических тестов на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, позволяющий обнаруживать основные возбудители респираторных инфекций, известных в настоящее время. Применение этого комплекса тестов в совокупности с культуральными бактериологическими и микологическими методами позволило установить этиологию инфекционных осложнений в 62% случаев. В группе сравнения возбудители респираторных инфекций были обнаружены только в 22,8% случаев (у 8 из 35 обследованных), причем в одном эпизоде можно было предположить начало развития инфекционного процесса. В 7 других случаях в качестве этиологических

агентов выступали риновирусы (3 случая), коронавирусы (2 случая) и *M. pneumoniae* (2 случая). Обращало на себя внимание, что эти возбудители при развитии инфекционных осложнений вызывали сравнительно легкое течение инфекционного процесса. В целом эти данные подтверждают результаты G. Gerna и соавт. [9], которые проводили исследования по сходному сценарию у больных с трансплантацией легких. В их работе этиология инфекционного процесса была установлена в 57,1% случаев.

РС-вирусная инфекция была выявлена только у 2 больных. Этот инфекционный агент вызывает как легкие, иногда бессимптомные формы заболевания, так и тяжелые пневмонии, особенно у больных при трансплантации стволовых гемопоэтических клеток [10]. Особую опасность для иммунодепрессивных онкогематологических больных представляют эпидемические вирусы гриппа А, вирус «свиного гриппа» и вирусы ПГ. В нашем исследовании именно с этими возбудителями были связаны тяжелые инфекционные процессы в легких и тяжелое клиническое течение инфекции.

Хотя в этой серии исследований аденовирусная инфекция не была выявлена, в наших предыдущих исследованиях [12] было показано, что геном аденовирусов часто выявляется в крови без обнаружения его в эпителии носа. Такое частое выявление аденовирусов в крови без обнаружения его в эпителии носа (наиболее вероятных входных ворот при первичной инфекции) говорит о том, что, скорее всего, у больных происходила активация латентной вирусной инфекции. Эти наблюдения подтверждают мнение E. Whimbeу и соавт. [10], которые отмечали, что такое течение аденовирусной инфекции характерно именно для онкогематологических больных, вирусемия при иммунодепрессиях может приводить к развитию геморрагических циститов, гепатитов и поражению других органов [11].

Коронавирусы часто выявляются у онкогематологических больных при респираторных инфекциях [12]. Показано, что коронавирусы NL63 и HKU1 участвуют в возникновении респираторных инфекций у больных при трансплантации стволовых клеток [13]. Аналогичные результаты получены и в наших исследованиях.

В данной работе были также изучены 5 инфекционных агентов, не исследованных нами ранее. Это риновирусы, метапневмовирус, бокавирус, *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*.

Риновирусы, число известных серотипов которых превышает 100, часто выявляются у реципиентов костного мозга [14]. Распространение инфекции обычно ограничивается верхними дыхательными путями. Однако у части больных описано развитие идиопатической интерстициальной пневмонии. Развитие пневмонии при риновирусной инфекции мы наблюдали и в нашем исследовании. Эти данные указывают на необходимость дальнейшего изучения роли риновирусов в развитии инфекций у онкогематологических больных.

Метапневмовирус был обнаружен нами у 1 больного. Бокавирус также был обнаружен только в 1 случае. В литературе имеются только единичные работы по исследованию этих «новых» вирусов у иммуносупрессивных онкогематологических больных. Признается значение метапневмовирусов как агентов, вызывающих тяжелые респираторные инфекции у онкогематологических больных [15]. В то же время значение бокавирусов остается неясным [16]. Однако то, что они, хотя и в единичных случаях, были обнаружены у обследованных больных, а также результаты работ рассмотренных выше [8], указывает на необходимость дальнейшего изучения этих инфекционных агентов.

Mycoplasma pneumoniae была диагностирована в 2 случаях, причем в 1 эпизоде в ассоциации с РС-вирусом. Также 2 случая *Mycoplasma pneumoniae* были выявлены в группе сравнения. Эти данные, по нашему мнению, подтверждают факт возможности длительной персистенции микоплазм. Ранее было показано, что респираторный микоплазмоз чаще всего протекает как смешанная вирусно-микоплазменная инфекция [17]. Очевидно, это связано с иммуносупрессивным действием *Mycoplasma pneumoniae* [18]. Полученные результаты, а также достаточно частое обнаружение смешанных респираторных вирусных инфекций с вируса-

ми группы герпеса, указывают на необходимость дальнейшего изучения ассоциированных инфекций для лучшего понимания патогенеза инфекционного процесса у онкогематологических больных в состоянии иммуносупрессии.

Представленные материалы доказывают, что у больных гемобластозами помимо бактериальных инфекций часто выявляются респираторные вирусные и микоплазменные инфекции. Это свидетельствует о необходимости проводить больным с гемобластозами углубленные исследования по определению возбудителей при оценке риска возникновения инфекционных осложнений. Такие исследования будут способствовать раннему назначению адекватной терапии при появлении клинических признаков инфекционно-воспалительных осложнений у больных данной группы. Зачастую вирусные инфекции трудно диагностировать клинически, что указывает на необходимость тщательного лабораторного мониторинга этих больных. При определении практической значимости выявления того или иного инфекционного возбудителя необходима комплексная клинико-лабораторная оценка. Методом выбора для уточнения этиологии конкретного случая инфекционного осложнения является мультиплексная ПЦР в реальном времени.

Л и т е р а т у р а

- Schmipff S.C. Infection in neutropenic cancer patients: three decades of progress. *Support Care Cancer* 1997;5:343–5.
- Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ МЗ СССР №535 от 22 апреля 1985 г.
- Клясова Г.А. Микотические инфекции: клиника, диагностика, лечение. Инфекции и антибиотикотерапия 2000;2(6):184–9.
- Wade K. Viral infections in patients with hematological malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:368–74.
- Моисеев С.И., Нуйя М.Л., Чеботкевич В.Н. и др. Цитомегаловирусная инфекция в практике трансплантации костного мозга. *Тер архив* 2002;74(7):44–8.
- Чеботкевич В.Н., Румель Н.Б., Абдулкадыров К.М. Респираторные вирусные инфекции у онкогематологических больных. *Тер архив* 2001;73(11):11–5.
- Williams J.V., Harris P.A., Tollefson S.J. et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in other-wise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350:443–50.
- Koskenvuo M., Mottonen M., Waris M. et al. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr* 2008;187(9):1011–5.
- Gerna G., Vitulo P., Povidia F. et al. Impact of human metapneumovirus and human cytomegalovirus viruses in the lower respiratory tract infections of lung transplant recipients. *J Med Virol* 2008;80(10):1869.
- Whimbey E., Ghosh S. Respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000;20:235–55.
- Lenaerts L., De Clerq E., Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 2008;18(6):357–74.
- Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С., Волков А.В., Шилова Е.Р. Молекулярно-биологическое изучение роли респираторных вирусов при инфекционных осложнениях у больных гемобластомами и депрессиями кроветворения. *Вопросы онкологии* 2006;52(4):421–6.
- Chatzidimitriou D., Gavriilaki E., Sakellari I., Disa E. Hematopoietic cell transplantation and emerging viral infections. *J Med Virol* 2010;82(3):528–38.
- Whimbey E., Englund J.A., Chouch R.B. Community respiratory infections in immunocompromised patients with cancer. *Amer J Med* 1997;102(17):10–8.
- Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hemopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2008;143(4):455–67.
- Schildgen O., Muller A., Allander T. et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev*;21(2):291–304.
- Чеботкевич В.Н., Осидак Л.В., Румель Н.Б. Состояние клеточного и гуморального иммунитета при острых респираторных вирусных и микоплазменных инфекциях. *Педиатрия* 1981;5:53–4.
- Чеботкевич В.Н., Боженко Л.В., Лисин В.В., Есипенко Г.Г. Состояние клеточного иммунитета и фагоцитарных факторов при микоплазма-пневмонии инфекции у морских свинок. *Ж микробиол эпидемиол и иммунобиол* 1981;1:84–9.

ФАКТОРЫ РИСКА ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Д.Н. Балашов^{1,2}, П.Е. Трахтман^{1,2}, Е.В. Скоробогатова^{1,2}, Ю.В. Скворцова^{1,2},
И.П. Шипицына^{1,2}, А.А. Масчан¹

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

²Российская детская клиническая больница, Москва

Контакты: Дмитрий Николаевич Балашов bala8@yandex.ru

Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция является чрезвычайно серьезной проблемой у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Наше исследование посвящено оценке значимости основных факторов риска развития ЦМВ-инфекции у пациентов после аллогенной ТГСК (n=168) от родственного (n=56), неродственного (n=90) и гаплоидентичного донора (n=22).

В работе была показана клиническая значимость вида ТГСК в качестве фактора риска развития ЦМВ; наихудший прогноз продемонстрирован у пациентов после неродственной и гаплоидентичной ТГСК. Кроме того, было доказано, что острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) \geq II степени также достоверно увеличивает вероятность реактивации ЦМВ при любых видах ТГСК.

При сравнении частоты реактивации инфекции и бессобытийной выживаемости в группах пациентов, получивших ТГСК от ЦМВ-серопозитивного донора и ЦМВ-серонегативного донора, достоверных различий получено не было. Тяжесть течения ЦМВ-инфекций была выше во 2-й группе. При исследовании целесообразности проведения профилактического курса ганцикловира не было продемонстрировано эффективности такого подхода и какого-либо влияния на сокращение сроков и частоты реактивации ЦМВ.

Ключевые слова: цитомегаловирус, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, факторы риска, упреждающая терапия

RISK FACTORS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION

D.N. Balashov^{1,2}, P.E. Trakhtman^{1,2}, E.V. Skorobogatova^{1,2}, Yu.V. Skvortsova^{1,2}, I.P. Schipitsyna^{1,2}, A.A. Maschan¹

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

²Russian Children Clinical Hospital, Moscow

Cytomegalovirus infection (CMV) is an extremely serious problem in patients after hematopoietic stem cells transplantation (HSCT). We have evaluated importance of major risk factors CMV development in patients after allogeneic HSCT (n=168) from related (n=56), unrelated (n=90) or haploidentical donors (n=22).

Clinical importance of HSCT type as risk factors CMV development was shown; patients after unrelated or haploidentical HSCT had the worst prognosis. We also demonstrated that \geq 2 grade acute GVHD statistically significant increase CMV reactivation probability after any types of HSCT.

Comparison of infection reactivation frequency and event-free survival between subgroups of patients, received HSCT from CMV-positive and CMV-negative donors, absence of any differences was revealed. In the second group CMV infection was more severe. Preventive gancyclovir treatment has not shown efficacy and any influence on frequency of CMV reactivation.

Key words: cytomegalovirus, hematopoietic stem cells transplantation, risk factors, preventive treatment

Введение

Цитомегаловирус (ЦМВ) чрезвычайно широко распространен в человеческой популяции. По различным данным к первому году жизни инфицируется каждый пятый житель планеты, а в зрелом возрасте серопозитивными являются от 40 до 100% населения, с широкими вариациями в зависимости от экономических условий жизни и географии [1].

У иммунокомпетентного человека после первичного инфицирования и формирования иммунного ответа ЦМВ пожизненно персистирует в виде латентной инфекции. Естественным резервуаром латенции ЦМВ является строма солидных органов, однако в ряде исследований было показано, что и гемопоэтические предшественники могут являться таким резервуаром и передавать вирусный геном периферическим клеткам [2–4].

ЦМВ чаще других известных герпес-вирусов служит причиной тяжелых и даже жизнеугрожающих инфекций, однако последние встречаются только у пациентов с выраженными дефектами иммунной системы. В такую группу риска, помимо пациентов с первичными иммунодефицитами, недоношенных новорожденных, больных с ВИЧ, безусловно, входят и пациенты после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

До появления технологии мониторинга реактивации и «упреждающего» лечения поражения, вызываемые ЦМВ, часто являлись причиной тяжелых органических нарушений и высокой смертности реципиентов ТГСК. Несмотря на то, что современные подходы к контролю ЦМВ в настоящее время позволили значительно уменьшить эту проблему, активное использование ТГСК от альтернативных доноров способствует увеличению значимости ЦМВ у данной категории больных.

К факторам риска развития ЦМВ у реципиентов ГСК относят длительную и интенсивную иммуносупрессию, Т-клеточную деплецию трансплантата, тяжелую острую реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), ЦМВ-статус донора и пациента, применение кортикостероидов, длительность иммунореконституции и т. д. [5].

Несмотря на существующие знания об основных факторах риска, остался целый ряд нерешенных вопросов относительно их значимости в контексте риска возникновения и тяжести течения ЦМВ у реципиентов ГСК.

Материалы и методы

В исследование были включены все пациенты ($n=157$), которым проводилась аллогенная ТГСК от родственного или альтернативного (неродственного, гаплоидентичного) донора в период с января 2006 по январь 2010 г. Медиана возраста пациентов составила 7 (1–17) лет. В связи с тем, что в нескольких случаях было выполнено ≥ 2 трансплантаций, в нашем исследовании было проанализировано 168 случаев ТГСК.

Больные были разделены на группы в соответствии с типом проводимой ТГСК.

1. Пациенты после ТГСК от родственного донора – трансплантированные от родственного HLA-идентичного донора или родственного донора, несовместимого с пациентом по одному HLA-антигену ($n=56$).

2. Пациенты после ТГСК от неродственного донора – трансплантированные от неродственного HLA-идентичного донора или неродственного донора, несовместимого с пациентом по одному HLA-антигену ($n=90$).

3. Пациенты после ТГСК от родственного гаплоидентичного донора ($n=22$).

Наличие гаплоидентичного донора являлось поводом для проведения Т-клеточной деплеции трансплантата с помощью иммуно-магнитной сепара-

ции «CliniMACS System» (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Для удаления Т-клеток из трансплантата в 3 случаях использовалась CD34+-селекция, у 21 пациента – CD3+CD19+-деплегия и у 1 – CD4+CD8+CD19+-деплегия.

В исследование были включены больные с различными онкологическими, гематологическими, иммунологическими и генетическими заболеваниями. Подробный отчет о патологиях, при которых проводилась ТГСК, представлен в таблице. Показания к проведению ТГСК определялись в соответствии с общепринятыми критериями для проведения данного метода терапии.

У пациентов перед ТГСК было использовано более 30 различных режимов подготовительной химиотерапии. В большинстве случаев у пациентов с гемобластомами и наследственными заболеваниями применялись режимы кондиционирования, где в качестве базового миелоаблативного агента выступал бусульфид, доза которого варьировала от 16 мг/кг до 20 мг/кг (у детей до 3 лет). В число больных, получивших бусульфид, вошли 8 детей с анемией Фанкони, у которых в связи с особенностями основного заболевания доза препарата была снижена до 4 мг/кг с целью редукции органной токсичности и РТПХ. В 20 случаях был использован структурный аналог бусульфона – треосульфид в дозе 42 г/м². У 2 пациентов с ОЛЛ было выполнено тотальное облучение тела в дозе 12 Гр. У больных приобретенной апластической анемией проводилось немиелоаблативное кондиционирование, где основной упор был сделан на иммуноабляцию посредством циклофосфида, флударабина и антиtimoцитарного глобулина, а при неродственной ТГСК дополнительно использовалось торакоабдоминальное облучение в дозе 2 Гр и ритуксимаб.

Перед выполнением ТГСК проводился иммуноферментный анализ крови доноров и реципиентов для определения их ЦМВ-серологического статуса. Целью данного обследования служило определение степени риска развития или реактивации ЦМВ-инфекции, что являлось необходимым для построения дальнейшей тактики мониторинга и профилактики инфекции.

На основании данных предтрансплантационного обследования была особо выделена группа сверхвысокого риска, куда были отнесены пациенты, получившие трансплантат от серонегативного неродственного донора. В эту же группу вошли все больные, которым проводилась гаплоидентичная ТГСК независимо от серологического статуса донора.

В связи с невозможностью скрининга и отбора ЦМВ-серонегативных доноров компонентов крови все трансфузируемые препараты (тромбоконцентрат и эритроциты) проходили обработку с помощью лейкоцитарных фильтров IV поколения. Трансфузия фильтрованных препаратов проводилась абсолютно всем пациентам независимо от степени риска развития ЦМВ.

С 1-го по 28-й день после ТГСК всем пациентам

Таблица. Спектр заболеваний пациентов, при которых проводилась ТГСК

Заболевание	ТГСК от неродственного донора	ТГСК от родственного донора	Гаплоид ТГСК	Всего больных
Острый лимфобластный лейкоз	13	9	4	26
Острый миелобластный лейкоз	20	19	8	47
Гипер-IgM-синдром	0	1	0	1
Апластическая анемия	13	14	0	27
Синдром Вискотта–Олдрича	2	0	0	2
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз	5	1	3	9
X-аденолейкодистрофия	2	0	0	2
Синдром Краббе–Бенеке	1	0	0	1
Острый бифенотипический лейкоз	6	0	0	6
Синдром Гурлера	10	1	0	11
Хронический миелолейкоз	1	2	0	3
Анемия Фанкони	8	3	0	11
Семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз	2	0	0	2
Острый недифференцированный лейкоз	1	0	0	1
Лимфома Беркитта	0	0	1	1
Миелодиспластический синдром	2	1	1	4
Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность	0	0	1	1
Хроническая гранулематозная болезнь	1	0	0	1
Нейробластома	0	0	1	1
Серповидно-клеточная анемия	0	1	0	1

проводилась профилактика вирусных инфекций посредством внутривенной формы ацикловира в дозе 750 мг/м²/сут. Затем использовались пероральные формы ацикловира или валацикловира, терапия которыми продолжалась как минимум до +120 дня (при необходимости дольше). Поводом для продолжения вирусостатической терапии служила недостаточность трансплантата, слабая иммунореактивность, интенсивная иммуносупрессивная терапия или РТПХ.

С января 2006 по декабрь 2009 г. у всех пациентов, отнесенных в группу сверхвысокого риска (пациенты с серонегативным или гаплоидентичным донором), проводились дополнительные меры, направленные на профилактику ЦМВ-инфекции, а именно – 7-дневный курс ганцикловира в дозе 10 мг/кг/сут до проведения ТГСК. С января 2009 г., учитывая промежуточные данные сравнения с группой исторического контроля, у пациентов с серонегативным донором профилактический курс ганцикловира больше не проводился.

С целью своевременного выявления и контроля ЦМВ у всех пациентов после ТГСК проводился рутинный лабораторный количественный мониторинг ЦМВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ис-

следование проводилось 1 раз в нед в течение не менее 2 мес после ТГСК, либо дольше, если этого требовала клиническая ситуация.

Лабораторные признаки ЦМВ-виремии, выявленные методом ПЦР, являлись поводом для начала упреждающей терапии ганцикловиrom. При неродственной и гаплоидентичной трансплантации показанием для начала вирусостатической терапии служила ЦМВ-виремия независимо от количественных показателей ДНК ЦМВ в крови; при проведении ТГСК от родственного донора ганцикловиr назначался при ≥ 1000 копий ДНК ЦМВ/мл крови. В ряде случаев вопрос о начале упреждающей терапии решался индивидуально на основании оценки имеющихся у пациента факторов риска. Критерием для прекращения упреждающей терапии считалось однократное получение негативного результата ПЦР-исследования.

Для проведения основных этапов лабораторной диагностики методом ПЦР использовались наборы реагентов для выделения ДНК «ДНК-сорб-В» вариант 100 (ИнтерЛабСервис, Россия). Клиническим материалом для выделения ДНК являлась кровь, а при необходимости спинномозговая жидкость, моча, плевральная жид-

кость и т. д. Для количественного определения ДНК ЦМВ в материале методом ПЦР использовался набор реагентов «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» (ИнтерЛабСервис, Россия). Реакция амплификации проводилась на оборудовании Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel 2007, а также программы Statistica 7.1.

Расчет показателей выживаемости рассчитывался с помощью метода Каплана–Майера. Достоверность различий в выживаемости в исследуемых группах анализировалась посредством Log-rank-теста. С целью объективной оценки долгосрочного прогноза у пациентов после ТГСК вычислялись показатели бессобытийной выживаемости (БСВ). Событиями при оценке БСВ являлись рецидив основного заболевания, отторжение трансплантата, констатация первичного непрививления, а также смерть пациента.

Результаты

Реактивация ЦМВ после ТГСК была выявлена в 87 (51,8%) из 168 случаев. При оценке частоты реактивации инфекции в зависимости от вида ТГСК были получены следующие данные: реактивация ЦМВ при неродственной ТГСК – в 53 (58,9%) из 90 случаев; при родственной ТГСК – в 21 (37,5%) из 56 случаев; при гаплоидентичной ТГСК – в 13 (59,1%) из 22 случаев ($p=0,032$). Наибольшая частота реактивации ЦМВ отмечена в течение первого месяца после ТГСК (рис. 1).

При оценке кумулятивной вероятности было вы-

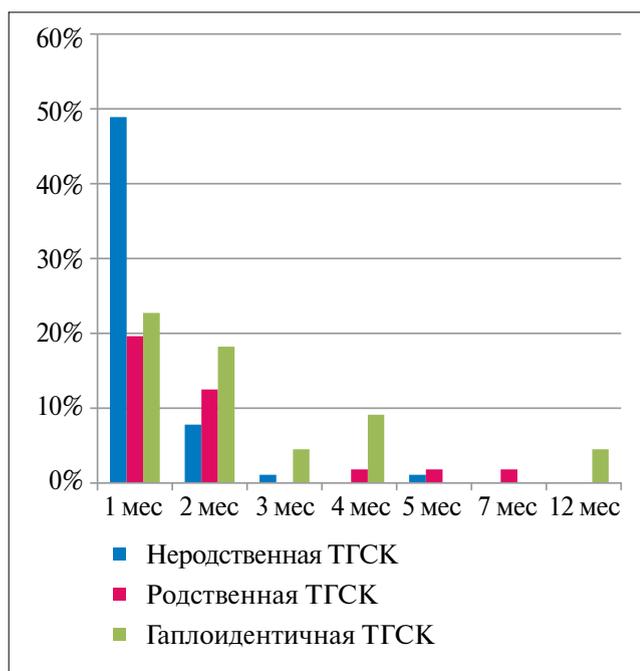


Рис. 1. Частота первичной реактивации ЦМВ в зависимости от сроков после трансплантации при различных вариантах ТГСК (число пациентов при каждом варианте ТГСК принято за 100%)

яснено, что наименьшая кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ была в группе пациентов после родственной ТГСК; она составила $0,38 \pm 0,066$. В группах пациентов после гаплоидентичной и неродственной ТГСК кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ оказалась равной $0,66 \pm 0,110$ и $0,60 \pm 0,052$ соответственно (рис. 2). Статистически достоверных различий в кумулятивной вероятности развития ЦМВ между пациентами после гаплоидентичной и неродственной ТГСК выявлено не было ($p=0,492$).

Наличие или отсутствие ЦМВ-виремии в об-

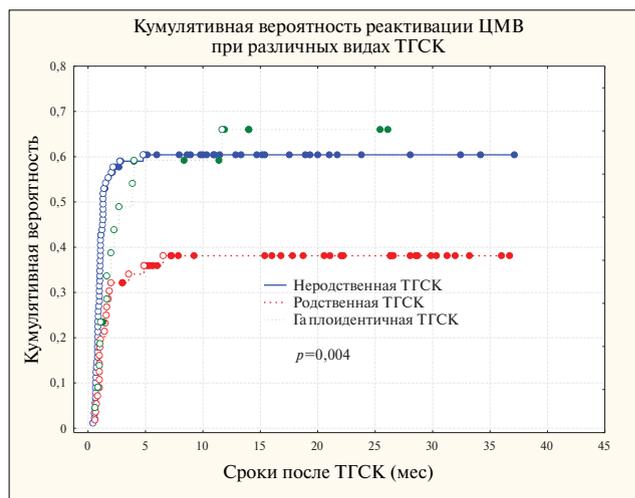


Рис. 2. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ при различных видах ТГСК ($p=0,004$)

щем пуле пациентов на БСВ не повлияло. Частота развития события в группе пациентов, имевших реактивацию ЦМВ, составила 34,2% (у 28 из 82 пациентов); в группе больных с неразвившейся ЦМВ-виремией этот показатель был равен 34,7% (у 26 из 75 пациентов).

БСВ в исследуемых группах не отличалась ($p=0,92$) и составила $0,61 \pm 0,058$ в группе пациентов, имевших ЦМВ-виремию после ТГСК; в группе больных с неразвившейся ЦМВ-виремией показатель БСВ составил $0,57 \pm 0,071$ (рис. 3).

В исследовании были также проанализированы

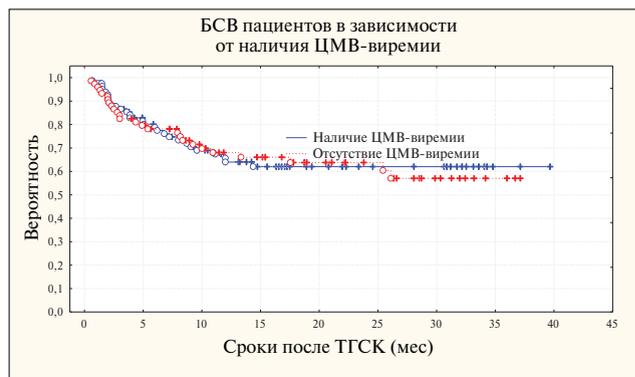


Рис. 3. Вероятность БСВ у пациентов, имевших реактивацию ЦМВ, в сравнении с пациентами без ЦМВ-виремии

особенности развития ЦМВ-инфекции и показатели выживаемости пациентов в зависимости от серологического ЦМВ-статуса донора. Учитывая имеющиеся лабораторные данные, для анализа был доступен 81 больной после неродственной ТГСК: в 31 случае была выполнена ТГСК от ЦМВ-серопозитивного донора и в 50 случаях – от серонегативного донора. Реактивация ЦМВ в 1-й группе была выявлена у 16 (51,6%) из 31 пациента на сроках 14–61 ($m=20$) дней после ТГСК, во 2-й – у 34 (68%) из 50 пациентов на сроках 8–144 ($m=19,5$) дней после ТГСК ($p=0,215$). Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ при неродственной ТГСК от ЦМВ-серонегативного донора составила $0,69\pm 0,067$, а при ТГСК от ЦМВ-позитивного донора – $0,54\pm 0,092$ ($p=0,189$) (рис. 4).

БСВ в группе пациентов после трансплантации от

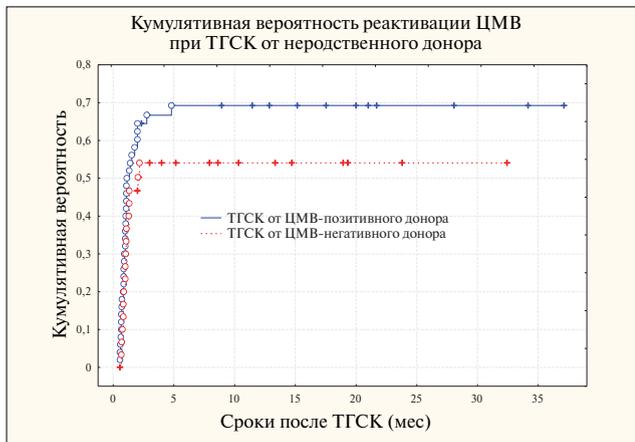


Рис. 4. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ при неродственной ТГСК от ЦМВ-негативного и ЦМВ-позитивного донора ($p=0,189$)

ЦМВ-негативного донора составила $0,54\pm 0,08$, а в группе пациентов после трансплантации от ЦМВ-позитивного донора – $0,63\pm 0,09$ ($p=0,56$). Данные о БСВ на различных сроках после ТГСК представлены на рисунке 5.

С целью профилактики ЦМВ-инфекции 33 па-

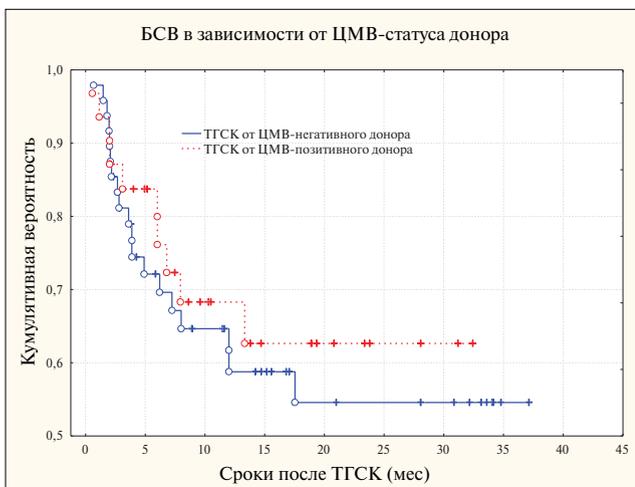


Рис. 5. Кумулятивная БСВ пациентов после неродственной ТГСК от ЦМВ-серопозитивного донора и ЦМВ-серонегативного донора ($p=0,56$)

циентам с ЦМВ-серонегативным неродственным донором был проведен профилактический курс терапии ганцикловиром в течение 7 дней перед ТГСК. У 17 пациентов с ЦМВ-серонегативным неродственным донором терапия ганцикловиром не проводилась. В результате у 23 (69,70%) из 33 пациентов, получивших ганцикловир перед ТГСК, была выявлена реактивация ЦМВ; во 2-й группе (без применения ганцикловира) реактивация ЦМВ обнаружена у 11 (64,71%) из 17 больных.

Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ составляла $0,704\pm 0,08$ для пациентов, получавших профилактический курс ганцикловира, и $0,697\pm 0,13$ для пациентов, не получавших ганцикловир. Достоверных различий при оценке кумулятивной вероятности не выявлено ($p=0,399$) (рис. 6).

Нами также был произведен анализ влияния

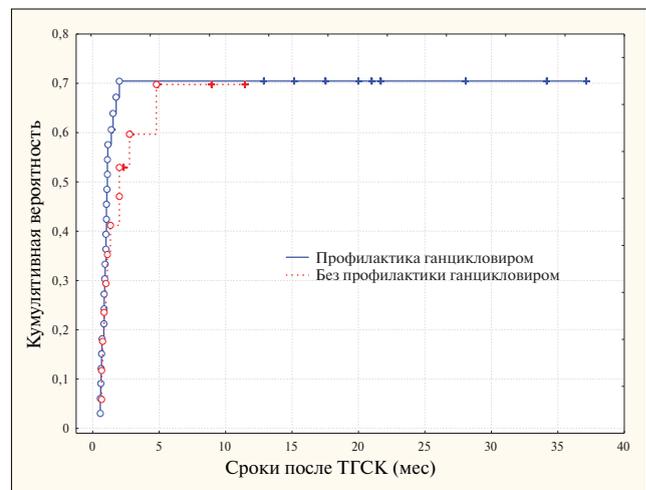


Рис. 6. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ у пациентов, которым проведена трансплантация от ЦМВ-негативного неродственного донора, получавших и не получавших ганцикловир в качестве профилактики перед ТГСК ($p=0,399$)

клинически значимой острой РТПХ (\geq II степени) на вероятность реактивации ЦМВ-инфекции. В группе пациентов не имевших клинически значимых признаков острой РТПХ реактивация ЦМВ была обнаружена в 45 (46,4%) случаях из 97; в группе больных с РТПХ \geq II степени реактивация ЦМВ выявлена в 41 (58,6%) случае из 70 ($p=0,168$). Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ у пациентов с острой РТПХ \geq II степени составила $0,60\pm 0,06$; тот же показатель во 2-й группе был равен $0,48\pm 0,05$. Различия между группами оказались статистически достоверными ($p=0,045$) (рис. 7).

Результатов, демонстрирующих влияние хронической РТПХ на вероятность развития вирусемии, получено не было ($p=0,96$). ЦМВ-вирусемия определялась у 19 (51,3%) из 37 пациентов имевших хроническую РТПХ; в группе больных без хронической РТПХ частота реактивации ЦМВ составила 51,6% (у 67 из 130 пациентов) (рис. 8).

Так как одним из наиболее серьезных осложне-

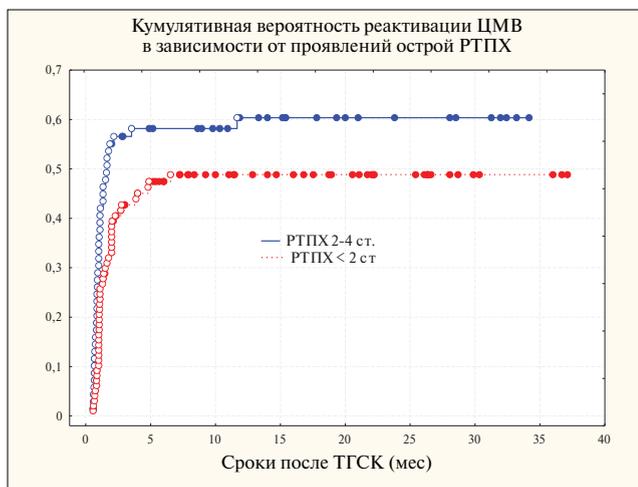


Рис. 7. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ в зависимости от проявлений острой РТПХ в группах пациентов с клинически значимой острой РТПХ \geq II степени ($n=70$) и острой РТПХ $<$ II степени ($n=97$; $p=0,045$)

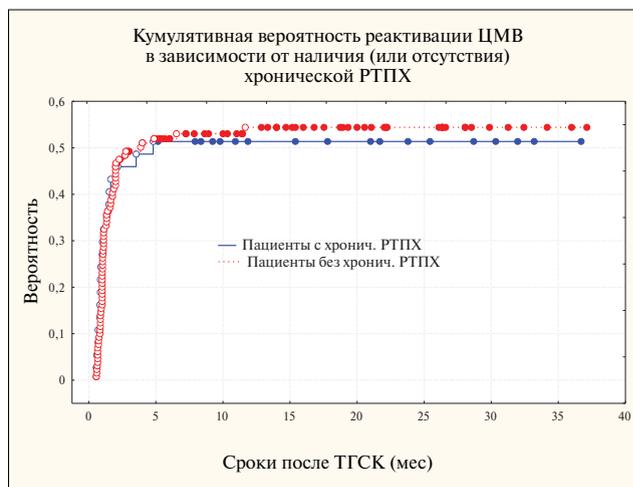


Рис. 8. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ у пациентов с хронической РТПХ и без клинических признаков хронической РТПХ ($n=97$; $p=0,96$)

ний ЦМВ является пневмония, мы проанализировали частоту развития данной проблемы у наших пациентов. Основываясь на имеющихся клинических и лабораторных данных (в том числе обнаружение ЦМВ в биопсийном или аутопсийном материале) после неродственной ТГСК ЦМВ-пневмония выявлена в 7 (7,6%) из 92 случаев; причем в 5 из этих 7 случаев именно ЦМВ-пневмония стала причиной летального исхода. Следует также отметить, что все 5 летальных исходов ЦМВ-пневмонии после неродственной ТГСК были зарегистрированы исключительно у пациентов с ЦМВ-серонегативными донорами. В 2 других случаях ЦМВ-пневмония с ответом на вирусостатическую терапию была выявлена у пациентов с ЦМВ-серопозитивным донором. У пациентов после ТГСК от родственного донора ЦМВ-пневмония была подтверждена в 3 (5,2%) из 58 случаев и стала причиной летального исхода у 2 пациентов. Наибольшая частота развития ЦМВ-пневмонии была отмечена при гаплоидентичной ТГСК (3 случая из 25; 12%); летальный исход в 2 случаях. Таким образом, вероятность летального исхода ЦМВ-пневмонии составила 69% (9 из 13 пациентов) в общем пуле больных.

Обсуждение результатов

Проблема ЦМВ-инфекции после ТГСК является чрезвычайно серьезной, и интерес к ней не ослабевает. Новые знания об особенностях ее диагностики, профилактики и лечения требуют детального анализа. Факторы риска развития ЦМВ, безусловно, существуют и хорошо известны, однако данные об их значимости до настоящего времени вызывают множество вопросов, что служит поводом для продолжения исследовательской работы в данном направлении.

Анализ основных факторов риска с целью определения их значимости был проведен в нашем исследовании на примере 168 случаев аллогенной ТГСК.

Наименьшая частота реактивации ЦМВ (37,5%)

была выявлена при родственной ТГСК. Частота реактивации при неродственной и гаплоидентичной ТГСК была сравнима и составила 58,9% и 59,1% соответственно. Данные пропорции являются логичными и соотносятся с публикуемыми данными. Аналогичным является и соотношение кумулятивной вероятности развития ЦМВ-виремии при различных вариантах ТГСК.

Данная ситуация напрямую связана с особенностями различных видов ТГСК и целым рядом дополнительных факторов. Известно, что интенсивность иммуноаблативной терапии, тяжесть РТПХ, Т-клеточная деплеция трансплантата, особенности иммунорекогнитуции и целый ряд других проблем могут в значительной мере менять степень риска реактивации ЦМВ и тяжесть течения ЦМВ-заболевания. С этой точки зрения реципиенты родственных ГСК являются наименее уязвимой группой пациентов с точки зрения вероятности реактивации ЦМВ-инфекции. Длительная иммунорекогнитуция и интенсивная иммуносупрессия являются ключевыми факторами, обуславливающими развитие ЦМВ после гаплоидентичной ТГСК.

Одним из серьезных факторов, способствующих развитию ЦМВ-инфекции после ТГСК от неродственного донора, служит РТПХ. В нашем исследовании мы продемонстрировали, что вероятность развития ЦМВ-виремии при наличии клинически значимой острой РТПХ выше ($0,60 \pm 0,06$), чем при ее отсутствии или минимальных признаках ($0,48 \pm 0,05$). Различия между группами оказались статистически достоверными ($p=0,045$).

Наиболее угрожающим периодом реактивации ЦМВ во всех исследуемых группах являлся первый месяц после проведенной ТГСК. В частности, почти половина пациентов (48,9%) после неродственной ТГСК реактивировали ЦМВ именно в этот период. В дальнейшем увеличение срока после ТГСК (при всех видах операции) было ассоциировано с уменьшением частоты реактивации ЦМВ. Максимальным сроком,

когда был зарегистрирован первичный эпизод реактивации ЦМВ, стал двенадцатый месяц после ТГСК; реактивация ЦМВ в этот период была зарегистрирована у 1 пациента после гаплоидентичной ТГСК, что скорее всего связано с особенностями и длительностью иммунореактивности, характерной для реципиентов Т-деплементированных ГСК.

Интересно, что реактивация ЦМВ у пациентов не повлияла на частоту и вероятность БСВ. Количество пациентов, не имевших событий в группе больных без реактивации ЦМВ, составило 65,8% (54 из 82 пациентов), а в группе больных, продемонстрировавших реактивацию ЦМВ – 65,3% (49 из 75 пациентов). Вероятность БСВ в этих группах также не отличались ($p=0,92$). Данное соотношение является весьма оптимистичным и свидетельствует об эффективном использовании упреждающей терапии и современных диагностических подходов и технологий.

При анализе частоты реактивации ЦМВ в зависимости от серологического ЦМВ-статуса пациента нами не было получено убедительных данных о его влиянии на частоту реактивации и БСВ. Возможно это связано с небольшой статистической выборкой, что требует проведения дальнейших исследований.

Тем не менее, мы выявили, что ЦМВ-статус вероятнее всего влияет на частоту и тяжесть ЦМВ-заболеваний. В частности, известно, что у 5 (10%) из анализируемой группы больных после неродственной

ТГСК с ЦМВ-серонегативным донором была выявлена ЦМВ-пневмония, ставшая причиной летального исхода у всех 5 больных. В то же время аналогичное осложнение в группе с ЦМВ-серопозитивным донором было верифицировано только в 2 (6,4%) случаях; у обоих пациентов был получен эффект от проводимой вирусостатической терапии.

К сожалению, эффективных методов профилактики тяжелой ЦМВ-инфекции до настоящего времени не существует. При анализе эффективности профилактического курса ганцикловира перед ТГСК не было получено убедительных данных об оправданности его проведения у пациентов с ЦМВ-серонегативным донором. Различия между группами были минимальными при отсутствии какой-либо статистической достоверности в частоте развития ЦМВ-виремии ($p=0,969$) и кумулятивной вероятности ЦМВ-виремии ($p=0,399$).

Таким образом, можно убедительно говорить, что существует целый ряд факторов, влияющих на развитие ЦМВ у пациентов после ТГСК. К ним относятся: вид ТГСК, тяжесть острой РТПХ, особенности иммунореактивности, ЦМВ-серологический статус донора и реципиента и т. д. Знание основных факторов риска и их значимости является мощным оружием, позволяющим клиницисту, взвешенно и аргументированно подходить к решению проблемы контроля ЦМВ-инфекции у пациентов после аллогенных ТГСК.

Л и т е р а т у р а

1. Stocchi R., Ward K.N., Fanin R., Baccharani M., Apperley J.F. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 1998;84:71–9.
2. Taylor-Wiedeman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.H. Monocytes are a major site of persistence

- of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991;72:2059–64.
3. Soderberg-Naucler C., Fish K.N., Nelson J.A. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997;91:119–26.
4. Michelson S. Interaction of human

- CMV with monocytes/macrophages: a love-hate relationship. *Pathol Biol Paris* 1997;45:146–58.
5. Boeckh M., Nichols W.G., Papanicolaou G. et al. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2003;9:543–58.

ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



В преддверии Нового года редакция журнала поздравляет вас, наших читателей, и открывает **новую рубрику**, где будут размещаться публикации, посвященные **редким заболеваниям**. Это многочисленная когорта болезней, нередко четко очерченных, но мало известных широкому кругу практических врачей.

Спектр этих заболеваний широк – от первичных иммунодефицитных состояний и метаболических нарушений до калечащей ортопедической патологии. Для многих из них уже известны основные патогенетические звенья развития болезни. Сердцевинной патологии, как правило, являются молекулярно-генетические нарушения (аномалии), которые могут быть выявлены и послужат основой разработки эффективных терапевтических воздействий. У детей в дебюте клинических проявлений первыми симптомами самых разных орфанных болезней служат изменения в анализах крови, часто в сочетании с лимфо- или миелопролиферативным синдромом, что обуславливает обращение пациента к онкогематологу. Правильная и своевременная диагностика может сохранить жизнь больного ребенка и определить качество его жизни, помочь избежать калечащих инвалидизирующих последствий неадекватной терапии. Независимо от биологической сути болезни незнание влечет фатальные для пациента ошибки в диагностике и лечении.

Первая публикация посвящена остеопетрозу или «мраморной болезни». Это название известно врачам со студенческой скамьи, но малоизвестно как реально существующая болезнь, а подавляющему большинству медицинской общественности совсем неизвестны молекулярно-генетическая суть, принципы терапии и прогноз этой редкой патологии.

Открывая эту рубрику, редакция рассчитывает на внимание читателей и ждет от авторов журнала новых материалов – как обзоров, так и особенно, описаний клинических случаев, относящихся к заявленной тематике. Параллельно мы начинаем публикацию образовательного цикла лекций по молекулярной генетике, без знания основ которой не может развиваться современная медицина.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФАНТИЛЬНОЙ (ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ) ФОРМЫ ОСТЕОПЕТРОЗА

Е.Л. Сахаровская¹, Р.У. Stepensky², L.I. Rheingold², М.М. Дубровин¹,
Д.А. Игнатова³, А.Ю. Щербина¹, И.Б. Резник^{1,2}

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

²Аддаса Израильский Университетский Медицинский Центр, Иерусалим, Израиль;

³Российская детская клиническая больница, Москва

Контакты: Екатерина Леонидовна Сахаровская sakharovskay@yandex.ru

Остеопетроз («мраморная болезнь») — это группа заболеваний, характеризующаяся неспособностью остеокластов осуществлять резорбцию костной ткани, что приводит к повышенной ломкости костей, несмотря на увеличение их плотности. Анализ данных 27 больных инфантильной (злокачественной) аутосомно-рецессивной (ARO) формой остеопетроза (21 мальчик и 6 девочек) позволил описать и суммировать основные клинические проявления: подавление функции костного мозга, гепатоспленомегалию, нарушение зрения, слуха, задержку психомоторного развития, другие неврологические симптомы, патогномичные рентгенологические изменения костей.

Ключевые слова: остеопетроз, «мраморная болезнь», клиническая характеристика, дифференциальная диагностика

CLINICAL FEATURES OF INFANTILE (MALIGNANT) OSTEOPETROSIS

E.L. Sahharovskaya¹, P.Y. Stepensky², L.I. Rheingold², M.M. Dubrovin¹, D.A. Ignatova³, A.Yu. Shcherbina¹, I.B. Reznik^{1,2}

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

²Hadassah Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel;

³Russian Children Clinical Hospital, Moscow

Osteopetrosis ("Marble disease") — is a group of diseases characterized by inability of osteoclasts to resorb the osteal tissue that leads to increased bone fragility, despite density increase. Analysis of data of 27 patients with infantile (malignant) autosomal recessive osteopetrosis (ARO) (21 boys and 6 girls) allowed to describe and summarize the basic clinical features: hematopoiesis suppression, liver and spleen enlargement, vision and hearing failure, delay of psychomotor development, other neurological symptoms, specific radiological bone changes.

Key words: osteopetrosis, marble disease, clinical features, differential diagnosis

Введение

Остеопетроз — это клинический синдром, характеризующийся неспособностью остеокластов осуществлять резорбцию костной ткани. При этом заболевании процессы продукции кости преобладают над ее резорбцией, что связано с функциональной несостоятельностью остеокластов или их сниженным количеством [1, 2]. Это приводит к повышенной ломкости костных структур, несмотря на увеличение их плотности [3]. Кроме того, развиваются подавление функции костного мозга, ущемление нервов с развитием неврологических симптомов, отставание в развитии [4]. Существуют 3 формы остеопетроза: инфантильная (злокачественная), взрослая (мягкая) и промежуточная [5]. Самая тяжелая форма заболевания — инфантильная, при которой клинические признаки начинают проявляться с самого рождения и быстро прогрессируют [6, 7]. Без лечения больные погибают в раннем детстве [8, 9]. Более чем в половине случаев при злокачествен-

ной форме остеопетроза отмечаются мутации в гене *TCIRG1*, что приводит к нарушению в функционировании АТФ-зависимой протонной помпы остеокластов. Вторыми по частоте встречаемости являются мутации в гене *CLCN7* [5, 6], что вызывает нарушение функционирования хлоридных каналов мембран остеокластов. Остальные установленные молекулярные дефекты (в генах *OSTM1*, *RANK*) встречаются в единичных случаях [8, 10]. У части больных молекулярные дефекты не установлены. В настоящее время единственным эффективным методом лечения является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [9]. Своевременное удачное проведение ТГСК, до развития компрессии черепных нервов, позволяет сохранить пациентам зрение и слух.

В настоящей работе нами систематизирована симптоматика злокачественной (инфантильной) формы остеопетроза на основании анализа группы, состоящей из 27 больных.

Пациенты и методы

Нами ретроспективно проанализированы доступные данные 27 больных за период с 1983 по 2010 г. со злокачественной (инфантильной) формой остеопетроза, диагностированных в Израильском медицинском центре Аддаса и Федеральном научно-клиническом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава/Российской детской клинической больнице. Мальчики составили 78% (21 человек), а девочки – 22% (6 человек). В основную часть группы входили дети из арабских семей, трое детей из Эфиопии, один – из еврейской и еще один ребенок – из кавказской семьи. Части больных был проведен анализ гена *TCIRG1* с использованием метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с последующим прямым секвенированием экзонов.

Результаты

Средний возраст больных на момент установления диагноза составил 8 месяцев (0,67 года; от 4 недель до 3 лет 2 месяцев). В описываемой группе больных преобладающими клиническими симптомами были гепатоспленомегалия (92%) и нарушение зрения (64%). Изменения со стороны костного мозга (анемия и тромбоцитопения различной степени тяжести) отмечались почти у половины больных (44%). Реже выявлялись симптомы со стороны центральной нервной системы и деформация черепа (28%). Нарушение слуха к моменту диагностики наблюдалось только в 8,3% случаев, в связи с чем можно предположить, что сдавление слуховых нервов происходит позже, чем зрительных. Из обращающих на себя внимание симптомов следует отметить храпящее дыхание и эпизоды апноэ. Нарушение дыхания встречалось в 32% случаев. Из 16 детей, у которых отмечалось нарушение зрения, частичная утрата зрения наблюдалась у 6 пациентов, страбизм и нистагм – у 3, плавающий взгляд – у 2, полная потеря зрения на одном глазу – у 3, потеря зрения на оба глаза – у 2. Из 11 детей с признаками угнетения костномозгового кроветворения изолированная анемия отмечалась у 4 пациентов, анемия с тромбоцитопенией – у 5, панцитопения – у 2 больных. Из 7 детей с неврологической симптоматикой у 2 отмечалась микроцефалия, у 5 – макроцефалия. Частота встречаемости ведущих симптомов заболевания представлена на рисунке 1.

Необходимо отметить, что многие дети были из семей, в истории которых есть данные о наличии остеопетроза у близких родственников. Из 26 семей – в 14 случаях (56%) есть случаи аналогичного заболевания в семье. При этом доступны данные о больных остеопетрозом сиблингах в 8 семьях из 14. Было выявлено, что 18 детей (72%) были рождены от родителей, состоявших в близкородственном браке. В 5 случаях родители пробанда – двоюродные брат и сестра.

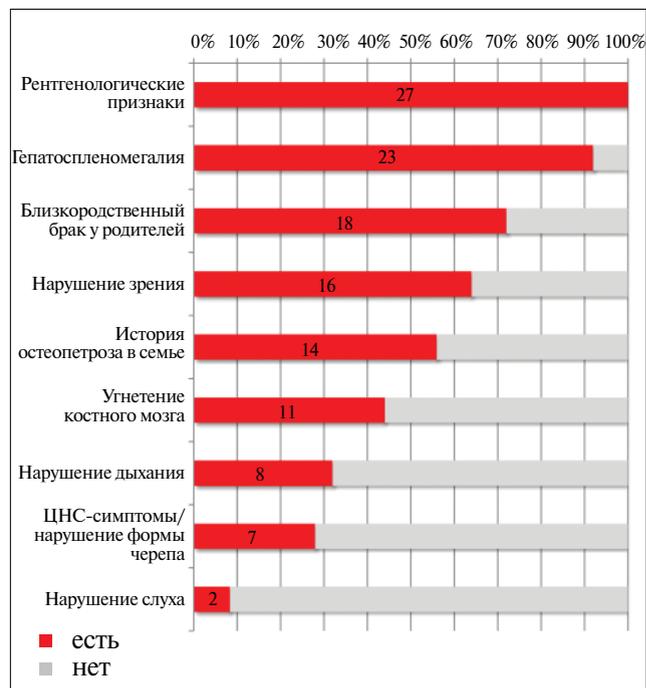


Рис. 1. Клинические и демографические характеристики пациентов

Для примера приведем клинический случай. Мальчик 10 месяцев, поступил в Российскую детскую клиническую больницу. Ребенок единственный в семье, родство родители отрицают, беременность и роды протекали без особенностей. Из анамнеза известно, что родители впервые обратились за медицинской помощью, когда ребенку было 2,5 месяца. К этому возрасту у ребенка случались эпизоды апноэ до 5–6 раз в день, храп во время сна, быстрая утомляемость, присутствовали симптомы нарушения костномозгового кроветворения – анемия ($Hb - 78 \text{ г/л}$), тромбоцитопения ($Tr - 80 \times 10^9/\text{л}$). Семейный анамнез не был отягощен симптомами сходными с наследственными заболеваниями. При обследовании в возрасте 10 месяцев выявлены изменения формы лицевого скелета, гидроцефальная форма головы, отставание в психомоторном развитии, снижение зрения справа, гепатомегалия (+ 7 см), спленомегалия (+ 7 см), анемия, тромбоцитопения (рис. 2). На рисунке 3 представлены рентгенограммы нижних конечностей, позвоночника и черепа. На них были выявлены типичные изменения – повышение рентгено-плотности костей (а), отсутствие визуализации трабекулярной структуры губчатого вещества (б), в длинных трубчатых костях определялось отсутствие костномозгового канала (в), а также наличие патогномичного симптомокомплекса «кость внутри кости» (г) и ранняя оссификация (д). В трепанобиоптате обращает на себя внимание резкое расширение и неправильная форма костных балок с неравномерной их кальцификацией. Среди костных балок располагаются мелкие островки остеокластов, также встречаются немногочисленные остеобласты. Гемопоэтической ткани в трепанобиоптате обнаружено не было.



Рис. 2. Фенотип ребенка 10 месяцев с диагнозом аутосомно-рецессивный остеопетроз, инфантильная (злокачественная) форма (собственные данные)

Подобная ярко выраженная клиническая и рентгенологическая картина позволяет поставить диагноз: аутосомно-рецессивный остеопетроз, инфантильная (злокачественная) форма.

При молекулярном исследовании ДНК ребенка в гене *TCIRG1* были выявлены 2 ранее не описанные мутации в гомозиготной форме: с.479G>A и с.2415-1G>C, что подтвердило клинический диагноз.

Учитывая частично сохраненное зрение, полностью сохраненный слух и умеренный цитопенический синдром, ребенок является кандидатом на проведение ТГСК.

Обсуждение

Злокачественный (инфантильный) остеопетроз – генетически детерминированное заболевание, приводящее к инвалидизации и смерти пациентов в раннем детстве [11]. Это редкое заболевание; частота в общей популяции составляет 1 случай на 250 000 новорожденных, однако в эндемичных зонах его частота достигает 1 случая на 4000 новорожденных [12, 13].

Несмотря на редкость, заболевание имеет достаточно характерную клиническую картину, основными симптомами которой являются гепатоспленомегалия, нарушение зрения, слуха, цитопенический синдром, неврологические симптомы и нарушения формы черепа, отставание в развитии. В той или иной степени выраженности эти симптомы встречаются у большинства больных. Патогномоничные рентгенологические симптомы позволяют подтвердить диагноз.

Описаны и некоторые ассоциации между лежащим в основе молекулярным дефектом и клиническим

течением, ассоциации генотипа и фенотипа, хотя удостовериться в точности клинических наблюдений сложно из-за малого числа мутаций выявленных вне гена *CIRG1*. Так, например, при мутациях в генах *OSTM1* или *CICN7* характерна ведущая и тяжелая неврологическая презентация. Двое описанных в литературе больных остеопетрозом, вызванным дефектом *PLEKHM1*, характеризовались сравнительно мягким течением заболевания. Для больных остеопетрозом с дефектом дифференцировки остеокластов (мутации в генах *RANK* и *RANKL*) характерно наличие иммунных дефектов. Для большинства больных в описанной клинической группе и по группе в целом характерно «классическое» распределение симптомов, предположительно связанное с мутациями в *TCIRG1*, хотя подтвердить это не представляется возможным из-за отсутствия доступного биологического материала для ретроспективного генетического исследования.

Что касается мутаций, выявленных в гене у последнего больного из России, то это 2 гомозиготные мутации в гене *TCIRG1*. Первая из них – мутация-замена в 5-м экзоне – видимо нефункциональна и представляет собой полиморфизм, тогда как 2-я интронная мутация IVS19–1G>C (с.2415-1G>C), скорее всего, ответственна за развитие болезни, так как может привести к нарушению рамки считывания С-окончания длинной изоформы белка *TCIRG1*, известной под названием OC116. Обе мутации (полиморфизм) – новые.

Молекулярная диагностика не только подтверждает диагноз, но и, безусловно, полезна в генетическом консультировании семей больных детей и при пренатальной диагностике. Кроме того, она важна в выработке решения относительно ТГСК, так как при редком субварианте, связанном с нарушением созревания остеокластов не из-за внутреннего дефекта, но из-за дефектной сигнальной поддержки стромой (мутации в гене *RANK ligand*), ТГСК неэффективна и, следовательно, не показана. Заподозрить такой вариант можно при морфологическом исследовании костного биоптата: в отличие от «классического» остеопетроза с достаточным количеством остеокластов, при дефекте *RANKL* остеокласты отсутствуют [9].

Все вышеописанные клинические симптомы являются неспецифичными, поэтому вопрос о дифференциальной диагностике очень актуален. В большинстве случаев, если в семье ранее не было больных детей или ранних смертей, родители обращаются за помощью к врачу, когда ребенку около 3–4 месяцев жизни. К этому возрасту отмечаются увеличение живота за счет гепатоспленомегалии, изменения в анализах крови, признаки отставания в физическом и психомоторном развитии. Нередко такие больные направляются на консультацию к онкогематологу. При обследовании в анализах крови часто выявля-

ются анемия, тромбоцитопения, анизопойкилоцитоз. Так же наблюдался лейкоцитоз и лимфоцитоз. Причины подобных изменений со стороны крови пока до конца не изучены. Признаков увеличения лимфатических узлов обычно нет. В миелограмме у некоторых больных отмечалось сужение эритроцитарного и тромбоцитарного ростков, моноцитоз, но в некоторых случаях может быть нормальная картина. Специфические изменения для «классического» остеопетроза наблюдаются при трепанобиопсии: признаки склерозирования, уменьшение или отсутствие гемопоэтической ткани, неправильная форма костных балок, неравномерная их кальцификация, уменьшение количества остеобластов. Существуют редкие формы остеопетроза, при которых отмечается полное отсутствие или резкое снижение остеокластов.

В отличие от онкологических процессов подавление кроветворных ростков происходит не за счет пролиферации патологических клеток, а за счет процесса склерозирования костного мозга. В связи с нарушением функционирования остеокластов не происходит процесса резорбции кости, что приводит к активному костеобразованию и замещению костного мозга, которое можно видеть при морфологическом исследовании. Возникают экстрамедуллярные очаги кроветворения, что приводит к гепатоспленомегалии, гиперспленизму.

Характерные изменения, встречающиеся в 100% случаев — рентгенологические изменения в костях.

Отмечается повышенная плотность костей, нарушение костеобразования в метафизах длинных трубчатых костей, признак «кость внутри кости», когда вокруг кости можно увидеть ее второе очертание (рис. 3).

Таким образом, опираясь на данные анамнеза, особенности фенотипа, наличие неврологических проявлений, увеличение размеров печени и селезенки, изменения в анализах крови, можно заподозрить инфантильную форму остеопетроза. Для уточнения диагноза необходимо проведение рентгенографии конечностей и грудной клетки. Выполнение трепанобиопсии позволит подтвердить диагноз и уточнить субвариант остеопетроза (при дефекте гена *RANKL* остеокласты отсутствуют). Для последующего семейного консультирования и проведения пренатальной диагностики необходимо проведение молекулярно-генетического обследования больных.

Единственным методом лечения инфантильной формы остеопетроза в настоящее время служит ТГСК. При этом, если операция проводится до развития атрофии зрительных нервов, то это позволяет предотвратить потерю зрения и развитие других осложнений [14]. На момент написания статьи аллогенная ТГСК была проведена 26 пациентам из 27 больных, в одном случае — дважды [15]. Из 26 детей 21 ребенок жив и имеет донорское кроветворение. Выживаемость при медиане наблюдения 9 лет 3 мес составила 80,8% (результаты готовятся к публикации). Такие «стандартные» осложнения после ТГСК как сложность в достижении устойчивого донорско-

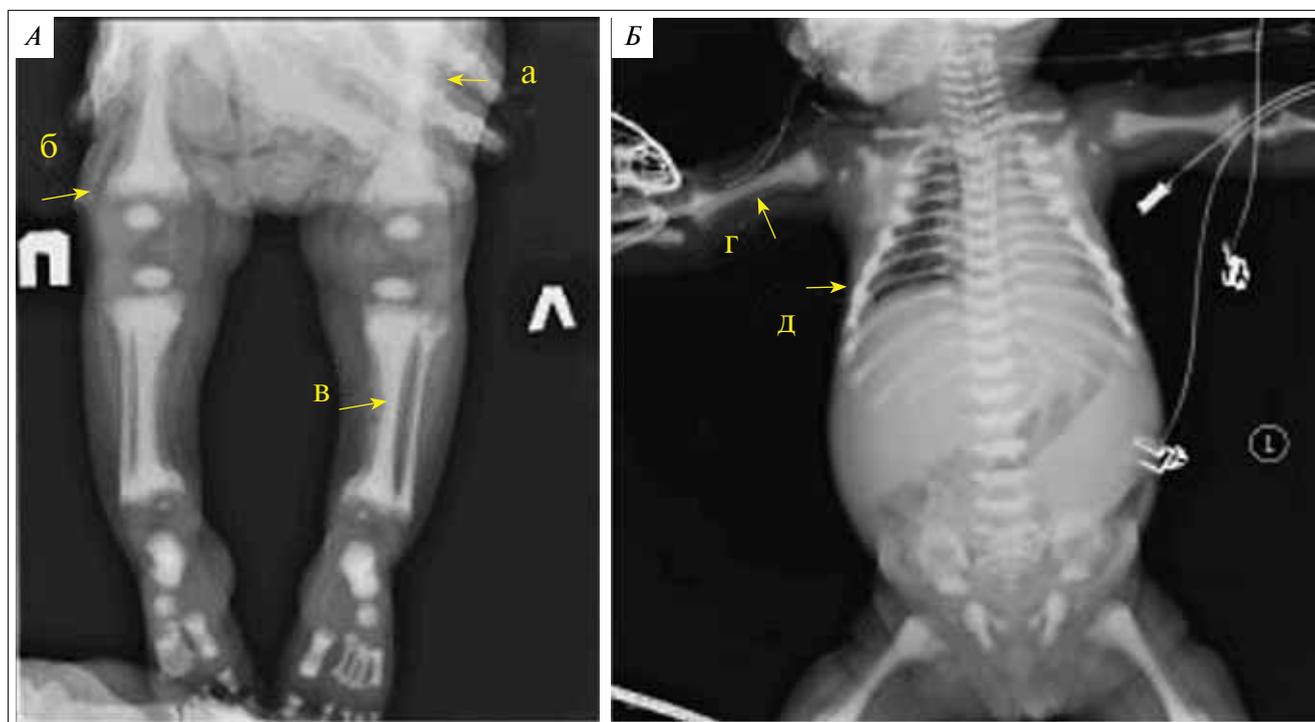


Рис. 3. Рентгенограмма нижних конечностей (А) и обзорная рентгенограмма (Б) ребенка 10 месяцев с диагнозом аутосомно-рецессивный остеопетроз, инфантильная (злокачественная) форма. Тотальное поражение костных структур, увеличение плотности, признак «кость внутри кости» в трубчатых костях (собственные данные): а — повышение рентгено-плотности костей (см. разницу с рукой взрослого); б — отсутствие визуализации трабекулярной структуры губчатого вещества; в — отсутствие костномозгового канала в длинных трубчатых костях; г — патогномоничный симптомокомплекс «кость внутри кости»; д — ранняя оссификация

го химеризма, ранняя смертность от сепсиса, вено-окклюзивная болезнь печени и различные инфекции в посттрансплантационном периоде встречаются довольно часто. Однако отмечаются и более специфические осложнения: гиперкальциемия и легочная гипертензия [16]. По данным различных авторов, эффективность ТГСК при использовании костного мозга и периферических стволовых клеток составляет 45–55% [14–16].

Угнетение костного мозга и риск возможной потери зрения — это абсолютные и urgentные показания для проведения ТГСК. По данным литературы, на сегодняшний день существуют 2 абсолютных противопоказания к проведению стандартной ТГСК (в связи с их неэффективностью). Первое — дефект в гене *RANKL*; второе — неврологическая форма остеопетроза, которая характеризуется первичной энцефалопатией и нейродегенерацией, гипертонусом и быстро прогрессирующей задержкой развития. Эта форма остеопетроза ассоциирована с мутацией в гене *OSTM1* и иногда с мутацией в гене *CLCN7*. Противопоказаниями к проведению ТГСК могут служить индивидуальные особенности ребенка — его тяжелое состояние за счет инфекционного статуса, тяжелой дыхательной недостаточности, высокого внутричерепного давления или серьезное отставание в развитии в связи с потерей слуха и зрения [9]. При эффективной ТГСК ожидается восстановление функции остеокластов. Об этом можно судить по возникновению гиперкальциемии, гиперкальци-

урии, по исследованию биоптата кости, по просветлению костей при рентгенографии. Нормализация формулы крови, уменьшение размеров селезенки и печени также являются показателями восстановления функции остеокластов [15].

В настоящее время использование ТГСК предлагает возможности куративного лечения большинства случаев инфантильной формы остеопетроза. При этом следует отметить, что симптомы, развившиеся ко времени трансплантации, необратимы [17], что опять возвращает к вопросу ранней диагностики и срочности проведения лечения, так как только ранняя трансплантация может спасти жизнь пациентам и предотвратить развитие тяжелых осложнений.

Таким образом, настороженность педиатров и детских гематологов в отношении злокачественного остеопетроза и ранняя его диагностика открывают возможности сохранения жизни и куративного лечения для большинства больных инфантильной злокачественной формой остеопетроза.

Благодарность

Авторы выражают большую благодарность за помощь в диагностике и участие в работе проф. Е.В. Самочатовой, за содействие и предоставление материала — зав. инфекционно-боксовым отделением РДКБ Г.П. Волковой, а также сотрудникам детской и подростковой клиники университета г. Ульм (Германия) (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin) за содействие в генетической диагностике.

Л и т е р а т у р а

1. Stark Z., Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:5.
2. Pangrazio A., Pusch M., Caldana E. Molecular and clinical heterogeneity in *CLCN7*-dependent osteopetrosis: report of 20 novel mutations. *Hum Mutat* 2010;31(1):1071–80.
3. Steward C.G. Neurological aspects of osteopetrosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29(2):87–97.
4. Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289 (5484):1504–8.
5. Frattini A., Orchard P.J., Sobacchi C. et al. Defects in *TCIRG1* subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 2000;25(3):343–6.
6. Ogbureke K.U., Zhao Q., Li Y.P. et al. Human osteopetroses and the osteoclast V-H⁺-ATPase enzyme system. *Front Biosci* 2005;10(1):2940–54.
7. Harada S., Rodan G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349–55.
8. Baron R. *Anatomy and Ultrastructure of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4th ed, Philadelphia, 1999.
9. Schulz A. S., Moshous D., Steward C.G., Villa A.. Osteopetrosis Consensus guidelines for diagnostics, therapy and follow up. Consensus guidelines of the ESID and the EBMT. Version 0.17092009x.
10. Gori F., Hofbauer L.C., Dunstan C.R. et al. The Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells Is Developmentally Regulated. *Endocrinology* 2000; 141(12):4768–76.
11. Fasth A. Osteopetrosis — More than only a disease of the bone. *Wiley InterScience* 10.1002/ajh.21454. 18 May 2009.
12. Близнец И.А., Тверская С.М., Зинченко Р.А. и др. Молекулярно-генетическая причина остеопетроза в Чувашии. *Медицинская генетика* 2005;Т.4;7:315–21.
13. Кириллов А.Г. Наследственные болезни в Чувашской республике. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. 2008.
14. Tolar J., Bonfim C., Grewal S., Orchard P. Engraftment and survival following hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 38(12):783–7.
15. Stepensky P., Schulz A.S., Lahr G. et al. Successful second haploidentical SCT in osteopetrosis. *Bone Marrow Transplantation* 2010;Sep 20 [Epub ahead of print].
16. Aker M., Shapira M.Y., Resnick I., Bitan M., Samuel S., Slavin S. Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of diseases associated with a deficiency in bone marrow products. *Springer Semin Immunopathol* 2004;26(1–2):133–42.
17. El-Tawil T., Stoker D.J. Benign osteopetrosis: a review of 42 cases showing two different patterns. *Skeletal Radiol* 1993;22(8):587–93.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ПРОТИВОЛЕЙКЕМИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO*

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

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

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e_ossipova@mail.ru

*В настоящем исследовании изучено влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга доноров на лейкемические клетки пациентов. В ходе работы исследовалось действие на чувствительность к противолейкемическим препаратам *in vitro* и способность лейкемических клеток к спонтанному и индуцированному цитарабином апоптозу. Было показано, что МСК снижают чувствительность лейкемических клеток миелоидного ряда к даунорубину. Однако МСК не оказывали статистически значимого влияния на уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкемических клеток.*

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, чувствительность к противолейкемическим препаратам, лейкемические клетки, спонтанный апоптоз, индуцированный цитарабином апоптоз

INFLUENCE OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS ON LEUKEMIC CELLS *IN VITRO* SENSITIVITY TO ANTILEUKEMIC DRUGS

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

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

*In present study influence of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on patients' leukemic cells is investigated. Influence on *in vitro* sensitivity to antileukemic drugs and spontaneous and cytarabine-induced apoptosis of leukemic cells was studied. It has been shown that MSC reduce myeloid leukemic cells sensitivity to daunorubicine. However, MSC did not statistically significant influence on spontaneous and cytarabine-induced apoptosis of leukemic cells.*

Key words: mesenchymal stem cells, antileukemic drug sensitivity, leukemic cells, spontaneous apoptosis, cytarabine-induced apoptosis

Введение

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы все чаще используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), благодаря способности МСК продуцировать цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников [1, 2] и для профилактики и терапии иммунологических осложнений ТГСК, таких как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и отторжение трансплантата [3]. Эффективность данного метода связана с тем, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами, способны оказывать антипролиферативное воздействие на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти [4, 5].

Согласно данным литературы, совместное культивирование стромальных клеток костного мозга и лейкемических клеток различных культуральных линий, а также клеток доноров, может приводить к сниже-

нию пролиферации лейкемических клеток [6–11], увеличению количества лейкемических клеток в фазе G0/G1, уменьшению количества клеток в фазах S [6, 7, 9] и G2/M [8]. В соответствии с результатами некоторых работ, стромальные клетки костного мозга, наоборот, могут способствовать пролиферации лейкемических клеток [12]. Однако мнения исследователей сходятся на том, что стромальные клетки костного мозга обладают способностью снижать уровни спонтанного (индуцированного бессывороточной средой) [12, 13] и индуцированного химиопрепаратами апоптоза [7–9, 13–15]. Механизм данного действия может быть связан с повышением экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и Bcl-XL в лейкемических клетках [8, 9, 13], снижением активности каспазы 3 типа в лейкемических клетках [9, 16], повышением активности фосфокиназы Akt [17].

Таким образом, стромальные клетки костного мозга могут препятствовать спонтанному и индуцированному химиопрепаратами апоптозу лейкемических клеток, что может приводить к снижению чувствительности лейкемических клеток к химиопрепа-

ратам *in vitro*. Было показано, что чувствительность *in vitro* коррелирует с клиническим ответом на химиотерапию, безрецидивной и бессобытийной выживаемостью пациентов, больных лейкозом [18–21].

Целью данной работы было определение влияния аллогенных МСК костного мозга доноров на чувствительность лейкоэмических клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro* и способность лейкоэмических клеток пациентов к спонтанному и индуцированному цитарабином апоптозу.

Материалы и методы

Материал исследования

Лейкемические клетки. В работе были использованы лейкоэмические клетки, выделенные при помощи градиентного центрифугирования из образцов костного мозга пациентов в возрасте от 6 месяцев до 17 лет с впервые диагностированными нелечеными острыми лейкозами. В соответствии с диагнозом пациентов образцы костного мозга и выделенные из них лейкоэмические клетки были разделены на 3 основные группы (табл. 1).

Таблица 1. Количество исследованных образцов костного мозга больных различными вариантами острого лейкоза

Вариант лейкоза (группа)	п, количество образцов
ВП-ВП ОЛЛ	15
ОМЛ	9
Т-ОЛЛ	4

Первая – группа В-клеточных острых лимфобластных лейкозов (В-ОЛЛ), 2-я – группа острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), 3-я – группа Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (Т-ОЛЛ).

Лейкемические клетки, использованные для определения уровней апоптоза, на группы не подразделяли.

МСК костного мозга. В работе были использованы МСК, выделенные из образцов костного мозга здоровых доноров. Культивирование МСК костного мозга проводили рутинным способом. Клетки высаживали на 24-луночные планшеты в концентрации 25×10^3 на лунку для эксперимента с определением чувствительности лейкоэмических клеток к противоопухолевым препаратам, а также во флаконы площадью 25 см^2 в концентрации 200×10^3 для определения уровней апоптоза лейкоэмических клеток.

Методы исследования

За основу метода для определения чувствительности лейкоэмических клеток к противолейкемическим препаратам был взят МТТ-анализ по методике лаборатории онкогематологии и иммунологии госпиталя Свободного Университета Ам-

стердама [21, 22], в который были внесены изменения. В ходе эксперимента производили инкубацию бластных клеток костного мозга на подложке из МСК и без подложки из МСК с различными разведениями химиопрепаратов в течение 4 сут. В ходе исследования тестировали препараты, относящиеся к различным группам противоопухолевых препаратов, используемых для лечения злокачественных клональных заболеваний крови: цитарабин (цитозар), метилпреднизолон, даунорубин. В последующем определяли полулетальную концентрацию (LC50) для каждого препарата и производили статистический анализ значений LC50. Для оценки средних значений LC50 использовалась медиана, для определения достоверности различий между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствие воздействия МСК) применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Кроме того, производилась оценка выживаемости лейкоэмических клеток (определение доли живых клеток) в лунках платы с МСК без химиопрепаратов. В качестве контрольных лунок использовались лунки платы без МСК и без химиопрепаратов, в которых значение выживаемости клеток принимали за 1.

Для определения уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкоэмических клеток использовали окрашивание конъюгатом аннексина-V с флуорохромом (изотиоцианатом флуоресцеина, FITC) и йодистым пропидием (propidium iodide, PI) с последующим анализом при помощи проточной цитофлуориметрии. Для индукции апоптоза лейкоэмические клетки инкубировали в течение 24 часов в следующих условиях:

- в среде RPMI-1640 – для определения уровня спонтанного апоптоза:
 - на подложке из МСК,
 - без подложки из МСК;
- в растворе цитозара с концентрацией $0,0025 \text{ мг/мл}$ в среде RPMI-1640 – для определения уровня индуцированного апоптоза:
 - на подложке из МСК,
 - без подложки из МСК.

После окрашивания Annexin V-FITC Kit (Bender MedSystems GmbH) производили анализ клеток при помощи проточного цитофлуориметра FACScan, оценивая интенсивность зеленой флуоресценции FITC-аннексина V (FL1, 530 нм) и красной флуоресценции йодистого пропидия (FL2, в интервале от 564 до 606 нм). В качестве «негативного контроля» использовали неокрашенные клетки. При помощи программы CellQuest Pro выстраивалась точечная

диаграмма распределения популяций клеток. Выделили 4 кластера: жизнеспособные клетки AnV-/PI- (в левом нижнем квадранте), ранние апоптотические клетки AnV+/PI- (правый нижний квадрант), некротические или поздние апоптотические клетки – последующая стадия апоптоза *in vitro* AnV+/PI+ (правый верхний квадрант) и некротические клетки AnV-/PI+ (левый верхний квадрант) (рис. 1).

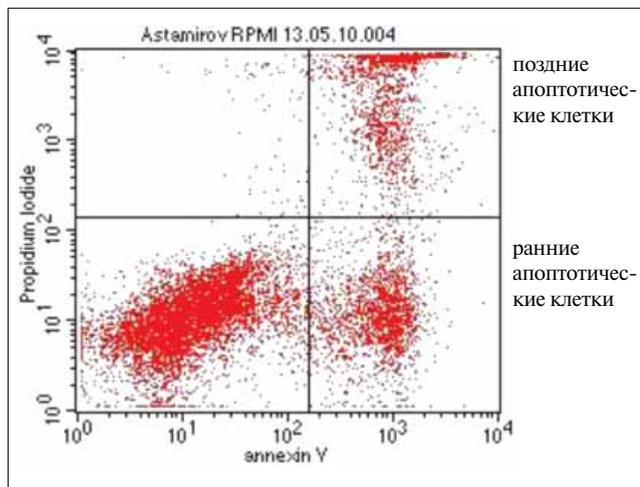


Рис. 1. Гистограмма распределения лейкемических клеток при окрашивании аннексином-V-FITC и йодистым пропидием

Группу сравнения для оценки результатов составили образцы лейкемических клеток до инкубации (0 часов). В каждой группе лейкемических

клеток с одинаковыми условиями инкубации рассчитывали общую долю апоптотических клеток (суммарное количество ранних и поздних апоптотических клеток). Для оценки скорости и динамики накопления апоптотических клеток был разработан оригинальный показатель – коэффициент накопления апоптотических клеток (Капо). Показатели раннего и позднего спонтанного апоптоза в группе сравнения принимались за 1, в исследуемых группах коэффициент Капо рассчитывался как отношение доли апоптотических клеток после 24 часов инкубации в различных условиях к доле апоптотических клеток в группе сравнения. Для определения достоверности различий уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза (раннего и суммарного) между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствие воздействия МСК) применяли критерий Вилкоксона для парных сравнений. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты статистической обработки данных чувствительности лейкемических клеток, полученных в группах В-ОЛЛ, ОМЛ и Т-ОЛЛ, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели выживаемости при культивировании лейкемических клеток с МСК и без них

Препарат	Значения LC50 (медиана)		p
	– МСК	+ МСК	
В-ОЛЛ (n=15)			
Цитозар	1,02	1,95	0,205
Даунорубин	0,28	0,85	0,206
Метилпреднизолон	123,03	38,71	0,949
Выживаемость в контроле (медиана)		153,46%	–
ОМЛ (n=9)			
Цитозар	0,60	0,59	0,895
Даунорубин	0,31	1,42	0,009
Метилпреднизолон	166,04	250	0,212
Контроль (медиана)	–	118,66%	–
Т-ОЛЛ (n=4)			
Цитозар	6,85	1,03	0,375
Даунорубин	0,58	0,66	0,663
Метилпреднизолон	125,09	167,02	0,767
Выживаемость в контроле (медиана)	–	141,51%	–

В нашем исследовании было выявлено увеличение медианы LC50 цитозара при инкубации с МСК клеток В-ОЛЛ приблизительно в 2 раза (следовательно, снижение чувствительности лейкозных клеток под действием МСК). Ввиду того, что в данном случае $p > 0,05$, эти результаты не являются статистически значимым. В группе ОМЛ было обнаружено незначительное снижение медианы LC50 цитозара при инкубации с МСК, данный результат не был статистически значимым. В группе Т-ОЛЛ было выявлено снижение концентрации цитарабина при инкубации с МСК больше чем в 6 раз, а следовательно, повышение чувствительности лейкозных клеток к цитарабину под действием МСК. Данный результат был статистически незначимым.

Наблюдалось увеличение медиан LC50 даунорубицина при инкубировании с МСК во всех группах лейкоэмических клеток. В группе ОМЛ результат был статистически значимым ($p < 0,05$).

Чувствительность лейкоэмических клеток из группы В-ОЛЛ к метилпреднизолону под действием МСК повышалась. В группах ОМЛ и Т-ОЛЛ наблюдалось незначительное превышение медианы при инкубировании с МСК. Во всех случаях результаты были статистически незначимыми ($p > 0,05$).

При оценке лейкозных клеток в контроле при культивировании с МСК было выявлено повышение выживаемости в сравнении с контролем без МСК во всех 3 группах (рис. 2).

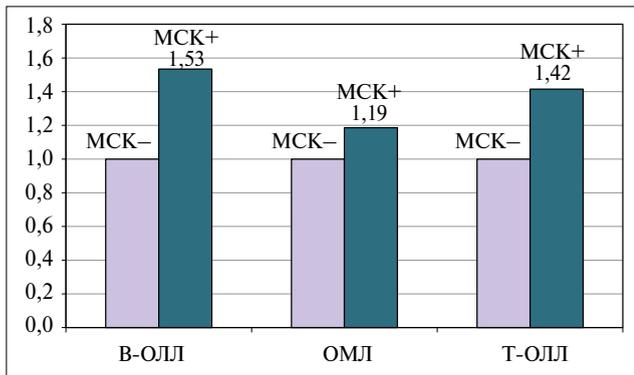


Рис. 2. Изменение выживаемости лейкозных клеток в лунках без противолейкемических препаратов под действием МСК (левые столбцы – контрольные лунки платы без МСК, правые столбцы – лунки платы с МСК)

Результаты, полученные при определении уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза при инкубации лейкоэмических клеток в различных условиях, представлены в таблице 3, гистограммы – на рисунках 3 и 4.

На основании представленных в таблице 3 результатов можно сделать выводы о том, что при определении уровней суммарного спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза отмечалось снижение доли апоптотических клеток под действием МСК, в сравнении с клетками, инкубированными без подложки из МСК. Это подтверж-

Таблица 3. Уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкозных клеток

Условия	Медиана, %	Капо	p
RPMI – МСК 24 часа ранний апоптоз	5,33		1,0
RPMI + МСК 24 часа ранний апоптоз	5,63		1,0
RPMI – МСК 24 часа суммарный апоптоз	28,79	2,09	0,67
RPMI + МСК 24 часа суммарный апоптоз	38,11	2,02	0,67
Цитарабин – МСК 24 часа ранний апоптоз	7,55		0,14
Цитарабин + МСК 24 часа ранний апоптоз	8,64		0,14
Цитарабин – МСК 24 часа суммарный апоптоз	57,60	3,02	0,22
Цитарабин + МСК 24 часа суммарный апоптоз	55,48	2,71	0,22
Группа сравнения 0 часов	8,50	1	

дают значения Капо. Данные наблюдения иллюстрируют рисунки 5 и 6.

При определении статистической значимости различий уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза (раннего и суммарного) между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствии воздействия МСК) при помощи критерия Вилкоксона для парных сравнений не было получено статистически значимых различий.

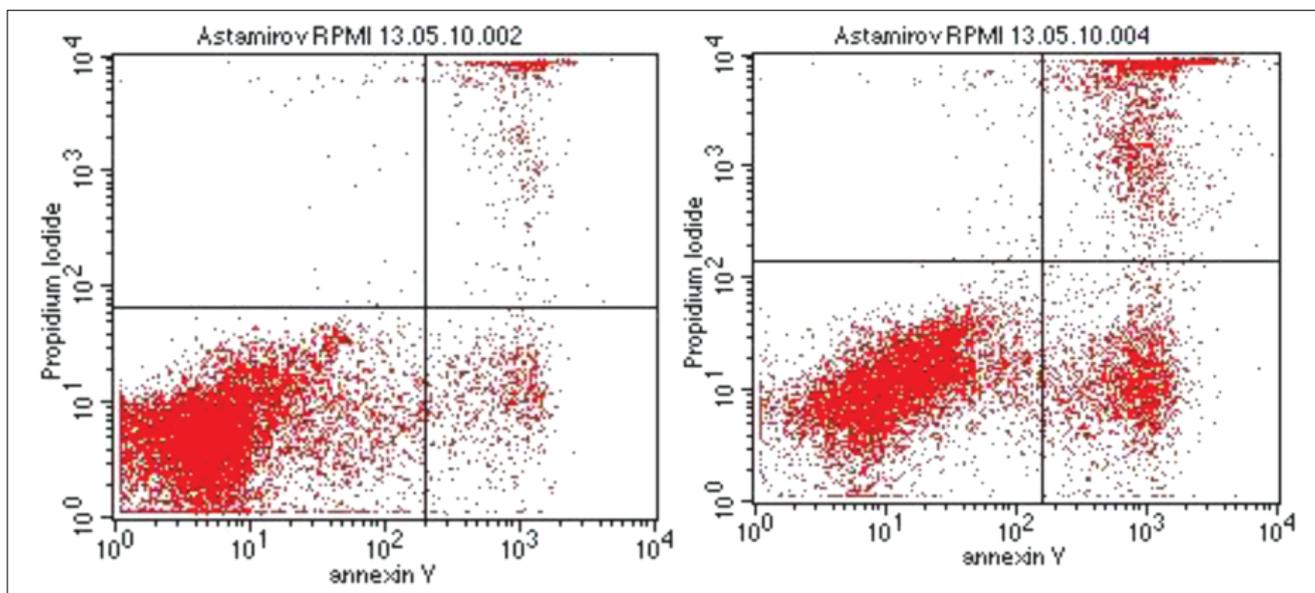


Рис. 3. Гистограммы распределения лейкозных клеток после инкубирования в течение 24 часов в среде RPMI без подложки из МСК (слева) и на подложке из МСК (справа). В левом нижнем квадранте – жизнеспособные клетки AnV-/PI-, в правом нижнем квадранте – ранние апоптотические клетки AnV+/PI-, в правом верхнем квадранте – некротические или поздние апоптотические клетки, последующая стадия апоптоза in vitro AnV+/PI+, в левом верхнем квадранте – некротические клетки AnV-/PI+

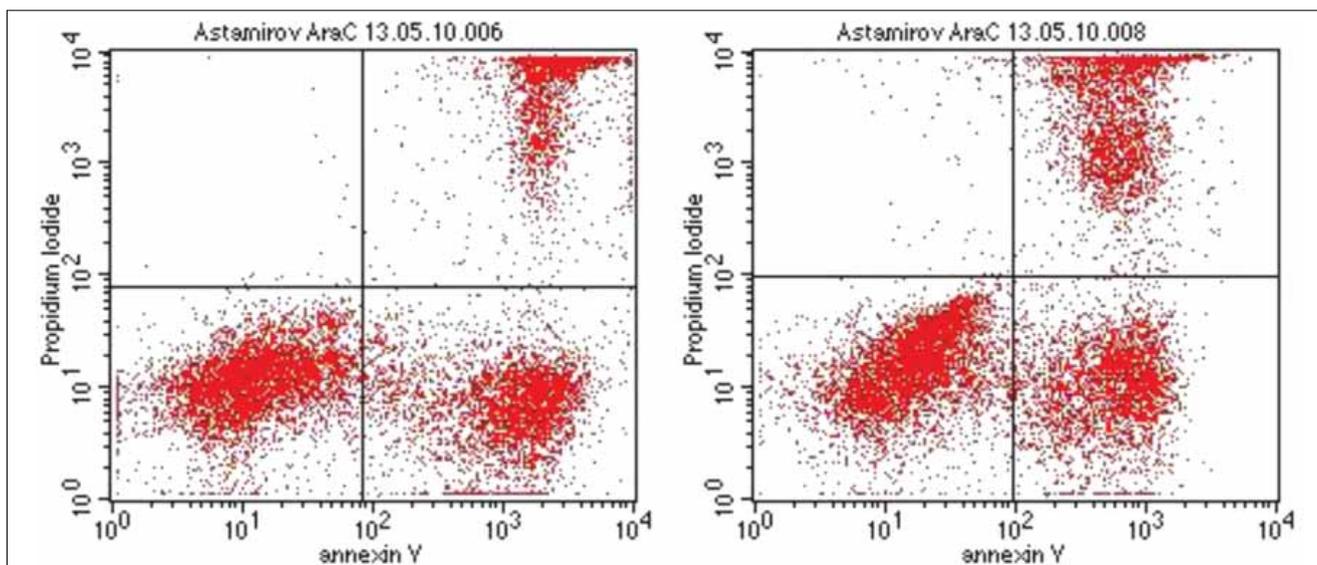


Рис. 4. Гистограмма распределения лейкозных клеток после инкубирования в течение 24 часов в растворе цитарабина без подложки из МСК (слева) и на подложке из МСК (справа)

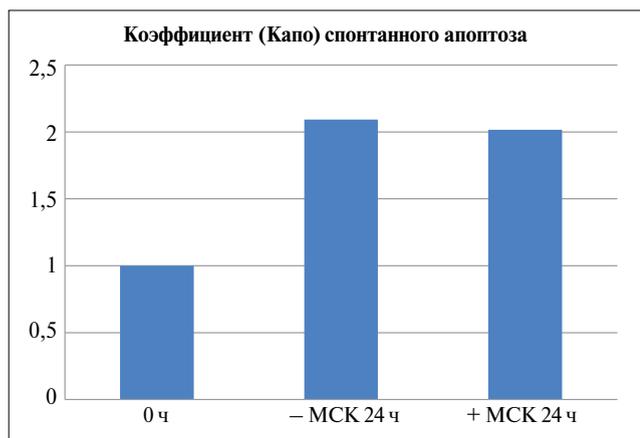


Рис. 5. Коэффициенты спонтанного апоптоза; крайний левый столбец – группа сравнения

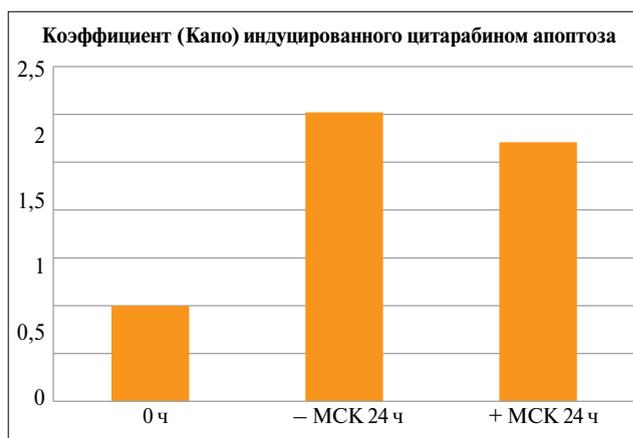


Рис. 6. Коэффициенты индуцированного цитарабином апоптоза

Заключение

В ходе проведенного нами исследования было показано, что МСК костного мозга доноров могут оказывать влияние на чувствительность лейкемических клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro*: статистически значимо снижают чувствительность лейкемических клеток миелоидного ряда к даунорубицину и способствуют выживаемости всех групп лейкемических клеток. Однако в нашем исследовании аллогенные МСК костного мозга не оказывали статистически

значимого влияния на уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкемических клеток, что расходится с данными других исследователей [7–9, 12–15]. Несомненно, что все более широкое применение трансплантации МСК в клинической практике, особенно у онкогематологических пациентов, диктует необходимость проведения широкомасштабных исследований для дальнейшего изучения механизмов влияния МСК на кроветворные клетки, в частности, на лейкемические клетки.

Л и т е р а т у р а

- Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585–92.
- Cheng L., Qasba P., Vanguri P., Thiede M.A. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000;184:58–69.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439–41.
- Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003;76:1208–13.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Götherström C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;60:307–15.
- Liang R., Huang G.S., Chen X.Q., Wang Z., Feng J.L., Zhang W.P., Guo Y., Yang G.Y. Effects of human fibroblastoid stromal cell line on proliferation of HL-60 cells and expression of VEGF. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003;11(5):476–9.
- Lin Y.M., Bu L.M., Yang S.J., Gao S., Zhang G.Z. Influence of human mesenchymal stem cells on cell proliferation and chemosensitivity of K562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006;14(2):308–12.
- Lin Y.M., Zhang G.Z., Leng Z.X., Lu Z.X., Bu L.S., Gao S., Yang S.J. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Med J (Engl)* 2006;119(11):905–10.
- Liang R., Huang G.S., Wang Z., Chen X.Q., Bai Q.X., Zhang Y.Q., Dong B.X., Wang W.Q. Effects of human bone marrow stromal cell line (HFCL) on the proliferation, differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cell lines U937, HL-60 and HL-60/VCR. *Int J Hematol* 2008;87(2):152–66.
- Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R.C. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009. Jan 15. doi: 10.1038/leu.2008.384.
- Ding Y., Lu H., Lu S.F., Lu R.N., Liu P., Wu Y.J., Li J.Y. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009;17(1):137–40.
- Manabe A., Coustan-Smith E., Behm F.G., Raimondi S.C., Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;79(9):2370–7.
- Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritsky A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16(9):1713–24.
- Mudry R.E., Fortney J.E., York T., Hall B.M., Gibson L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 2000;96(5):1926–32.
- Garrido S.M., Appelbaum F.R., Willman C.L., Banker D.E. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol* 2001;29(4):448–57.
- Fortney J.E., Zhao W., Wenger S.L., Gibson L.F. Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. *Leuk Res* 2001;25(10):901–7.
- Wang L., Fortney J.E., Gibson L.F. Stromal cell protection of B-lineage acute lymphoblastic leukemic cells during chemotherapy requires active Akt. *Leuk Res* 2004;28(7):733–42.
- Астрелина Т.А., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А., Сторожаков Г.И., Короткова Н.В., Владимирская Е.Б. Клиническое значение чувствительности лейкемических клеток к химиотерапии при остром лимфобластном лейкозе у детей по результатам МТТ-теста *ex vivo*. *Гематол и трансфузиол* 2002;6:21–4.
- Hongo T., Shuhei Yajima, Minoru Sakurai, Yasuo Horikoshi and Ryoji. *In vitro* drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89(8):2959–65.
- Janka-Schaub G.E., Harms D.O., den Boer M.L., Veerman A.J., Pieters R. *In vitro* drug resistance as independent prognostic factor in the study COALL-O5-92 Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia; two-tiered classification of treatments based on accepted risk criteria and drug sensitivity profiles in study COALL-06-97. *Klin Padiatr* 1999;211(4):233–8.
- Kaspers G.J.L., Veerman A.J.P., Pieters R., Van Zantwijk C.H., Smets L.A., Van Wering E.R., Van Der Does-Van Den Berg A. *In vitro* cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;90:2723–9.
- Veerman A.J.P., Pieters R. Drug sensitivity assays in leukemia and lymphoma. *Br J Haematol* 1990;74:381–4.

НКТ-КЛЕТКИ: ХАРАКТЕРНЫЕ СВОЙСТВА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

О.В. Акинфиева, Л.Н. Бубнова, С.С. Бессмельцев

ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: Ольга Викторовна Акинфиева olgaakinf@yandex.ru

НКТ-клетки представляют собой субпопуляцию лимфоцитов, экспрессирующих как маркеры NK-клеток, так и T-клеточные дифференцировочные антигены. НКТ-клетки служат важнейшими регуляторами иммунного ответа, способствуя защите организма от возникновения, роста и метастазирования опухолей, от внутриклеточных инфекций различной природы, а также от развития аутоиммунных заболеваний. НКТ-клетки играют ключевую роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа за счет продукции IFN- γ , активирующего NK-клетки, CD8⁺ T-лимфоциты и макрофаги.

Ключевые слова: IFN- γ , НКТ-клетки, NK-клетки, аутоиммунные заболевания, противоопухолевый иммунный ответ

NKT CELLS: CHARACTERISTIC FEATURES AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE IN THE IMMUNE RESPONSE REGULATION

O.V. Akinfieva, L.N. Bubnova, S.S. Bessmeltsev

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg

A lymphocyte lineage which is referred to as NKT cells expresses both markers of NK cells and T lymphocytes. NKT cells play a key role in the regulation of different types of immune responses, contribute to the protection from tumor growth and metastasis, from different intracellular infections and from development of autoimmune diseases. NKT cells are of vital importance in the induction of antitumoral immune response due to their production of IFN- γ which activates NK cells, CD8⁺ T lymphocytes and macrophages.

Key words: IFN- γ , NKT cells, NK cells, autoimmune diseases, antitumoral immune response

Введение

В последние 10–15 лет особое внимание исследователей привлекает субпопуляция Т-лимфоцитов, получившая название НКТ-клетки. Эти лимфоциты, экспрессирующие как маркеры NK-клеток (CD16, CD56), так и Т-клеточные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8), играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа при поражении организма патогенами, при аутоиммунных реакциях и опухолевых заболеваниях [1–3].

Предшественниками НКТ-клеток, как и Т-лимфоцитов, являются тимоциты. НКТ-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор TCR, который участвует в распознавании липидных антигенов, связанных с молекулами комплекса гистосовместимости CD-1d, экспрессируемыми антиген-презентирующими клетками (АПК) – макрофагами, дендритными клетками и В-лимфоцитами [2, 3]. Гетеродимерная форма рецептора TCR НКТ-клеток представлена преимущественно $\alpha\beta$ -цепями, причем в зависимости от экспрессии генов переменных областей α - и β -цепей, различают НКТ-клетки, несущие инвариантные (НКТ-клетки I типа, iNKT-клетки) или переменные TCR (НКТ-клетки II типа) [1].

У мышей НКТ-клетки обнаруживаются в основном в печени (10–40% от всех внутрипеченочных лимфо-

цитов), но также присутствуют и в тимусе, костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и в периферической крови (< 1%). Распределение НКТ-клеток у человека не столь хорошо изучено, однако известно, что уровень этих клеток в печени значительно ниже, чем у мыши (< 1%). Причина подобных различий в распределении НКТ-лимфоцитов у человека и мыши на данный момент неизвестна [2].

CD-1d-зависимые НКТ-клетки человека и мыши функционально и фенотипически гомологичны: CD-1d-зависимые НКТ-клетки мыши узнают CD-1d-несущие АПК человека, и наоборот. Благодаря сходству иммунных систем человека и мыши, изучение свойств НКТ-клеток на различных моделях у мышей позволяет экстраполировать полученные данные на значение НКТ-клеток в человеческом организме [3].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе дифференцировки предшественников НКТ-клеток

Сравнительно недавно исследователи установили различия в сигнальных путях, лежащих в основе дифференцировки клеток-предшественников на НКТ и Т-лимфоциты. Для позитивной селекции Т-лимфоцитов необходимы компоненты сигнального пути Ras-MAP (Ras и Mek-1), тогда как ключевым

ферментом дифференцировки NKT-клеток является киназа FynT. Взаимодействие между остатком тирозина белка SLAM, SH2-доменом белка SAP, а также SH3-доменом киназы FynT играет важную роль в дифференцировке NKT-клеток. Получены данные, согласно которым дефектные по белку SAP мыши характеризуются пониженным уровнем NKT-клеток в тимусе, селезенке и печени. У человека мутации гена *sap* сопровождаются снижением уровня и активности NKT-клеток в периферической крови [4, 5].

Связанные с белком SAP рецепторы семейства SLAM необходимы для дифференцировки $V\alpha 14i$ TCR⁺ кортикальных $CD4^+CD8^-$ -timoцитов в группу NKT-клеток. В семейство рецепторов SLAM входят SLAM (CD105), CD84, Ly108, Ly9, 2B4 и CRACC. При дифференцировке NKT-клеток происходит взаимодействие друг с другом внеклеточных иммуноглобулин-подобных фрагментов разных рецепторов данного семейства (2B4-CD84) или же гомотипичных рецепторов (CD105-CD105, CD84-CD84, Ly108-Ly108, Ly9-Ly9 и CRACC-CRACC). Цитоплазматические домены рецепторов семейства SLAM содержат фрагменты, с помощью которых они связываются с SAP (за исключением CRACC) [4, 6].

Взаимодействие $V\alpha 14i$ TCR⁺ кортикальных $CD4^+CD8^-$ -timoцитов с комплексами CD1d/iGb3 таких же клеток приводит к взаимодействию внеклеточных доменов гомотипичных рецепторов семейства SLAM, связанных с белком SAP, с последующей активацией внутриклеточного каскада, приводящего к дифференцировке NKT-клеток (см. рис. 1) [2, 5].

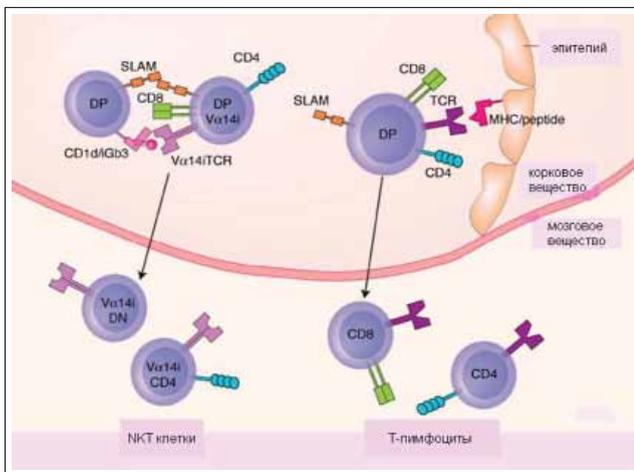


Рис. 1. Схема SLAM-зависимой дифференцировки NKT-клеток. DP (double positive) – $CD4^+CD8^-$ -timoциты, MHC/peptide – комплексы MHC/пептид, TCR – T-клеточный рецептор [4]

Хотя точный механизм превращения кортикальных $CD4^+CD8^-$ -timoцитов в NKT-клетки в настоящее время не установлен, исследователи предполагают, что SAP-FynT-зависимый сигнальный каскад играет в нем ключевую роль (рис. 2). На первом этапе каскада киназа FynT активирует белок SAP, после чего происходит фосфорилирование инозитол фос-

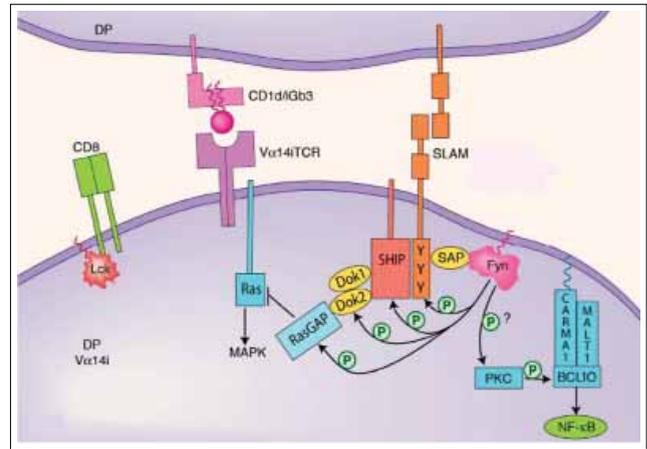


Рис. 2. Сигнальный каскад SAP-FynT-зависимого ингибирования MAP-киназы с последующей стимуляцией дифференцировки NKT-клеток. DP (double positive) – $CD4^+CD8^-$ -timoциты. P – фосфорилирование [4]

фатазы SHIP. Затем в процесс вовлекаются адапторные белки Dok1 и Dok2, а также белок RasGAP. Белок Dok2 связывается с RasGAP и подавляет активацию Ras-MAPK, вызванную разнообразными стимулами (антигенами, ростовыми факторами, цитокинами). Киназа FynT фосфорилирует также и протеин киназу C (PKC), которая в свою очередь активирует адапторный белок Bcl10, в результате чего происходит активация транскрипционного фактора NF-κB. NF-κB транслоцируется в клеточное ядро, где участвует в регуляции транскрипции многих генов, включая гены цитокинов, что сопровождается ингибированием апоптоза и дифференцировкой клеток. Показано, что нокаут генов *PKC* или *BCL10* у мыши сопровождается разрушением NKT-клеток в тимусе и селезенке, что подтверждает участие этих факторов в дифференцировке NKT-клеток [4, 5].

В реаранжировке и дифференцировке iNKT-клеток как мыши, так и человека, участвуют также такие факторы, как «сиротский» рецептор ретиноидов RORγt и IL-15 [7, 8]. У мышей с нокаутом гена *IL-15* наблюдалось практически полное отсутствие iNKT-клеточной субпопуляции [9].

Фенотипические и функциональные свойства NKT-клеток

Фенотип NKT-клеток I типа

У мыши NKT-клетки I типа экспрессируют каноническую инвариантную α-цепь TCR ($V\alpha 14J\alpha 18$ TCRα) вместе с $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ или $V\beta 2$, и подразделяются по фенотипу на $CD4^+CD8^-$ и $CD4^-CD8^-$ -популяции. Те же самые клетки человека экспрессируют инвариантную α-цепь TCR ($V\alpha 24J\alpha Q$ TCRα) вместе с $V\beta 11$ и делятся по фенотипу на $CD4^+CD8^-$, $CD8\alpha\beta^+$, $CD8\alpha\beta^-$ и $CD4^-CD8^-$ -популяции [10, 11]. Большинство, но не все iNKT-клетки экспрессируют антиген *CD161*, определенный как *NK1.1* у мыши и как *NKR-PIA* у человека. Также на iNKT-клетках определяются такие маркеры, как CD69 и CD44. Сле-

дует отметить, что существует подтип NKT-клеток, экспрессирующих NK1.1-маркер, но являющихся CD-1d-независимыми [3]. В нескольких независимых исследованиях было показано, что CD4-CD8-субпопуляция iNKT-клеток человека продуцирует преимущественно цитокины Th1-типа, такие как IFN- γ , тогда как CD4⁺-субпопуляция iNKT-клеток продуцирует как Th1- (IL-2), так и Th2-цитокины (IL-4, IL-13) [12, 13].

Лигандами, встроенными в молекулы комплекса гистосовместимости CD-1d АПК и распознаваемыми NKT-клетками, являются гликолипиды или гликофинголипиды – семейство молекул, состоящих из гидрофобного керамидного «скелета» – N-ацетилфингозина, и гидрофильной «головы», состоящей из углеводов – моно- или олигосахаридов. Выделенный из морской губки *Agelas mauritianus* α -галактозилцерамид (α -GalCer), а также его синтетический аналог KRN7000 служат высокоаффинными лигандами CD-1d-молекулы АПК человека и мыши. Предположительно, гликолипид изоглоботригексозилцерамид (iGb3), выделенный из лизосом, является естественным лигандом NKT-клеток. Мыши с нокаутом гена фермента, необходимого для синтеза данного липида, характеризуются сниженным на 95% уровнем продукции iNKT-клеток в тимусе [14, 15].

Показано, что iNKT-клетки распознают липиды, присутствующие в клеточных мембранах грамотрицательных LPS-негативных бактерий рода *Sphingomonas* и *Ehrlichia*. CD1d-клетки также презентуют iNKT-клеткам липиды, присутствующие в мембранах бактерий рода *Borrelia*, *Leishmania*, *Shistosoma* и *Mycobacteria* [16–19].

Фенотип NKT-клеток II типа

В отличие от инвариантных NKT-клеток, экспрессирующих только один вид TCR α -цепи – Va14Ja18, вариабельные NKT-клетки являются гетерогенной субпопуляцией, экспрессируя различные TCR α -цепи. Разнообразие репертуара TCR α -цепи NKT-клеток II типа требует дальнейшего изучения, однако установлено, что наиболее часто встречаемыми TCR α -цепями NKT-клеток II типа у мыши являются Va3.2Ja9 и Va8 [20]. Они подразделяются по фенотипу на CD4⁺CD8⁻ или CD4-CD8⁻-популяции. Следует отметить, что между молекулами CD1d АПК, презентующих липидные антигены NKT-клеткам I и II типа, есть различия: если NKT-клетки I типа взаимодействуют с CD1d, в цитоплазматическом домене которого присутствует тирозиновый мотив (wild-type CD1d, его кодирует ген *CD1-WT*), то NKT-клетки II типа связываются с CD1d, в структуре которого тирозиновый мотив отсутствует (tail-deleted CD1d, его кодирует ген *CD1d-TD*) [21, 22]. Также было показано, что NKT-клетки II типа не распознают α -GalCer, однако связываются с молеку-

лами CD1d со встроенными сульфатидами, найденными в миелиновой оболочке.

NKT-клетки, экспрессирующие вариабельные TCR, найдены также и у человека. Они подразделяются на CD4⁺ и CD8 $\alpha\beta$ ⁺, и большинство NKT-клеток II типа человека экспрессируют V β 11. Подобно NKT-клеткам I класса, NKT-клетки II класса подразделяются на NK1.1⁺- и NK1.1⁻-популяции и продуцируют Th1- и Th2-цитокины в ответ на антигенную стимуляцию. Как оказалось, большинство CD1d-реактивных клеток костного мозга человека представляют собой NKT-клетки II типа. Следует отметить, что в связи с разнообразием α - и β -цепей TCR NKT-клеток II класса в настоящее время не существует узкоспецифических маркеров для данной субпопуляции, поэтому прямое определение данной подгруппы клеток затруднительно [20, 22].

Характеристика функциональной активности NKT-клеток

NKT-клетки играют важную роль в регуляции иммунного ответа, связывая механизмы естественной резистентности и специфической иммунной реактивности. Подобно гранулоцитам и NK-клеткам, NKT-клетки одними из первых реагируют на проникновение в организм чужеродных агентов. В то же время, подобно T-лимфоцитам, NKT-клетки участвуют в распознавании аутоантигенов и чужеродных антигенов. Как показали исследования, наиболее эффективным соединением, активирующим большинство NKT-клеток человека и мыши, является α -GalCer. Данное соединение связывается с CD-1d-молекулой АПК, затем комплекс CD1d со встроенным гликолипидом связывается с TCR NKT-клеток, что приводит к их активации. Стимулированные NKT-клетки начинают активно продуцировать цитокины в течение 1–2 часов с момента связывания TCR с презентуемым антигеном. По всей видимости, NKT-клетки способны хранить или вновь синтезировать мРНК для синтеза цитокинов еще до активации экзогенными антигенами [1–3, 7, 11, 20].

Одни цитокины, продуцируемые NKT-клетками, включающие IFN- γ и TNF, способствуют дифференцировке CD4⁺-клеток в Т-хелперы 1 типа (Th1), другие, включающие IL-4 и IL-13, – в Т-хелперы 2 типа (Th2). Данное свойство NKT-клеток на первый взгляд выглядит парадоксально, так как между Th1- и Th2-клетками существуют отношения антагонизма. Представлено несколько гипотез о том, каким образом NKT-клетки «выбирают» направление действия (рис. 3):

1. NKT-клетки преимущественно продуцируют про- или противовоспалительные цитокины в зависимости от типа сигналов, которые они получают, включая тип АПК. Например, IL-12 индуцирует продукцию NKT-клетками IFN- γ , в то время как IL-7 индуцирует продукцию IL-4 (рис. 3а).

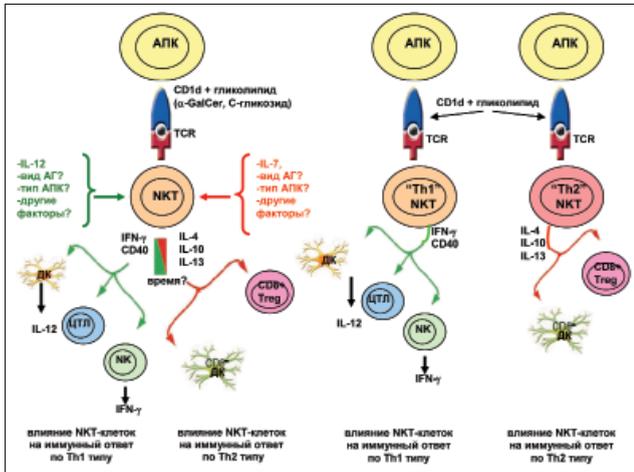


Рис. 3. Схематическое изображение регуляции NKT-клетками иммунного ответа по Th1- или по Th2-типу: а – продукция NKT-клетками проли или противовоспалительных цитокинов зависит от типа сигналов, которые они получают, от вида АГ, а также от времени прошедшего от начала их активации; б – различные субпопуляции NKT-клеток обеспечивают формирование иммунного ответа по Th1 или по Th2 типу (зелеными стрелками показана реализация иммунного ответа по механизму активации Th1, красными стрелками – Th2-клеток). АГ – антиген, АПК – антигенпрезентирующая клетка, ДК – дендритная клетка, ЦТЛ – цитотоксический Т-лимфоцит, $CD8^+$ T_{reg} – адаптивный регуляторный Т-лимфоцит, TCR – Т-клеточный рецептор [2]

2. Уровень тех или иных цитокинов, продуцируемых NKT-клетками, может изменяться в зависимости от вида презентуемого антигена. В подтверждение данной гипотезы найдены аналоги α -GalCer, которые стимулируют продукцию NKT-клетками Th2-цитокинов, тогда как С-гликозиды индуцируют продукцию Th1-цитокинов [11] (рис. 3а).

3. NKT-клетки при активации продуцируют определенное количество иммунологически активных факторов, однако степень их влияния на тот или иной иммунный ответ организма варьирует в зависимости от времени, прошедшего от начала активации. Это подтверждают некоторые данные, полученные при изучении NKT-клеток у мышей, и согласно которым, NKT-клетки продуцируют и IFN- γ , и IL-4 сразу после взаимодействия с α -GalCer [2]. Скорость продукции цитокинов указывает на то, что мРНК к ним была синтезирована до стимуляции NKT-клеток. При этом продукция IL-4 с течением времени значительно сокращается, в то время как IFN- γ остается на прежнем уровне в течение 2–3 дней (рис. 3а).

4. Согласно последней гипотезе, активация Th1- или Th2-клеток зависит от типа субпопуляции NKT-лимфоцитов. Например, $CD4^+$ NKT-клетки человека продуцируют гораздо более высокий уровень Th2-цитокинов, по сравнению с Th1-цитокинами, и обладают набором рецепторов хемокинов и цитотоксических молекул, отличных от $CD4^-$ NKT-клеток (рис. 3б).

Существуют данные, подтверждающие каждую из данных гипотез, возможно, некоторые из них мо-

гут сосуществовать. В целом, механизмы, определяющие NKT-опосредованное преобладание гуморального иммунного ответа над клеточным и наоборот, в настоящее время полностью не определены и продолжают изучаться [2, 11, 13, 16].

Роль NKT-клеток в защите от проявлений внешней или внутренней форм биологической агрессии

NKT-клетки, продуцирующие цитокины, участвуют в регуляции иммунного ответа, идущего по механизму активации как Th1-, так и Th2-клеток, способствуя защите организма от внутриклеточных инфекций различной природы, от возникновения, роста и метастазирования опухолей, а также от развития аутоиммунных заболеваний [3, 4, 8, 11, 20, 23–25].

Противобактериальная активность NKT-клеток

NKT-клетки I типа участвуют в защите организма от *Mycobacterium tuberculosis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Введение α -GalCer мышам, предварительно инфицированным *M. tuberculosis*, способствует миграции лимфоцитов в легкие, а также увеличивает продолжительность жизни инфицированных мышей [26]. iNKT-клетки принимают участие в клиренсе легких мышей от бактерий *P. aeruginosa*: у мышей с нокаутом гена *CD1d* в легких зарегистрировано снижение содержания нейтрофилов, а также падение уровня макрофагального провоспалительного протеина 2 (MIP-2). Также показана протективная роль iNKT-клеток в защите организма человека и животных от патогенов рода *Salmonella*, *Borrelia*, *Leishmania*, *Shistosoma*, *Sphingomonas* и *Ehrlichia* [26–28].

Противопаразитарная активность NKT-клеток

Активированные iNKT-клетки печени защищают организм от *Plasmodium yoelii*, увеличивая продукцию IFN- γ . Введение α -GalCer при вакцинации мышей *P. yoelii* усиливает протективное действие iNKT-клеток, ингибируя паразитемию, вызванную введением вакцины [25]. Также установлено участие iNKT-клеток в защите организма от *Leishmania major* и *Toxoplasma gondii*. Введение вакцины из *T. gondii* здоровым мышам вызывает активацию $CD8^+$ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , обладающих противопаразитарным действием [1, 11, 23].

Участие NKT-клеток в защите от микотических инфекций

Cryptococcus neoformans является микотическим патогеном, на первых этапах заболевания поражающим легкие, а на более поздних этапах – центральную нервную систему (ЦНС). Для YC-13-штаммов, используемых при моделировании *C. neoformans* у мышей, характерна ограниченная локализация; ЦНС при этом не поражается. Введение α -GalCer повышает резистентность инфицированных мышей за счет активации NKT-клеток и продукции ими IFN- γ [16, 29].

Противовирусная активность NKT-клеток

Продуцируемый iNKT-клетками IFN-γ вызывает повышение цитотоксической активности NK-клеток, запускающих апоптоз в клетках-мишенях, зараженных вирусами. При поражении организма мыши вирусом гепатита В (HBV) печеночные iNKT-клетки вызывают IFN-α/β- и IFN-γ-зависимое ингибирование транскрипции HBV после внутривенной инъекции α-GalCer. В течение суток после введения α-GalCer продолжающаяся транскрипция цитокинов iNKT-клетками печени вызывает подавление вирусной репликации [30].

Установлено, что мыши с нокаутом гена *CD1d* подвержены более высокому риску заражения респираторным синцитиальным вирусом (RSV), вирусом герпеса HSV-1, цитомегаловирусом или вирусом диабетогенного энцефаломиокардита (ECMV-D) по сравнению с контрольными животными. В этих случаях введение α-GalCer вызывает усиление продукции IFN-γ активированными iNKT-клетками контрольных мышей [3, 30].

Подавление развития аутоиммунных заболеваний

В большом числе исследований, посвященных данной теме, в качестве аутоиммунного заболевания изучается диабет I типа. Показано, что у склонных к диабету мышей линии NOD количество iNKT-клеток снижено, тогда как инфузии этих клеток, введение трансгена *Vα14Jα18*, или стимуляция iNKT-клеток посредством введения α-GalCer подавляет прогрессирование заболевания [2, 32].

Предположительно, iNKT-клетки играют регуляторную роль, продуцируя Th2-цитокины IL-4 и IL-13 при таких органоспецифических и системных аутоиммунных заболеваниях как рассеянный склероз, астма, аутоиммунный энцефалит [2, 33–35].

Проявление противоопухолевой активности NKT-клеток

NKT-клетки I типа играют важную роль при проведении противоопухолевой терапии экспериментальным животным. Сравнительно недавно проведенные исследования на мышах показали, что α-GalCer путем стимуляции iNKT-клеток вызывает подавление образования опухолей разного происхождения – спонтанных, карциноген- и онкоген-индуцированных [29, 36]. Изучение механизмов противоопухолевого эффекта iNKT-клеток показало, что главная роль при этом отводится IFN-γ, тогда как другие потенциально туморицидные факторы, продуцируемые iNKT-клетками (TNF, перфорин), не столь важны [37, 38]. Даже в отсутствие экзогенной стимуляции iNKT-клетки активируют АПК и вызывают продукцию IL-12 зрелыми дендритными клетками, способствуя, таким образом, активации Th1 и проведению клеточного иммунного ответа [39]. Как оказалось, метилхолантрен-

индуцированные саркомы мыши возникают чаще у линий мышей с нокаутом гена NKT-клеток. Перенос NKT-клеток больным мышам вызывает подавление опухолевого роста у реципиентов [37].

Механизм противоопухолевой активности NKT-клеток I типа

Роль NKT-клеток I типа в противоопухолевом иммунном ответе, по-видимому, заключается не в непосредственном лизировании опухолевых клеток, а в активации NK-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов [37, 40]. После анализа различных экспериментальных моделей спонтанных и индуцированных опухолей у мышей, в которых была доказана протективная роль iNKT-клеток, была предложена следующая гипотеза механизма их действия (рис. 4).

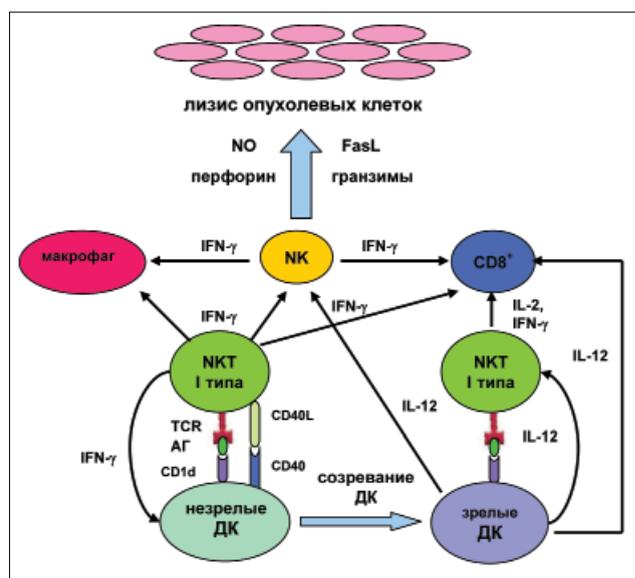


Рис. 4. Механизм противоопухолевой активности NKT-клеток I типа. АГ – антиген, ДК – дендритные клетки, FasL – Fas лиганд, NO – оксид азота, TCR – T-клеточный рецептор (модифицировано автором из [15])

При взаимодействии незрелых дендритных клеток и NKT-клеток I типа посредством комплексов CD1d-АГ-TCR, а также CD40-CD40L iNKT-клетки продуцируют IFN-γ, который, с одной стороны, стимулирует созревание дендритных клеток, с другой – активирует макрофаги и CD8⁺ Т-лимфоциты. Зрелые дендритные клетки продуцируют IL-12, стимулирующий продукцию IFN-γ и IL-2 iNKT-клетками; в свою очередь, IFN-γ и IL-2, а также IL-12 активируют NK-клетки, CD8⁺ Т-лимфоциты и макрофаги [29, 41, 42]. Активированные эффекторные Т-лимфоциты, NK-клетки и макрофаги вызывают лизис опухолевых клеток посредством различных механизмов, включающих продукцию перфорина, гранзимов, оксида азота (NO) и FasL [43–45].

В различных экспериментальных моделях индуцированного опухолевого роста у мышей, таких как модели B16 меланомы, J558 плазмоцитомы, WEN13В

миеломоноцитной лейкемии, а также EL4 тимомы, при инъекции опухолевых клеток вместе с α -GalCer исследователям удалось индуцировать противоопухолевый иммунный ответ, включающий iNKT- и NK-опосредованный лизис опухолевых клеток и презентацию опухолевых антигенов дендритными клетками эффекторным Т-лимфоцитам [38, 42].

iNKT-клетки человека также участвуют в индукции противоопухолевого иммунного ответа. Согласно данным, полученным *in vitro*, α -GalCer-опосредованная активация iNKT-клеток приводит к лизису опухолевых клеток NK-клетками [42, 44]. Установлены статистически достоверные более низкие значения уровня iNKT-клеток в периферической крови пациентов с солидными опухолями по сравнению со здоровыми донорами [37, 39, 40]. У пациентов со злокачественными новообразованиями наблюдается подавление пролиферации NKT-клеток I типа, а также продукции ими IFN- γ [44]. Для некоторых видов солидных опухолей показано значение определения количества iNKT-клеток, инфильтрирующих опухоль, как прогностического фактора выживаемости пациентов: при высоком числе iNKT-клеток вероятность выживаемости весьма высока [41]. Использование инъекций α -GalCer вместе с дендритными клетками в клинике показало, что уровень iNKT-клеток повышается в периферической крови пациентов с различными солидными опухолями, кроме того, повышается уровень сывороточного IFN- γ и IL-12, а также наблюдаются стимуляция цитотоксической активности NK-клеток и активация Т-лимфоцитов [2, 43, 44].

Механизм супрессии противоопухолевого иммунного ответа NKT-клетками II типа

NKT-клетки II типа участвуют в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Как оказалось, прямая активация NKT-клеток II типа с помощью сульфатида в организме мышей с экспериментальной моделью солидных опухолей легких вызывала рост опухолевой массы [11, 37, 42]. Экспрессия опухолевыми клетками организма человека сульфатидов, по-видимому, также может играть роль в активации NKT-клеток II типа и ингибировании противоопухолевого иммунного ответа у пациентов с онкологическими заболеваниями [42, 46].

Исследователями был предложен следующий механизм супрессии противоопухолевого иммунного ответа NKT-клетками II типа (рис. 5): при активации NKT-клеток II типа (как правило, CD4⁺-субпопуляции) опухолевыми гликолипидами, презентуемыми молекулами CD1d АПК, они продуцируют IL-13. IL-13, а также его кофактор TNF- α связываются с рецепторами CD11b⁺Gr-1⁺-миелоидных клеток, обладающих супрессорной активностью. TNF- α связывается со своим рецептором на клеточной поверхности

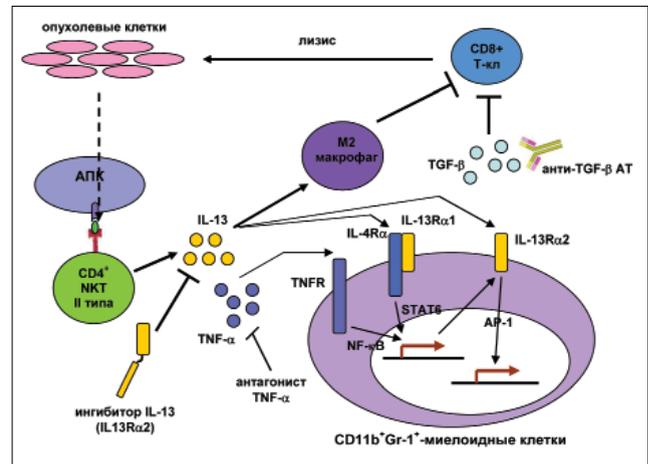


Рис. 5. Механизм супрессии противоопухолевого иммунного ответа NKT-клетками II типа. АПК – антигенпрезентирующая клетка [11, 15]

TNFR, индуцирующим внутриклеточный сигнальный каскад, результатом которого является активация транскрипционного фактора NF- κ B. IL-13, в свою очередь, связывается с рецептором IL-4 II типа (IL-4R), состоящим из 2 субъединиц – IL-4R α и IL-13R α 1, что приводит к активации транскрипционного фактора STAT6, запускающего экспрессию IL-13R α 1 на поверхности CD11b⁺Gr-1⁺ миелоидных клеток. Связывание IL-13 с IL-13R α 1 приводит к AP-1-опосредованной индукции экспрессии TGF- β , подавляющего активность цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов. Посредством продукции IL-13 NKT-клетки II типа также могут активировать M2-макрофаги, функция которых заключается в подавлении активности CD8⁺ Т-лимфоцитов и индукции роста опухолевых клеток. Блокада IL-13 с помощью его ингибитора – растворимого IL-13R α 2, а также связывание TGF- β анти-TGF- β -антителами или блокада активности TNF- α с помощью антагонистов может заблокировать данный механизм супрессии [45]. IL-4 не принимает участия в данном регуляторном механизме, так как продукция TGF- β CD11b⁺Gr-1⁺-миелоидными клетками осуществляется только при одновременном связывании IL-13 и TNF- α со своими рецепторами [42, 45, 46].

Взаимодействие субпопуляций NKT-клеток I и II типа друг с другом и с другими клеточными субпопуляциями

Перекрестная регуляция NKT-клеток I и II типа

NKT-клетки I и II типа влияют на активность друг друга *in vitro* и *in vivo* (рис. 6) [15]. Как показали исследования, активированные сульфатидом NKT-клетки II типа, стимулируют плазматоидные дендритные клетки (пДК) к продукции IL-12, а также макрофагального воспалительного протеина 2 (MIP-2), подавляющих активность NKT-клеток I типа [47]. Незрелые дендритные клетки и CD11b⁺Gr-1⁺-миелоидные клетки также способны ингибировать активность iNKT-клеток. Таким образом, отклонение от динамического равновесия между данными субпопуляциями NKT-

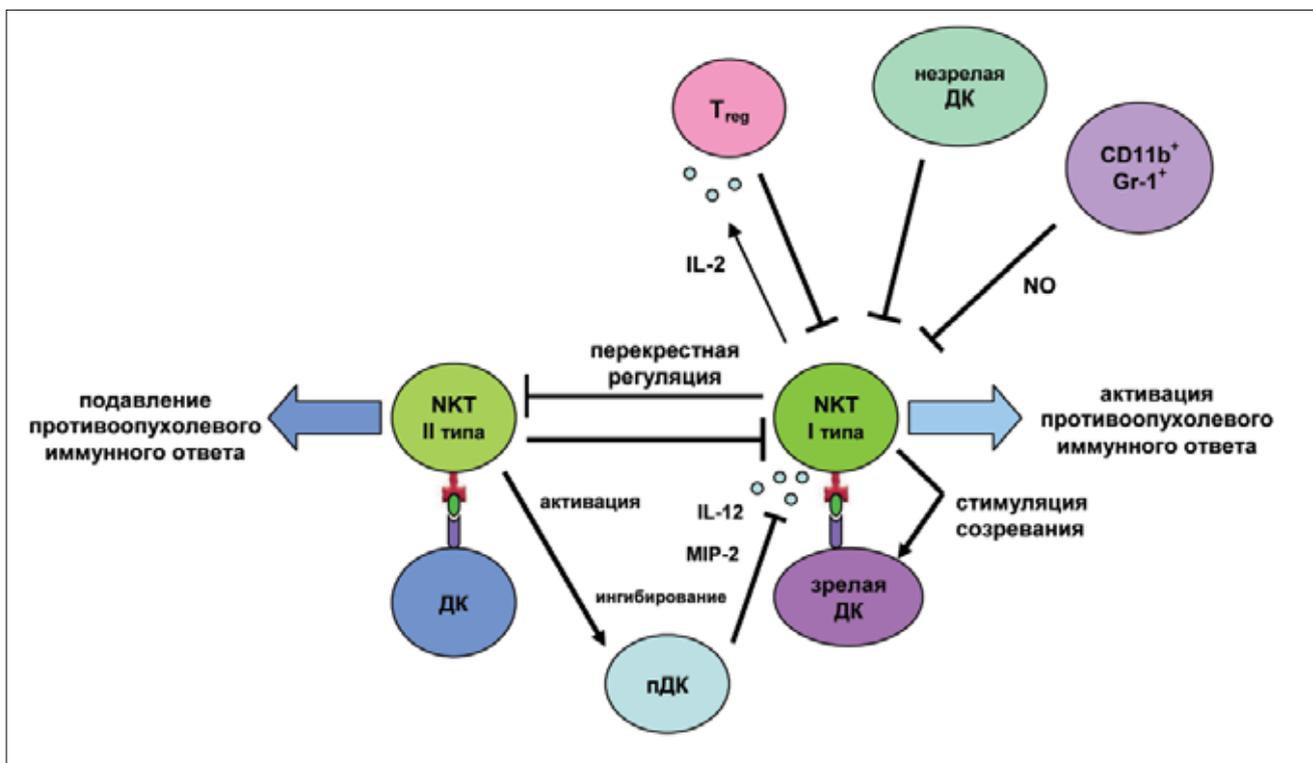


Рис. 6. Механизм перекрестной регуляции NKT-клеток I и II типа.

ДК – дендритные клетки, нДК – плазмоцитоподобные дендритные клетки, MIP-2 – макрофагальный провоспалительный протеин 2, NO – оксид азота, T_{reg} – естественный регуляторный T-лимфоцит [15, 21]

клеток может во многом определить исход иммунного ответа, включая Th1/Th2-баланс, при наличии в организме опухолевых клеток. Экзогенное воздействие на баланс активности NKT-клеток I и II типа может играть важную роль в успешности иммунотерапии пациентов [38, 44–47].

Взаимодействие NKT-клеток с T_{reg}-лимфоцитами

Между NKT-клетками I типа и CD4⁺CD25⁺ естественными регуляторными T-лимфоцитами (T_{reg}-клетками) существуют отношения антагонизма. В различных моделях индуцированного опухолевого роста у мышей инъекции T_{reg}-клеток вызывают стимуляцию роста опухолей, уменьшение количества iNKT-клеток всех 3 субпопуляций (CD4⁺, CD8⁺ и CD4⁺CD8⁻), подавление их пролиферации и продукции ими цитокинов [48]. Напротив, изучение моделей аутоиммунных заболеваний показывает, что АПК-активированные NKT-клетки I типа посредством IL-2 стимулируют T_{reg}-клетки [11, 23].

Взаимодействие NKT-лимфоцитов с NK-клетками

Активация NK-клеток NKT-лимфоцитами I типа, продуцирующими IFN-γ, а также IL-2, необходима для индукции противоопухолевого иммунного ответа данной субпопуляцией лимфоцитов [29, 37, 40, 41]. Существует и обратная связь – NK-клетки, активированные IL-12 и IL-18, способны преодолевать супрессирующее воздействие со стороны NKT-клеток II типа и участвовать в защите организма от

опухолевых клеток [29, 40].

Взаимодействие NKT-лимфоцитов с миелоидными супрессорными клетками и M2-макрофагами

CD11b⁺Gr-1⁺-миелоидные супрессорные клетки представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую макрофаги, гранулоциты, незрелые дендритные клетки, а также миелоидные клетки-предшественники. В различных экспериментальных моделях индуцированного канцерогенеза, а также у пациентов с онкологическими заболеваниями эти клетки инфильтрируют опухоль, подавляя противоопухолевый иммунный ответ посредством продукции аргиназы, индуцибельной NO-синтазы и TGF-β, инактивирующих эффекторные T-лимфоциты [47]. NKT-клетки II типа активируют CD11b⁺Gr-1⁺-миелоидные клетки, синтезирующие TGF-β, который оказывает супрессорный эффект на CD8⁺ T-лимфоциты [46].

Взаимодействие NKT-лимфоцитов с дендритными клетками

С одной стороны, активация NKT-клетками I типа незрелых дендритных клеток стимулирует их созревание и продукцию ими важнейшего цитокина, обладающего противоопухолевой активностью – IL-12. С другой стороны, для NKT-клеток II типа показана способность рекрутировать плазмоцитоподобные дендритные клетки для индукции анергии NKT-клеток I типа. Кроме того, активированные iNKT-клетки стимулируют дифференцировку моноцитов в незрелые ден-

дритные клетки посредством продукции GM-CSF и IL-13 [49]. Показана и обратная связь – костимуляторные молекулы B7 и CD40 дендритных клеток играют роль в пролиферации NKT-клеток. Плазмацитоидные дендритные клетки человека, преимущественно экспрессирующие TLR9, способны активировать iNKT-клетки, продуцируя IFN I типа [47, 50].

Индукция активности NKT-клеток I типа в терапии пациентов с онкологическими заболеваниями

iNKT-клетки являются важнейшими регуляторами противоопухолевого иммунного ответа. В связи с этим, в настоящее время ведутся активные поиски способов стимуляции данной субпопуляции лимфоцитов в организме пациентов с различными злокачественными новообразованиями.

Разрабатываются методы активации NKT-клеток I типа человека с использованием нерастворимых форм α -GalCer, трансплантации аутологичных iNKT-клеток и др. Одним из методов лечения может быть комбинирование инъекций α -GalCer с применением препаратов, ингибирующих опухолевый рост и облегчающих презентацию АГ NKT-клеткам I типа. Показано эффективное использование аналога талидомида—леналидомида совместно с α -GalCer, которое способствует повышению продукции IFN- γ в периферической крови и замедлению опухолевого роста у пациентов с множественной миеломой [51].

Эффективным также оказывается применение в клинике терапии, основанной на трансплантации дендритных клеток вместе с α -GalCer. При этом происходит значительное увеличение количества iNKT-клеток в периферической крови пациентов, а также повышение уровня IL-2 и IP-10 [51–53]. Стимуляция пролиферации NKT-клеток I типа *ex vivo* и последующая трансплантация оказались эффективными в терапии пациентов со злокачественными новообразованиями легких [54].

Помимо различных способов активации NKT-клеток I типа другим направлением в стратегии повышения эффективности противоопухолевого иммунитета является изучение возможностей ингибирования негативных регуляторных механизмов. Так, связывание IL-13 и блокада его сигнального пути способствуют подавлению роста опухолей, для которых IL-13 является фактором роста, например, для лимфомы Ходжкина [55, 56]. Нейтрализация TGF- γ моноклональными антителами анти-TGF- γ позволяет значительно повысить активность цитотоксических CD8⁺ T-лимфоцитов в организме пациентов с меланомой [57].

Заключение

NKT-клетки, являясь весьма малочисленной субпопуляцией T-лимфоцитов, тем не менее играют важнейшую роль в регуляции направленности действия иммунного ответа. Исследования доказали, что NKT-клетки регулируют активность других ключевых компонентов иммунной системы – CD8⁺ T-лимфоцитов, CD4⁺ T-лимфоцитов, NK-клеток, T_{reg}-лимфоцитов, дендритных клеток, а также миелоидных клеток. Степень активности NKT-клеток определяет исход терапии различных заболеваний, от инфекционных до аутоиммунных и онкологических. Исследование путей регуляции NKT-клетками иммунного ответа при проявлении внешней или внутренней форм биологической агрессии важно как для фундаментального понимания механизмов функционирования иммунорегуляторных клеток, так и для разработки терапевтических препаратов. Развитие исследований совместного применения химио- и иммунотерапии представляет собой одно из перспективных направлений борьбы со злокачественными опухолевыми клетками в организме человека. Изучение различных способов воздействия на активность NKT-клеток в клинике может иметь решающее значение в лечении злокачественных новообразований.

Л и т е р а т у р а

1. Sköld M. and Behar M.S. Role of CD1d-restricted NKT Cells in microbial immunity. *Infection and Immunity* 2003;71(10):5447–55.
2. Godfrey D.I. and Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004;114:1379–88.
3. Van Dommelen S.L.H., Degli-Esposti M. NKT cells and viral immunity. *Immunology and Cell Biology* 2004;82:332–41.
4. Borowski C. and Bendelac A. Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *JEM* 2005;201(6):833–6.
5. Latour S., Roncagalli R., Chen R. et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signaling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003;5:149–54.
6. Veillette A. and Latour S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:277–85.
7. Chung B., Aoukaty A., Dutz J. et al. Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 2005;174:3153–7.
8. Bezradica J.S., Hill T., Stanic A.K. et al. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+CD8+ stage of thymic ontogeny. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:5114–9.
9. Lodolce J.P., Boone D.L., Chai S. et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998;9:669–76.
10. Taniguchi M., Harada M., Kojo S. et al. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 2003;21:483–513.
11. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297–336.
12. Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625–36.
13. Lee P.T., Benlagha K., Teyton L. et al. Distinct functional lineages of human Va24 natural killer cells. *Jour Exp Med*

- 2002;195:637–41.
14. Haj M.E., Yaacov A.B., Lalazar G. et al. Potential role of NKT regulatory cell ligands for the treatment of immune mediated colitis. *WJG* 2007;28;13(44):5799–5804.
 15. Giabbai B., Sidobre S., Crispin M.D. et al. Crystal structure of mouse CD1d bound to the self ligand phosphatidylcholine: a molecular basis for NKT cell activation. *J Immunol* 2005;175:977–84.
 16. Kinjo Y., Wu D., Kim G. et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 2005;434:520–5.
 17. Mattner J., Debord K.L., Ismail N. et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005;434:525–9.
 18. Sriram V., Du W., Gervay-Hague J. et al. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol* 2005;35:1692–701.
 19. Wu D., Xing G.W., Poles M.A. et al. Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1351–6.
 20. Behar S.M., Cardell S. Diverse CD1d-restricted T cells: diverse phenotypes and diverse functions. *Semin Immunol* 2000;12:551–60.
 21. Park S.H., Weiss A., Benlagha K. et al. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* 2001;193:893–904.
 22. Chiu Y.H., Jayawardena J., Weiss A. et al. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* 1999;189:103–10.
 23. Lin H., Nieda M., Rozenkov V. et al. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells. *Exp Hematol* 2006;43:289–95.
 24. Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001;413:531–4.
 25. Gonzalez-Aseguinolaza G., Van Kaer L., Bergmann C.C. Natural killer T cell ligand α -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* 2002;195:617–24.
 26. Moody D.B., Ulchirs T., Muchlecker W. et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000;404:884–8.
 27. Brigl M., Bry L., Kent S.C. et al. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003;4:1230–7.
 28. Fischer K., Scotet E., Niemeyer M. et al. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10685–90.
 29. Carnaud C., Lee D., Donnars O. et al. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163:4647–50.
 30. Baron J.L., Gardiner L., Nishimura S. et al. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002;16:583–94.
 31. Godfrey D.I., Berzins S.P. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:505–18.
 32. Gombert J.M., Herbelin A., Tancrede-Bohin E. et al. Early quantitative and functional deficiency of NK1+ -like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 1996;26:2989–98.
 33. Araki M., Kondo T., Gumperz J.E. et al. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 2003;15:279–88.
 34. Akbari O., Faul J.L., Hoyte E.G. et al. CD4+ invariant T-cell-receptor+natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1117–29.
 35. Jahng A., Maricic I., Aguilera C. et al. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 2004;199:947–57.
 36. Hayakawa Y., Rovero S., Forni G. et al. Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9464–9.
 37. Smyth M.J., Godfrey D.I. NKT cells and tumor immunity – a double-edged sword. *Nat Immunol* 2000;1:459–60.
 38. Berzofsky J.A., Terabe M. NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *J Immunol* 2008;180:3627–35.
 39. Cui J., Shin T., Kawano T. et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997;278:1623–8.
 40. Street S.E., Cretney E., Smyth M.J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth and metastasis. *Blood* 2001;97:192–7.
 41. Metelitsa L.S., Naidenko O.V., Kant A. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* 2001;167:3114–22.
 42. Terabe M. and Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2009;101:277–348.
 43. Seino K., Motohashi S., Fujisawa T. et al. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci* 2006;97:807–12.
 44. Tahir S.M., Cheng O., Shaulov A. et al. Loss of IFN- γ production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001;167:4046–50.
 45. Terabe M., Matsui S., Noben-Trauth N. et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature Immunology* 2000;66:3869–75.
 46. Terabe M., Swann J., Ambrosino E. et al. Anonclassicalnon-Valpha18CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 2005;202:1627–33.
 47. Montoya C.J., Jie H.B., Al-Harhi L. et al. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:1028–39.
 48. Azuma T., Takahashi T., Kunisato A. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63:4516–20.
 49. Hedge S., Chen X., Keaton J.M. et al. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J Leukoc Biol* 2007;81:1224–35.
 50. Salio M., Speak A.O., Shepherd D. et al. Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20490–5.
 51. Chang D.H., Osman K., Connolly J. et al. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med* 2005;201:1503–17.
 52. Okai M., Nieda M., Tazbirkova A. et al. Human peripheral blood Valpha24+ Vbeta11+ NKT cells expand following administration of alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Vox Sang* 2002;83:250–3.
 53. Ishikawa E., Motohashi S., Ishikawa A. et al. Dendritic cell maturation by CD11c-T cells and Valpha24+natural killer T-cell activation by alpha-galactosylceramide. *Int J Cancer* 2005;117:265–73.
 54. Motohashi S., Ishikawa A., Ishikawa E. et al. Immunostimulatory and antitumor activities of monoglycosylceramides having various sugar moieties. *Biol Pharm Bull* 2006;12:6079–86.
 55. Skinnider B.F., Kapp U., Mak T.W. The role of interleukine 13 in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1203–10.
 56. Trieu Y., Wen X.Y., Skinneder B.F. et al. Soluble interleukin-13Ralpha2 decoy receptor inhibits Hodgkins lymphoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2004;64:3271–5.
 57. Morris J.C., Shapiro G.I., Tan A.R. et al. Phase I/II study of GC1008: a human anti-transforming growth factor-beta (TGFB) monoclonal antibody (MAb) in patients with advanced malignant melanoma (MM) or renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol* 2008;26:489.

ВСТУПЛЕНИЕ / PREFACE



Уважаемые дамы и господа Онкогематологи!

Благодаря гостеприимству журнала, который вы держите в руках, вы сможете принять участие в увлекательнейшем путешествии по молекулярному миру клетки крови. Сегодня еще только накапливаются знания о человеческой клетке и о процессах, происходящих в ней, но к чести гематологии надо сказать, что она продвинулась в молекулярных знаниях о своем объекте дальше, чем другие области медицины.

Сколько раз в клинических статьях вам попадались магические заклинания: «ПЦР», «секвенирование» или «ингибирующая (или активирующая) мутация», «потеря гетерозиготности», «изменение паттерна метилирования» и «мутаторный фенотип»? И сколько раз вам казалось, что «эти молекулярные биологи» попросту пытаются вас «на кривой козе объехать»?

Для того чтобы разрушить эту недостойную иллюзию и дать рациональное описание странным терминам, и задумано наше путешествие. Оно не будет скучным – это скорее энергичная прогулка: вначале вы увидите некоторые мистические процессы, интегрирующие клетку в многоклеточный организм, а потом познакомитесь со злокозненными мутациями, шаг за шагом норовящими превратить добротную соматическую клетку в раковую. По ходу повествования, безусловно, будут упомянуты и волшебные лекарства, которые именуется «таргетными».

Конечно, это путешествие будет слишком быстрым, чтобы ответить на ВСЕ вопросы. Да это и не является его целью. Это ведь только приглашение к разговору.

Итак, уважаемые Онкогематологи, занимайте ваши места, мы начинаем!

Заведующая лабораторией молекулярной биологии
ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии Росздрава

В.О. Бобрынина

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕЙКОЗОГЕНЕЗА

Лекция № 1

Д.А. Домнинский

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

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

MOLECULAR MECHANISMS OF LEUKEMOGENESIS

D.A. Domninskiy

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

Журнал начинает публиковать цикл лекций для врачей, который посвящен молекулярным механизмам лейкозогенеза. Современная медицина находится на пороге появления большого количества лекарственных препаратов нового поколения, активность которых направлена на модулирование (активацию или подавление) функций определенных молекул-мишеней, которые участвуют в процессах лейкозогенеза. Такими мишенями могут быть ферменты, белки с другими (не ферментативными) функциями, геномная ДНК, мРНК или, например, определенные липидные компоненты клеточных мембран. Можно ожидать, что такая целенаправленная (таргетная) терапия существенно улучшит результаты лечения гематологических опухолей. Однако ее применение внесет кардинальные изменения в работу врача-онколога. Это связано с тем, что быстро совершенствующиеся методы молекулярной диагностики позволят в ближайшее время выявлять у пациентов не только специфичные для данного типа опухоли (рекуррентные) генетические aberrации, а целый спектр геномных нарушений. А так как эволюция каждой конкретной опухоли протекает по «индивидуальной» программе, то высока вероятность того, что комбинация различных aberrаций в лейкозных клетках тоже будет иметь индивидуальный (пациент-специфичный) характер. Если при этом у врача «под рукой» будет целый набор таргетных препаратов, то это потребует от него умения самостоятельно составлять индивидуальный курс терапии для каждого пациента. Поэтому врач-гематолог должен разбираться в клеточных процессах, действие которых он собирается модулировать с помощью подобных препаратов. Например, знать, какие из них можно и нужно применять совместно, а для каких препаратов совместное применение бессмысленно или даже вредно.

В небольшом цикле лекций невозможно рассмотреть важнейшие вопросы молекулярной биологии и генетики, но автор и не ставит перед собой такую задачу. Значительно важнее научить врача понимать ключевые механизмы взаимодействий между различными клеточными молекулами и то, как эти взаимодействия нарушаются в присутствии онкоген-

ных белков. Опухолеродных молекул-мишеней много, а количество механизмов, с помощью которых они реализуют свой патологический потенциал, не так велико. Поэтому в первых лекциях будут рассмотрены основные молекулярные механизмы, нарушение функционирования которых чаще всего приводит к развитию лейкоза. В последующих лекциях будут описаны основные генетические aberrации, характерные для гематологических опухолей миелоидного и лимфоидного происхождения, а также таргетные препараты, применяемые в терапии этих заболеваний.

Сегодня существует большое количество литературы по обсуждаемым вопросам, мы будем давать ссылки на опубликованные обзоры, отдавая предпочтение работам, которые находятся в открытом доступе в Интернете. В качестве «базового» источника используется вышедший 3 года назад цикл лекций Е.Б. Владимирской «Механизмы кроветворения и лейкомогенеза» [1], поэтому вопросы, которые подробно освещены в этой работе, здесь рассматриваться не будут. Так как многие ссылки будут даваться на англоязычную литературу, то в этом цикле лекций будут использоваться широко применяемые международные наименования белков и генов, а также будут приводиться английские названия основных терминов, расшифровываться аббревиатуры и объясняться (где это нужно и возможно) происхождения названий. В качестве введения в этимологию названий генов можно рассматривать материал, приведенный в Приложении 1.

Общие признаки опухолевого фенотипа

Ключевые признаки опухолевой клетки и основные молекулярные процессы, нарушение которых лежит в основе проявления этих признаков, впервые были четко сформулированы Дугласом Ханахэном и Робертом Вайнбергом в 2000 г. [2]. Огромное разнообразие генотипов раковых клеток авторы объясняют проявлением 6 основных изменений в физиологии клетки, так называемых приобретенных способностей (acquired capabilities). Основными приобретенными способностями являются: независимость от сигналов роста и нечувствительность к ингибиторам роста



Приложение 1. О названиях и аббревиатурах генов и кодируемых ими белков

Из-за большого количества открытых и вновь открываемых генов до сих пор не принято единой системы их номенклатуры. Часто один ген имеет сразу несколько названий из-за параллельного открытия в нескольких лабораториях. Иногда название уточняется, и приоритет отдается первооткрывателю гомолога этого гена. Например, хорошо известный гематологам по своему онкогенному потенциалу ген **AML1** (acute myeloid leukemia 1) имеет и другое название – **CBFA2** (core binding factor A2), которое объясняется тем, что кодируемый этим геном фактор транскрипции связывается с так называемым кор-промотором своих генов-мишеней (см. Приложение 2). В последние годы эти названия вытесняются «историческим» именем – **RUNX1** (runt-related transcription factor 1), поскольку этот ген человека имеет гомологию с геном **runt** дрозофилы, мутации которого приводили к нарушению эмбриогенеза и эффекту «карликовости» у мух.

Многие жизненно важные гены (вернее, гомологи этих генов) были очень давно открыты генетиками на их любимом объекте (дрозофиле). Названия этим генам часто давались по различным дефектам у мух, которые проявлялись при мутациях в этих генах. Например, для семейств генов **Bithorax**, **Trithorax** и **Polycomb** свойственны специфичные дефекты в сегментации и дорзально-вентральной закладке имагинальных дисков у личинок мух. Мутации в генах, кодирующих клеточные рецепторы **Hedgehog**, вызывали у личинок мух образование выростов, похожих на иголки ежа, а название семейства генов **Wnt** является комбинацией из **Wg** (wingless, бескрылость у мух) и **int** (у мышей в локус одного из генов этого семейства интегрирует вирус рака молочной железы).

Многие онкогены были открыты при изучении высокоонкогенных штаммов ретровирусов. Вирусы «захватывали» протоонкогены из ДНК хозяина и включали их в свой геном, что нашло отражение в названии этих генов. Например, гены **SRC** (sarcoma, онкоген вируса саркомы Пауса), **RAS** (rat sarcoma virus), **MYC** (avian myelocytomatosis virus), **KIT** (kit – котенок, онкоген вируса саркомы кошек). Кроме того, в названии генов может присутствовать упоминание об их гомологии с вирусными онкогенами, например, **FLT3** (FMS-like tyrosine kinase 3, где **FMS** – McDonough feline sarcoma virus), или указание на то, что в область данного гена часто интегрируется какой-либо вирус, например, **EV1** (ecotropic viral integration site 1). Некоторые онкогены, выявленные в составе ретровирусов, получили название от штамма вируса, носящего имя своего первооткрывателя, например **ABL** (Abelson murine leukemia virus), 2 члена RAS-семейства – **K-RAS** и **H-RAS** (Kirsten и Harvey штаммы вируса саркомы мышей), или тот же **SM-FeSV** – вирус саркомы кошек (Susan McDonough).

Факторы транскрипции классифицируют по наличию в них различных функциональных белковых участков (мотивов или доменов). Например, «цинковые пальцы» (zinc finger) или «гомеодомены» (homeodomain или homeobox), обозначение которых может входить в название гена (белка). Например, один из важнейших факторов регуляции раннего гемопоэза **IKZF1** (Ikars family zinc finger 1), который часто называют просто **Икар** (Ikaros). Интересно, что другим членам IKZF-семейства краткие наименования тоже дали в честь персонажей древнегреческих мифов – Эол (Aiolos), Гелий (Helios) и т. п. В честь мифического острова, обитатели которого не старели, был назван фактор регуляции эмбриональных стволовых клеток **Nanog**.

Такой необычный подход к названию генов можно встретить довольно часто. Например, названия членам Hedgehog-семейства (**Hh**) давали просто в честь различных видов ежей – «индийский еж», «ушастый (пустынный) еж» и т. п., но так как видов ежей было меньше, чем видов Hh-рецепторов, то скоро перешли на сказочных персонажей. Например, самый известный **Hh**-ген человека получил название в честь «героя» компьютерной игры – **sonic Hh**.

клетки, уклонение от процесса запрограммированной смерти клетки (апоптоза), безграничный репликационный потенциал (иммортализация, бессмертие клеток), поддержка регенерации тканей (ангиогенез), способность к тканевому проникновению (инвазия) и отсутствию тканевой видоспецифичности (метастазирование). В последующие годы список приобретенных способностей опухолей неоднократно уточнялся и дополнялся [3–6]. К наиболее важным дополнениям можно отнести блокировку клеточной дифференцировки и генетическую нестабильность. Генетическая нестабильность является движущей силой постоянных изменений в геноме опухолевых клеток. Такая нестабильность приводит к генерации большого числа генетически неоднородных субклонов клеток опухоли, способных к селективному преодолению (генетическая пластичность) различных барьеров в организме, в том числе и привнесенных терапевтическими процедурами. Различные стрессовые состояния, возникающие в клетках опухоли под влиянием враждебной окружающей среды, помогают им приобретать новые способности. Например, использование гликолиза при метаболическом стрессе позволяет опухолевым клеткам адаптироваться к гипоксии и при этом закислять свое микроокружение, что, в свою очередь, позволяет им уклоняться от иммунного надзора. А повышенная концентрация реактивных форм кислорода при окислительном стрессе приводит к увеличению уровня повреждений ДНК, что становится причиной появления новых генетических aberrаций.

Все опухоли в процессе своей эволюции приобретают набор перечисленных выше способностей, однако последовательность их появления и молекулярные механизмы, лежащие в их основе, сильно варьируют. Поэтому каждая опухоль, по сути, является индивидуальным, пациент-специфичным образованием. Существование сравнительно небольшого набора молекулярно-физиологических изменений, которые приводят к неопластической трансформации, указывает на то, что все клетки организма имеют схожие молекулярные «машины», регулирующие их пролиферацию, дифференцировку и смерть. Гены, контролирующие эти процессы можно условно разделить на 2 группы: 1) доминантные онкогены (позитивные регуляторы роста), которые возникают из нормальных генов клетки (протоонкогенов) в результате их неконтролируемой активации; 2) рецессивные гены-супрессоры опухоли (негативные регуляторы роста), которые, как правило, являются ингибиторами протоонкогенов. Активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров приводит к одинаковым, по своей сути, опухолеродным эффектам.

Важно отметить, что комплекс генетических изменений, приводящий к появлению у раковых клеток полного спектра приобретенных способностей, характерен в основном для солидных опухолей (которые претерпевают довольно длительный первичный этап эволюции), в меньшей степени это относится к лимфомам и лейкозам на последних стадиях развития.

С генетической точки зрения лейкозы на стадии манифестации являются довольно «простыми» опухолями, для их инициации и развития иногда достаточно приобретения небольшого числа новых способностей. Вероятно, это связано с тем, что в клетках крови заложена природная программа автономного существования. По сравнению со строго структурированными тканями, регуляция поведения клеток крови соседними клетками (стромальными клетками костного мозга или «проплывающими мимо» другими клетками крови) более ограничена. Такая регуляция присуща нормальным клеткам крови в основном для реализации программ пролиферации, дифференцировки и выполнения определенных функций. Лейкозные клетки избегают такой регуляции, так как процесс лейкозогенеза начинается с генетических aberrаций, которые позволяют им стать независимыми от внешних пролиферативных сигналов.

Кроме того, лимфоидные клетки обладают способностью покидать костный мозг и целенаправленно мигрировать (хоуминг) по кровотоку в периферические кроветворные органы, где они претерпевают окончательную дифференцировку. Реализация такой программы поведения позволяет лейкозным клеткам свободно проникать в кровоток. А отсутствие недостатка питания приводит к экспансии первичной популяции лейкозных клеток, что, в свою очередь, позволяет диагностировать (бластоз), выделять и изучать лейкозные клетки на ранних стадиях эволюции опухоли. То есть в случае лейкозов имеется возможность выявлять в опухолевых клетках первичные, инициирующие лейкозогенез, геномные aberrации.

Эти геномные aberrации условно можно разделить на 2 группы. К I классу относятся мутации, повышающие пролиферативный потенциал клеток и их выживаемость (устойчивость к сигналам, индуцирующим апоптоз), а ко II классу – мутации, приводящие к блокировке дифференцировки и аномальному уровню самоподдержания клеток. Так называемая двухшаговая модель (two hits) лейкозогенеза подразумевает, что в лейкозных клетках присутствует как минимум одна мутация из каждой такой группы (так называемых групп комплементации), и эти мутации взаимно дополняют онкогенный потенциал [7] (рис. 1).

Действительно, детальный анализ генома больных острыми лейкозами выявляет небольшое число генетических aberrаций, например, у детей с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) в геноме присутствует в среднем 2,4 онкогенных мутаций, для острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) этот показатель несколько выше – 6,5 [8]. Однако такие цифры не идут ни в какое сравнение с клетками солидных опухолей, в геноме которых выявляются десятки, и даже тысячи генетических аномалий. Гематологические опухоли становятся генетически гетерогенными на поздних этапах своей эволюции, когда они пред-

ставляют собой множество различных клеточных

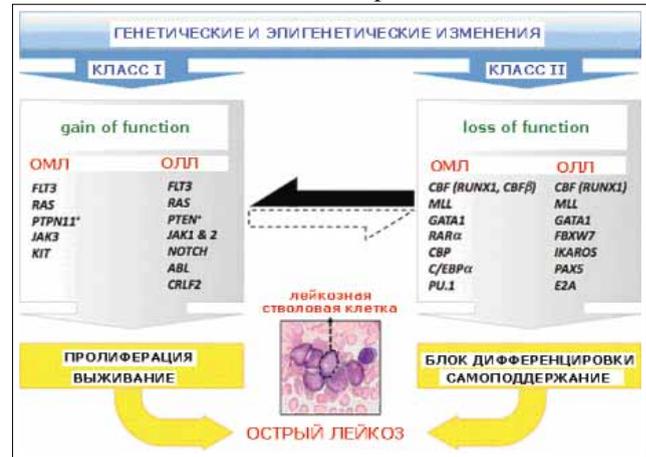


Рис. 1. Генетические aberrации при острых лейкозах
 Мутации I класса активируют процессы пролиферации и выживаемости клеток. Эти мутации обычно активируют (gain of function) околочелювные компоненты путей сигнальной трансдукции (рецепторы и медиаторы). Мутации II класса приводят к блоку дифференцировки и аномальному клеточному самоподдержанию. Эти мутации, как правило, инактивируют частично или полностью (loss of function) белки комплексов активации транскрипции (см. Приложения 3–4). Подробнее эта схема будет разобрана в лекциях, посвященных молекулярным aberrациям при лейкозах человека. Рисунок адаптирован из статьи [9]

субклонов, несущих целый спектр дополнительных геномных изменений. Нельзя исключать возможность того, что движущей силой такой эволюции лейкозов могут быть и лечебные процедуры, которые по своей сути являются селективными средами для отбора наиболее устойчивых к терапии и склонных к рецидиву субклонов популяции опухолевых клеток.

Механизмы коммитирования кроветворных клеток

Общие вопросы кроветворения не будут рассмотрены, тем более что они недавно были подробно освещены [1, 10]. Несмотря на колоссальный прогресс в установлении различных внеклеточных факторов и сигнальных клеточных путей, которые участвуют в определении судьбы кроветворных стволовых клеток (HSCs, hematopoietic stem cells) и клеток-предшественников различного происхождения, пока не удастся составить «более или менее ясную картину оркестровки генов в ходе кроветворных дифференцировок» [10]. Этот вопрос действительно сложный и спорный, так как помимо хорошо известных свойств соматических стволовых клеток, таких как самоподдержание и способность к дифференцировке (коммитированность), в последнее 10-летие для многих типов взрослых стволовых клеток выявлена, но до сих пор строго не доказана, способность к дифференцировке в клетки других тканей (пластичность стволовых клеток) [11].

Долгое время господствовали представления о том, что судьба и поведение HSCs и кроветворных клеток-предшественников определяются в основном внеклеточными сигналами (цитокины, хемокины, факторы роста и т. п.), которые эти клетки получа-

ют из своего микроокружения (от стромальных или других кроветворных клеток). Однако сегодня становится понятно, что эти клетки обладают определенным уровнем *liberum arbitrium* (свобода воли), и достаточно случайные внутриклеточные события могут в корне изменить судьбу клетки. Действительно, так ли уж клетка (и не только стволовая) зависит от внешних сигналов, с помощью которых организм контролирует многочисленные популяции клеток, из которых он состоит? Или все-таки клетки в некоторых случаях сами могут определять свою судьбу? Рассмотрим эти вопросы на примере дифференцировки кроветворной клетки-предшественницы по эритроидному или миелоидному пути [12, 13].

Общая миелоидная клетка-предшественник (CMP, **common myeloid progenitor**) может дифференцироваться в 2 типа клеток-предшественников: мегакариоцитарно-эритроидного (MEP, **megakaryocyte erythrocyte precursor**) и гранулоцитарно-макрофагального (GMP, **granulocyte macrophage precursor**) происхождения. Оказалось, что процесс выбора между этими двумя типами дифференцировки контролируется всего двумя факторами активации транскрипции (см. Приложения 2 и 3): **GATA1** (**GATA-binding protein 1**), определяющим MEP-путь дифференцировки, и **PU.1**, экспрессия которого приводит к реализации GMP-пути развития. Как видно из названия, GATA1 связывается с GATA-последовательностью ДНК (сайт связывания) в промоторной области своих генов-мишеней. Название фак-

тора **PU.1** обусловлено присутствием пуринов (**purine**, например, **GGAA**) в его сайте связывания. Ген **PU.1** имеет и другое название – **Spi1** (**SFFV proviral integration site 1**), поскольку он является местом интеграции высокоонкогенного провируса **F-SFFV** (**Friend spleen focus-forming virus**, вирус открыт Шарлотой Френд), вызывающего эритролейкоз у мышей. Интересно отметить, что F-SFFV индуцирует эритролейкоз у мышей с помощью двойного механизма. С одной стороны в результате интеграции провируса разрушается ген **PU.1** и прекращается экспрессия белка **PU.1**, а с другой стороны, один из белков вируса является структурным «миметиком» эритропоэтина (**Epo**), т. е. зараженная клетка становится эритропоэтин-независимой, она сама может возбуждать рецептор эритропоэтина и дифференцироваться в эритроидном направлении.

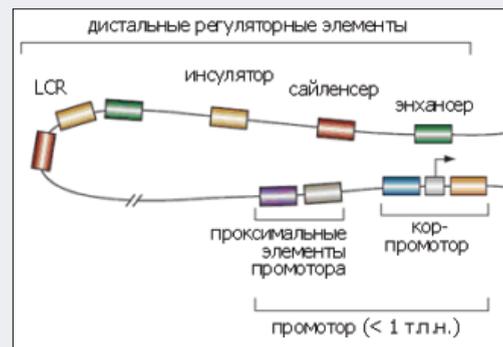
В CMP-клетках могут синтезироваться как **GATA1**, так и **PU.1**-факторы активации транскрипции, причем эти факторы являются антагонистами, каждый из них подавляет транскрипционную активность оппонента с помощью взаимодействий в промоторной области. Кроме того, эти факторы транскрипции могут прямо или опосредованно активировать свою собственную экспрессию (рис. 2). Таким образом, любая даже кратковременная флуктуация (случайное отклонение) концентрации (например, ее увеличение) одного из этих факторов в ядре приведет к лавинообразному росту концентрации этого фактора и к полному подавлению экспрессии его антагониста. В результате этого клетка начнет экспрессировать белки, которые кодируются



Приложение 2. Промоторы и другие регуляторные элементы генов [21]

В последовательности ДНК закодирована не только информация о белках, которая считается с ДНК в процессе транскрипции, но также и разнообразная информация, которая используется для регулировки активности генов. Такая регуляторная информация представляет собой набор коротких последовательностей ДНК (сайтов), которые «узнают» и с которыми взаимодействуют регуляторные белки – факторы транскрипции (**TF, transcription factors**), используемые для этого специфичные ДНК-связывающие участки (домены) – **DBD (DNA-binding domain)**. Набор сайтов для различных факторов транскрипции, который прилегает непосредственно к кодирующей белок последовательности ДНК, называется промотором. Промоторная область генов эукариот обычно имеет размер не более 1 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) и состоит из основного («кор») промотора (**core promoter**, в отечественной литературе иногда используется термин «минимальный промотор») и проксимальных промоторных элементов. Некоторые сайты кор-промотора являются общими для всех генов, например, «TATA-бок», который участвует в опосредованном (через **TFIID**) связывании РНК-полимеразы II с матрицей ДНК. Другие сайты присутствуют только в определенных группах генов, например, сайт связывания с активатором транскрипции **AML1** (другое название этого фактора – **CBFa, core binding factor alpha**) представляет собой **AACCGCA** последовательность ДНК, а сайт связывания с **CEBPa (CCAAT enhancer binding protein alpha)**, как следует из его названия, имеет **CCAAT**-последовательность.

Дистальные регуляторные элементы, могут располагаться на значительных расстояниях (до 1 млн п.н.) от промотора и подразделяются на группы на основании своей функции (в отечественной литературе применяются английские названия этих элементов). С энхансерами (**enhancer**) и сайленсерами (**silencer**) взаимодействуют факторы транскрипции, которые активируют и подавляют транскрипцию, соответственно. Инсуляторы («изоляторы») блокируют гены от воздействия на них элементов регуляции транскрипции соседних генов. Локус-контролирующая область (**LCR, locus control regions**) обычно состоит из нескольких регуляторных элементов, попеременное функционирование которых позволяет осуществлять временную экспрессию разных генов в генном кластере (расположенные рядом гены). Примером LCR являются локусы генов глобина, экспрессия которых последовательно меняется в процессе эмбрионального развития. Дистальные регуляторы могут связываться с белками кор-промотора или проксимального промотора в результате изгибания протяженных участков ДНК с образованием временных «петель». Такие петли образуются в результате того, что регуляторные белки связываются, с одной стороны, с различными регуляторными элементами ДНК, а с другой стороны, взаимодействуют друг с другом.



которых последовательно меняется в процессе эмбрионального развития. Дистальные регуляторы могут связываться с белками кор-промотора или проксимального промотора в результате изгибания протяженных участков ДНК с образованием временных «петель». Такие петли образуются в результате того, что регуляторные белки связываются, с одной стороны, с различными регуляторными элементами ДНК, а с другой стороны, взаимодействуют друг с другом.

Приложение 3. Белковые комплексы регуляции транскрипции [21, 22]

Белковые факторы, которые участвуют в регуляции транскрипции можно разделить на 3 группы. К 1-й группе относятся так называемые основные TFs (**GTFs**, **general TFs**), которые участвуют в активации транскрипции всех генов, кодирующих белки. Помимо РНК-полимеразы II, к GTFs относятся несколько общих TFs: TFIIA, TFIIB, TFIID (связывается с «TATA-боксом»), TFIIE, TFIIH и TFIIF. Все эти факторы собираются на кор-промоторе в форме упорядоченного комплекса инициации транскрипции (**PIC**, **preinitiation complex**), который осуществляет перемещение РНК-полимеразы II на сайт начала синтеза мРНК (**TSS**, **transcription start site**).

На первый взгляд, сборки PIC кажется достаточно для начала синтеза мРНК. Однако это не так. Для активной и эффективной (т. е. доходящей до конца, а не обрывающейся в самом начале) транскрипции необходимо участие целой группы других белковых факторов – активаторов и коактиваторов транскрипции. Активаторы и коактиваторы транскрипции не только стимулируют формирование PIC и участвуют в активации РНК-полимеразы II (с помощью фосфорилирования), но также реализуют модификацию хроматина, которая делает геномную ДНК более доступной для синтеза мРНК (см. Приложение 4).

Белки-регуляторы транскрипции имеют различные функциональные участки (домены). Кроме DBD, они имеют один или несколько доменов активации (**AD**, **activation domain**), которые необходимы не только для стимуляции транскрипции, но также и для взаимодействия с другими белками комплекса. Действительно, для того чтобы «собрать» такой огромный комплекс требуется привлечь (рекрутировать) в него большое число различных белков. Этот процесс осуществляется за счет существования в регуляторных белках одного или нескольких так называемых «стыковочных» участков (**docking site**), с помощью которых белки взаимодействуют друг с другом. Так как сродство активаторов транскрипции к «своим» сайтам на ДНК существенно выше, чем, например, сродство TFIID к последовательностям «TATA-боксов», то сборка транскрипционного комплекса и дальнейшие процессы ремоделирования хроматина обычно начинаются именно с присоединения активатора транскрипции к промотору. Связывание активатора транскрипции с ДНК (через DBD) приводит к последовательному рекрутированию и связыванию с ним большого числа других белков. Все эти сложные процессы сборки облегчаются за счет их координации белковыми комплексами «медиаторов», которые также участвуют в процессах конденсации (или деконденсации) хроматина и активации РНК-полимеразы II, используя для этой работы энергию гидролиза АТФ.

Точно также, через сборку комплексов репрессии, действуют факторы ингибирования транскрипции – репрессоры (связываются с сайленсерами) и корепрессоры. Наличие таких тонких белок–ДНК и белок–белковых взаимодействий, контролирующих активацию и репрессию генов в определенных онтогенетических условиях, лежит в основе предположения о возможном существовании уникального «транскрипционного кода», управляющего этими антагонистическими процессами.

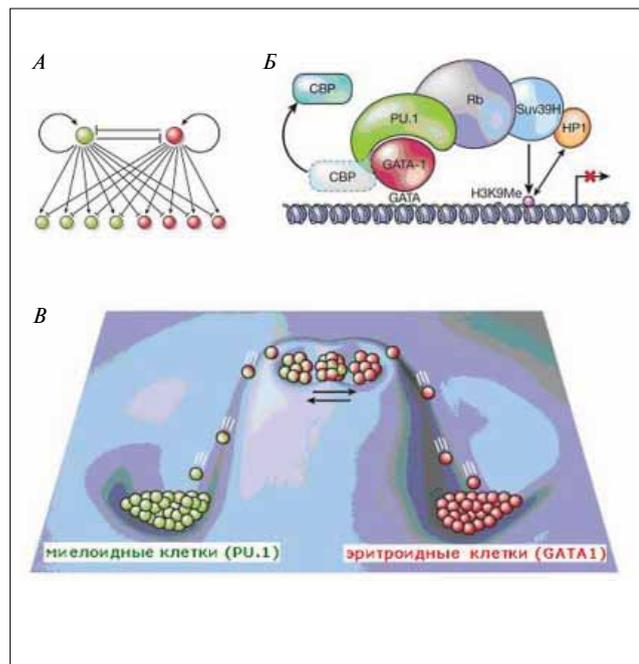
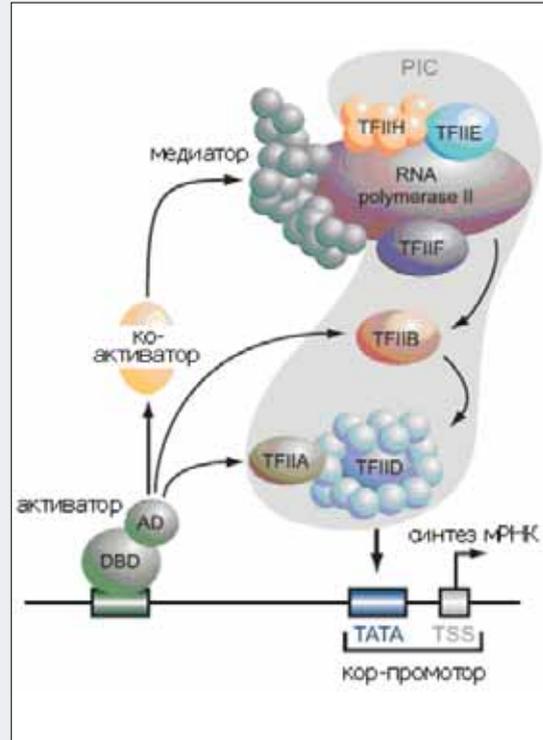


Рис. 2. Взаимный антагонизм факторов транскрипции PU.1 и GATA1

А. Схема, показывающая взаимный антагонизм факторов транскрипции PU.1 (зеленая сфера) и GATA1 (красная сфера). Факторы PU.1 и GATA1 подавляют экспрессию друг друга, а также авторегулируются. Кроме того, они оказывают позитивную или негативную регуляцию репертуара своих собственных генов-мишеней и генов-мишеней фактора-антагониста (мелкие зеленые и красные сферы) соответственно. Такое взаимодействие обеспечивает формирование «петли авторегуляции» (autoregulatory loop), которая стабилизирует выбор развития в случае доминирования одного из факторов.

Б. Схема механизма, лежащего в основе репрессии транскрипции GATA1 генов-мишеней фактором PU.1 (см. также Приложения 3–4). Фактор GATA1, связываясь с промоторами своих генов-мишеней, рекрутирует гистон ацетилазу **CBP** (CREB-binding protein), которая необходима для ремоделирования хроматина. Фактор PU.1 вытесняет CBP и, связываясь с GATA1, рекрутирует в транскрипционный комплекс репрессорные белки **Rb** (retinoblastoma) и **Suv39H** (suppressor of variegation 3-9 homolog 1). Suv39H является гистон-метилтрансферазой, которая осуществляет метилирование лизина 9 в гистоне H3 (H3K9Me). H3K9Me, в свою очередь, является «стыковочным» сайтом для белка **HP1** (heterochromatin protein 1), связывание которого с нуклеосомой вызывает репрессию гена-мишени.

В. Схема, показывающая популяцию СМР-клеток (сферы, окрашенные двумя цветами), экспрессирующих PU.1 и GATA1-факторы. Эти клетки-предшественники колеблются между разными состояниями, которые определяются относительным количеством PU.1 и GATA1-факторов. При спонтанном или индуцированном коммитировании они перемещаются из верхнего «резервуара» (где еще сохраняется возможность «выбора») в нижние «резервуары» (где «выбора» уже нет). Зеленые сферы – моноцитарные клетки, экспрессирующие высокий уровень PU.1; красные сферы – эритроидные клетки, экспрессирующие высокий уровень GATA1. Рисунок адаптирован из статьи [13].

генами-мишенями для «победившего» фактора активации транскрипции. Это могут быть белки, которые формируют и поддерживают нужный клеточный фенотип, например, белок рецептора эритропоэтина (ЕроR) в случае «успеха» GATA1-фактора. Активная экспрессия ЕроR приведет к увеличению его концентрации на клеточной мембране, что делает клетку более чувствительной к Еро и ведет к активации путей сигнальной трансдукции, связанных с этим рецептором. При этом одним из генов-мишеней ЕроR-пути сигнальной трансдукции является ген *GATA1*. То есть в данном случае формируется так называемая позитивная «петля обратной связи» (feedback loop), в которой каждый ее компонент активирует своего партнера, результатом чего является быстрая ответная реакция клетки (в данном случае — вступление клетки в эритроидную дифференцировку). Следует обратить внимание на тот факт, что в описанной выше регуляторной «петле» один ее компонент (ЕроR) зависит от внешних (инструктивных) сигналов, а второй

компонент (GATA1) является источником внутренних (стохастических) сигналов. Вероятно, большинство клеточных процессов регулируется именно таким способом — тонкой «настройкой», сочетающей внешние и внутренние стимулы.

Описанный выше дуализм выбора дальнейшей судьбы клеткой-предшественницей, основанный на своеобразном «соревновании» пар факторов-антагонистов, выявлен еще для многих участков разветвления «дерева» гемопоэза, а также для ряда узловых точек дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [13, 14]. Такой дуализм осуществляется на эпигенетическом уровне, т. е. на уровне активации-репрессии транскрипции, и любые факторы, участвующие в эпигенетическом контроле, могут влиять на выбор клеткой своей судьбы. Например, на выбор клетки может влиять соотношение уровней активности репрессивных и активирующих транскрипцию комплексов Поликомб и Триторакс [15] (см. Приложение 4).

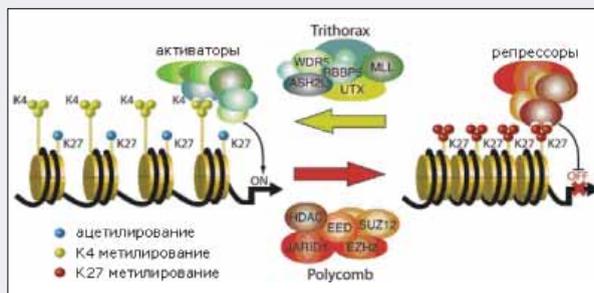
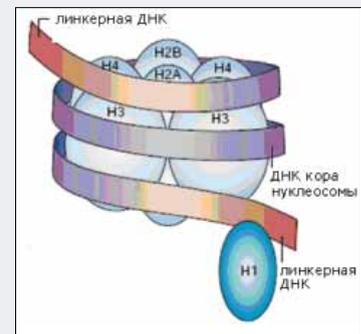


Приложение 4. Структура хроматина и «гистоновый код» [23, 24]

Длина ДНК всех хромосом клетки человека равна примерно 2 метрам. Для того чтобы она уместилась в клеточном ядре (размер ядра ~10 мкм), ее необходимо каким-то образом сконденсировать в более компактную структуру (хроматин). Существует несколько степеней конденсации хроматина — от нуклеосома до хромосомы.

Нуклеосома — основная единица хроматина, состоит из участка ДНК длиной ~200 п.н., который намотан в 2 оборота на белковый октамер, состоящих из димеров основных гистонов нуклеосома — H2A, H2B, H3 и H4. Так как гистоны имеют положительный заряд, а ДНК заряжена отрицательно, то нуклеосома представляет собой очень стабильные комплексы. Поэтому даже уже собранный РИС можно сравнить с паровозом, который стоит под парами на рельсах, но ехать не может, так как пути перед ним забаррикадированы.

Процесс «открывания» хроматина (белками комплекса активации транскрипции) или его «закрывания» (белками комплекса репрессии транскрипции) носит название «ремоделирование хроматина». Ремоделирование хроматина заключается во внесении в аминокислотные остатки «хвостов» гистонов (короткие концевые пептидные участки, лежащие на поверхности глобулярного белка) различных модификаций. Например, гистон ацетилаза (**HAT, histone acetylase**) могут ацетилировать (Ac) 9-й или 14-й остатки лизина (K) в гистоне H3 (H3K9ac или H3K14ac). Ацетильная группа заряжена отрицательно, поэтому ацетилирование приводит к ослаблению связи гистонов с ДНК, к «разрыхлению» структуры хроматина («открыванию» ДНК), что позволяет осуществить транскрипцию. Кроме ацетильных меток остатки аминокислот гистонов могут метилироваться (Me) гистон-метилтрансферазами (**HMT, histone methyltransferase**), например, метилтрансферазной активностью обладает белок **MLL (mixed lineage leukaemia)**, хорошо известный гематологам по своему лейкозогенному потенциалу. Метильные группы, внесенные в гистоны, служат своеобразными метками, указывающими на состояние хроматина (активный — не активный). Эти метки (которые представляют собой «стыковочные» сайты) могут «узнаваться» белками комплекса транскрипции, что позволяет перемещать комплекс в нужном направлении (своеобразные указатели для нашего «паровоза»). Метильные группы распознаются специфическими белковыми «хромодоменами» (**chromodomain – chromatin organization modifier**), а ацетильные группы узнаются белками, имеющими «бромодомены» (bromodomain, название из рубрики «ученые шутят»: хром — бром).



Вариантов модификации гистонов существует достаточно много, и процесс установления «текста» гистонового кода еще продолжается. Можно лишь отметить, что метилирование 4-го и 36-го остатков лизинов гистона H3 (H3K4 и H3K36), например, считается важным маркером активации транскрипции. H3K9 и H3K27 являются маркерами репрессии транскрипции, а трижды метилированный 9-й лизин гистона H3 (H3K9me3) — признак конститутивного гетерохроматина (постоянно неактивной области генома). Метка H3K27me3 характерна для репрессорных комплексов семейства Поликомб (Polycomb), а метка H3K4me3 — для активирующих транскрипцию комплексов Триторакс-семейства (Trithorax) (см. Приложение 1).

Кроме белков, обладающих HAT- и HMT-активностями, транскрипционные комплексы содержат ферменты, которые могут убирать Ac- и Me-метки с гистонов: гистон деацетилазы (**HDAC, histone deacetylase**) и гистон деметилазы (**HDM, histone demethylases**) соответственно. Белки комплексов активации или репрессии транскрипции, участвующие в ремоделировании хроматина, обычно подразделяют на 2 группы — «писатели» (writers, которые вносят определенные метки в гистоны) и «читатели» (readers, которые узнают эти метки). Совокупность различных меток, являющихся сигналами, которые «читаются» сами по себе или в комбинации с другими модификациями на тех же самых или соседних гистонах, получила название «гистоновый код».

Приложение 5. РНК-интерференция [25–27]

Сегодня уже стало ясно, что РНК-интерференция (одно из значений слова *interference* – помеха, вмешательство) является важнейшим эпигенетическим механизмом регуляции активности генов. Суть его заключается в том, что небольшие молекулы РНК (размером в 19–25 нуклеотидов) могут или блокировать синтез белка на уровне транскрипции и трансляции, или просто разрушать мРНК. На сегодняшний день известно уже огромное количество таких РНК, многие из которых имеют прямое отношение к онкогенезу. Молекулы РНК, участвующие в процессе РНК-интерференции, по ряду признаков подразделяются на несколько классов. У человека наиболее часто выявляются так называемые короткие интерферирующие РНК (**siRNA**, *short interfering*) и микроРНК (**miRNA**, для удобства далее мы будем использовать термин **miРНК** для обоих типов РНК). Гены, кодирующие miРНК, могут располагаться как в межгенных участках ДНК (часто образуя кластеры генов), так и во внутригенных участках (интронах). Синтезированная с этих генов РНК претерпевает ряд модификаций (процессинг), осуществляемых ферментами, некоторые из которых имеют своеобразные названия. Например, фермент (РНКаза), который первым разрезает незрелую miРНК, называется «Дроша» (**Drosha** – на иврите это слово предшествует проповеди, типа, «Ну, с Богом!»), а белок, который работает с Drosha в комплексе (связывается и «закрывает» от гидролиза функциональные фрагменты РНК), получил созвучное имя «Паша» (**Pasha**). Еще одна разрезающая miРНК РНКаза получила имя **Dicer** (овощерезка), а семейство белков, формирующих финальный активный комплекс с miРНК, названо «аргонавтами» (**AGO**, *argonaute*).

Молекулы miРНК содержат комплементарные друг другу участки (палиндромы), поэтому образуют вторичную структуру в виде «шпильки». В ядре Drosha отрезает концевые участки исходной miРНК (**pri-miRNA**), не входящие в «шпильку», и образующаяся при этом **pre-miRNA** экспортируется транспортными белками (*exportin's*) в цитоплазму. Здесь РНКаза Dicer отрезает часть от **pre-miRNA**, при этом образуется короткий (19–25 н.) РНК-дуплекс (**miРНК-miРНК***), который вместе с Dicer и белком семейства AGO (также является РНКазой) образует РНК-зависимый комплекс репрессии (**RISC**, *RNA-induced silencing complex*). Одна из цепей РНК-дуплекса («пассажирская», miРНК*) расщепляется AGO и удаляется из комплекса вместе с Dicer. Получившийся активный комплекс, содержащий «рабочую» цепь (miРНК), атакует молекулы мРНК, синтезированные на гене-мишени данного вида miРНК. Связываясь с мРНК, комплекс RISC может действовать двумя способами: если структура miРНК полностью комплементарна участку связывания на мРНК, то AGO расщепляет мРНК, если же miРНК и мРНК не полностью соответствуют друг другу, то образующийся miРНК–мРНК-дуплекс просто блокирует синтез белка, препятствуя прохождению мРНК через рибосому.

Основные отличия miRNA от siRNA заключаются в том, что гены miRNA обычно имеют внутригенную локализацию, а гены siRNA располагаются в межгенных локусах. Кроме того, если miRNA репрессирует синтез белка, то молекулы siRNA вызывают деградацию мРНК. По своим опухолеродным свойствам гены miРНК могут быть как онкогенами (если они инактивируют гены-супрессоры), так и генами-супрессорами (если они инактивируют онкогены). Онкогенным потенциалом могут также обладать гены, которые кодируют ферменты, участвующие в процессинге miРНК.

Молекулы miРНК стали уникальным инструментом для молекулярно-клеточных исследований *in vitro* и *in vivo*, который позволяет относительно легко включать и выключать нужные гены. Для их применения достаточно только знать нуклеотидную последовательность генов, на которые вы собираетесь воздействовать. Эти же особенности применения miРНК, вероятно, позволят разработать на их основе новое поколение универсальных (по механизму действия и способу производства) лекарственных препаратов с идеальной специфичностью. Например, лекарств, которые будут нацелены только на мРНК, несущие патологические мутации, или на участки «стыковки» в химерных мРНК, возникающих в результате лейкозогенных хромосомных транслокаций. При этом такие miРНК не будут влиять на работу нормальных генов в здоровых и больных клетках.

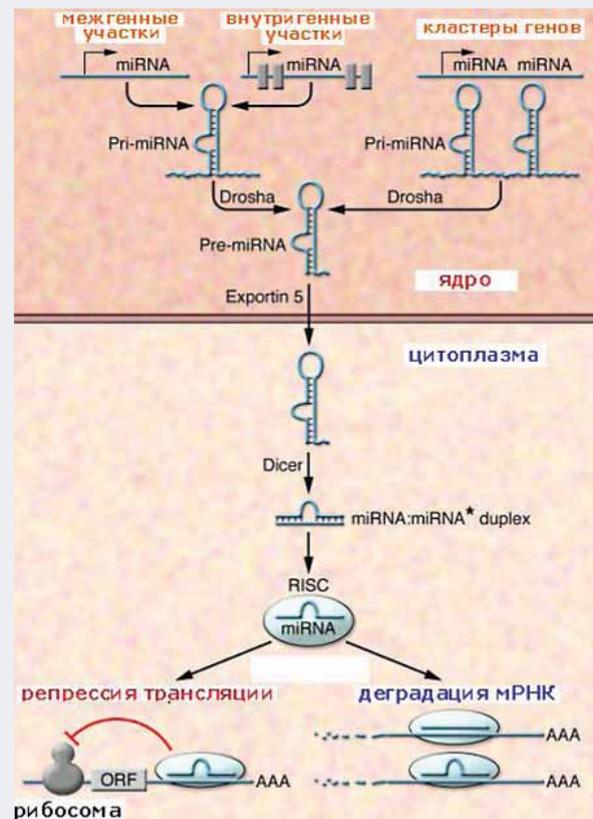
В эпигенетическом контроле дифференцировки кроветворных клеток также принимает участие большое число микроРНК различного типа (см. Приложение 5) [16].

Большие надежды в работах по перепрограммированию соматических стволовых клеток возлагаются на использование «коктейлей» из факторов активации транскрипции (подобных паре GATA1–PU.1) [17, 18]. Лейкозные стволовые клетки [19, 20], вероятно, также обладают способностью к перепрограммированию (репрограммированию, т. е. возвращению на более высо-

кий уровень потенции), так как они обладают способностью к самоподдержанию, близкой к уровню самоподдержания HSCs.

В этой лекции (в разделе «Механизмы коммитирования кроветворных клеток» и Приложениях 3–4) мы рассмотрели общие механизмы функционирования комплексов активации транскрипции, которые подвергаются нарушениям при мутациях II класса.

Следующая лекция будет посвящена функционированию основных путей сигнальной трансдукции, которые активируются при мутациях I класса.



Л и т е р а т у р а

1. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкемогенеза (цикл лекций). М.:Династия, 2007.
2. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
3. Копнин Б. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения. *Практическая онкология* 2002;3(4):229–35.
4. Colotta F., Allavena P., Sica A. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073–81.
5. Luo J., Solimini N., Elledge S. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;136(5):823–37.
6. Negrini S., Gorgoulis V., Halazonetis T. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):220–8.
7. Kelly L., Gilliland D. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2002;3:179–98.
8. Radtke I., Mullighan C., Ishii M. et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *PNAS* 2009;106(31):12944–9.
9. Stavropoulou V., Braut L., Schwaller J. Insights into molecular pathways for targeted therapeutics in acute leukaemia. *Swiss Med Wkly* 2010;140:1–8.
10. Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев А.И. Схема кроветворения. *Терапевтический архив* 2006;7:5–12.
11. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (проблема пластичности). *Вестник РАМН* 2005;10:37–44.
12. Burda P., Laslo P., Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 2010;24(7):1249–57.
13. Graf T., Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009;462:587–94.
14. Ceredig R., Rolink A., Brown G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 2009;9(4):293–300.
15. Orford K., Scadden D. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 2008;9:115–28.
16. Gangaraju V., Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:116–25.
17. MacArthur B., Maayan A., Lemischka I. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:672–81.
18. Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 2009;136:509–23.
19. Wang J., Dick J. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 2005;15:494–501.
20. Дризе Н.И. Различия между лейкозными и нормальными кроветворными стволовыми клетками. *Онкогематология* 2006;1–2:5–9.
21. Maston G., Evans S., Green M. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2006;7:29–59.
22. Fuda N., Ardehali B., Lis J. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. *Nature* 2009;461:186–92.
23. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2002;2:162–74.
24. Cloos P., Christensen J., Agger K. et al. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* 2008;22:1115–40.
25. Van Rooij E., Olson E. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007;117(9):2369–76.
26. Jinek M., Doudna J. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009;457:405–12.
27. Wang V. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs* 2009;23(1):15–23.

Сообщение о XXI Всемирном противораковом конгрессе

Д.Ю. Качанов

Российский государственный медицинский университет, Москва

XXI WORLD CANCER CONGRESS. 18-21 AUGUST 2010, SHENZHEN (CHINA)

D. Yu. Kachanov

Russian State Medical University, Moscow

С 18 по 21 августа 2010 г. под эгидой Всемирного союза по борьбе с раком (International Union Against Cancer, UICC) в Шеньчжэне (Китай) прошел XXI Всемирный противораковый конгресс (World Cancer Congress). UICC является крупнейшей в мире неправительственной организацией, созданной в 1933 г., основной целью которой является борьба с онкологическими заболеваниями. Эта цель выражается в девизе UICC – «В направлении глобального противоракового контроля» (Towards the global cancer control). Для достижения этой цели UICC координирует работу более 370 организаций в 118 странах мира. Всемирный противораковый конгресс проводится один раз в два года. Важным достижением прошлого конгресса, который проходил в Женеве (Швейцария) в августе 2008 г., явилась разработка Всемирной противораковой декларации (World Cancer Declaration). В ней сформулированы основные задачи, которые необходимо реализовать мировому сообществу к 2020 г. с целью улучшения противоракового контроля в глобальном мире. Эти цели включают в себя повсеместную доступность систем противоракового контроля; разработку эффективной системы учета и мониторинга злокачественных новообразований (ЗН); борьбу с табакокурением, употреблением алкоголя и ожирением; внедрение повсеместной вакцинации против гепатита В и вируса папилломы человека; противодействие распространению мифов, окружающих онкологические заболевания; внедрение программ ранней диагностики ЗН; повышение доступности медицинской помощи для онкологических больных; повсеместную доступность паллиативной помощи и качественного обезболивания; создание условий для продолженного медицинского образования медицинских работников; уменьшение эмиграции специалистов, занимающихся лечением онкологических больных; значительное улучшение выживаемости пациентов во всем мире.

Программа XXI конгресса в Шеньчжэне была разработана с учетом вышеперечисленных целей. Девиз конгресса звучал как «Профилактировать то, что можно профилактировать, лечить то, что можно вылечить и создать систему, позволяющую это осуществить» (Preventing the preventable, Treating the treatable, Systems

to make it happens). В работе конгресса приняли участие 3222 делегатов из 92 стран мира. В рамках конгресса было проведено 104 сессии.

В докладе Д. Формана (D. Forman), являющегося одним из разработчиков международного эпидемиологического проекта GLOBOCAN 2008, осуществленного Международным агентством по исследованию рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), были представлены данные о заболеваемости и смертности от ЗН в мире. По данным проекта в 2008 г. в мире заболело 12,7 млн человек, 7,6 млн погибло от ЗН, при этом 56% впервые зарегистрированных случаев заболевания и 63% смертей пришлось на развивающиеся страны. К сожалению, прогноз на ближайшие 20 лет остается неутешительным. Исследователи полагают, что в 2030 г. будет зарегистрировано уже более 21,4 млн случаев ЗН, при этом основной прирост заболеваемости придется на страны с низким уровнем жизни.

В докладе А. Ульриха (A. Ullrich) из Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было подчеркнуто, что разработка, внедрение и, главное, оценка результатов любых мероприятий, направленных на контроль ЗН в популяции, возможны только при наличии точных и достоверных данных, предоставляемых канцер-регистрами. Доступность данных по заболеваемости и смертности от ЗН является одной из целей Всемирной противораковой декларации. Обобщая раздел, посвященный эпидемиологии ЗН, директор IARC К. Уальд (C. Wild) подчеркнул, что канцер-регистры остаются ключевыми элементами системы популяционного противоракового контроля. Собираемые канцер-регистрами данные позволяют планировать мероприятия, направленные на уменьшение влияния ЗН на популяцию, генерировать этиологические гипотезы возникновения различных форм ЗН, улучшать понимание этиологии ЗН, предоставляя данные о пациентах и исходах их терапии для различных эпидемиологических исследований, оценивать внедрение отдельных элементов противоракового контроля.

Было отмечено, что необходимо рассматривать онкологические заболевания совместно с другими неинфекционными заболеваниями, такими как сахарный диабет, хронические заболевания легких и сердечно-сосудистые заболевания, поскольку все перечисленные

группы болезней имеют общие факторы риска (табакокурение, употребления алкоголя, низкая физическая активность, ожирение) и, следовательно, мероприятия по их профилактике также во многом сходны. Расчеты показывают, что 30–40% онкологических заболеваний могут быть профилактированы путем элиминации указанных выше факторов риска. С целью улучшения мероприятий по привлечению общественности и политических структур к проблеме неинфекционных заболеваний был создан Альянс неинфекционных заболеваний (Non-Communicable Disease Alliance), объединивший UICC, Международную федерацию диабета (International Diabetes Federation), Всемирную федерацию заболеваний сердца (World Heart Federation), Всемирный союз по борьбе с туберкулезом и заболеваниями легких (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease). Значительным достижением Альянса явилось то, что проблема неинфекционных заболеваний будет рассмотрена на саммите ООН, который состоится в сентябре 2011 г.

Борьба с табакокурением является неотъемлемым элементом противораковой борьбы. В нескольких докладах было убедительно продемонстрировано, как табачная индустрия противодействует принятию более жестких законов, регламентирующих употребление табака. Методы табачной индустрии включают спонсирование средств массовой информации и политических движений, лоббирование, корпоративные договоры и т. д. Была подчеркнута тесная связь производителей табака с правительственными организациями. В докладе М. Рауталаhti (M. Rautalahti) «Как маленькая Финляндия испугала большую табачную индустрию» было показано, как планомерно проводимая в этой стране работа по борьбе с курением привела к принятию в августе этого года беспрецедентного по жесткости закона, который, по мнению авторов, позволит к 2040 г. сделать Финляндию страной свободной от табака.

Во многих выступлениях прозвучала мысль о том, что необходимо сконцентрировать усилия мирового сообщества на борьбе с онкологическими заболеваниями в странах с низким и промежуточным уровнем доходов населения. Как уже отмечалось выше, основной рост заболеваемости отмечается в развивающихся странах, при этом многие компоненты системы противоопухолевого контроля, эффективно внедренные в развитых странах, остаются доступными только небольшой части населения. Это касается как лечебных мероприятий (лучевая терапия, паллиативная помощь), так и мероприятий, направленных на первичную и вторичную профилактику ЗН (вакцинация против вируса папилломы человека, скрининг рака шейки матки и т. д.). Было подчеркнуто, что доступность паллиативной помощи в развивающихся странах остается очень низкой. При этом две трети больных, получающих противоопухолевую терапию, страдают от болевого синдрома различной степени выраженности. Дж. Клери (J. Cleary) из Университета Висконсина (США) подчеркнул, что адекватное обезболивание с включением наркотических анальгетиков является одним из неотъемлемых прав человека. Он отметил, что

проблема обеспечения нуждающихся опиатами лежит не только в медицинской плоскости, но требует принятия политических решений.

Значимость проблемы паллиативной терапии подчеркивается тем фактом, что данному вопросу была посвящена единственная специализированная детская сессия на конгрессе. В докладах из 4 стран было подчеркнуто, что паллиативная помощь является обязательным элементом интегрального подхода к пациентам с жизнеугрожающими заболеваниями. При этом ее роль зачастую недооценивается не только организаторами здравоохранения, но и детскими врачами-онкологами. Одним из основных подходов для преодоления указанных противоречий служит обучение медицинского персонала принципам паллиативной медицины и расширение международного сотрудничества в указанной области. Первым шагом к объединению специалистов, занимающихся паллиативной терапией, явилось создание Международного сообщества специалистов, оказывающих такую помощь детям (International Children's Palliative Care Network, ICPCN).

Отдельная сессия была посвящена роли информационных технологий в мероприятиях системы противоракового контроля. Ю. Кинтана (Y. Quintana) из Детского исследовательского госпиталя Св. Иуды, Мемфис, США (St. Jude Children's Research Hospital) посвятил свой доклад сайту Cure4Kids, основной задачей которого является распространение знаний о новейших технологиях оказания медицинской помощи детям с онкологическими и другими жизнеугрожающими заболеваниями. Этот сайт, созданный в 2002 г., в настоящее время является крупнейшим в мире информационным порталом, посвященным детской онкологии и объединяет более 20 тыс. зарегистрированных пользователей в более чем 100 странах мира. Одним из разделов указанного интернет-портала является Oncopedia, в которой пользователи могут размещать и обсуждать интересные и сложные случаи онкологических заболеваний у детей. Также в докладах сессии были представлены и другие интернет-технологии, например, создание веб-портала, направленного на организацию международных клинических исследований, его разрабатывают в США в Национальном институте рака (National Cancer Institute, NCI), и создание информационного сайта для лиц, излеченных от ЗН в Торонто (Канада).

Все вышесказанное свидетельствует о том, что сегодня противораковый контроль стал одной из составных частей общественного здоровья и пренебрегать вопросами создания системы популяционного контроля в области организации специализированной службы просто преступно. В рамках работы созданного в РФ Национального общества детских гематологов и онкологов (НОДГО) вопросам создания популяционных регистров планируется уделить особое внимание. Конгресс в Шеньчжэне поддержал девиз нашего общества «Общие усилия во благо детей», который подчеркивает значимость усилий врачей и гражданского общества в деле лечения ЗН у детей.

Глубокоуважаемая редакция!

С неподдельным интересом прочел статью А.С. Рошик и соавторов «Коррекция гемостаза у детей с острым лимфобластным лейкозом». Статья читается как детектив, так как с каждым новым предложением и абзацем ее смысл становится все более и более загадочным.

Загадки начинаются сразу после совершенно логичных и хрестоматийных утверждений о том, что геморрагический синдром (ГС) и нарушения коагуляции являются частыми спутниками гемобластозов и их лечения, а для того, чтобы правильно лечить ГС (или предотвращать его) нужно знать его причину и патогенез развития. С этими утверждениями сложно поспорить, однако какой же путь предлагают авторы для выявления причины ГС и каким образом доказывают эффективность выбранного пути? К сожалению, до конца статьи это остается абсолютно непонятным, а выводы не совсем логично вытекают из проведенной работы.

После прочтения раздела «Материалы и методы» для меня так и осталось загадкой, что же послужило основой для выбора описываемых характеристик больных. Целую таблицу авторы посвятили возрасту и полу больных (правда, не включив в нее пациентов из контрольной группы), однако в дальнейшем (в результатах работы) влияние этих факторов на что-либо (нарушение гемостаза, ГС и эффективность его лечения и т. д.) даже не анализируется. Подробно описано, на каких приборах, и по каким методикам проводилось определение тех или иных показателей, однако нет ни слова о том, каковы были границы «принятия решения» об определении больного в ту или иную группу. Что понимали авторы под ДВС-синдромом и тромбофилией (каковы были их точные лабораторные и клинические показатели)? Считались ли ДВС и тромбофилией просто снижение или повышение одного показателя (пусть и на 1 единицу от нормы) или были установлены какие-то рамки? Что понимали авторы под «ДВС с явлениями дыхательной, почечной или печеночной недостаточности»: больных, у которых ДВС был вызван недостаточностью функции этих органов или больных, у которых ДВС вызвал эти виды органной недостаточности? Более того, совершенно непонятно, как удалось авторам «при исследовании системы гемостаза» выявить «явления дыхательной, печеночной и почечной недостаточности». Непонятным остается и то, были ли в исследовании больные, у которых ДВС был без «недостаточностей», а если были, то к какой группе их следует относить (к тем, кому рекомендуется свежемороженая плазма, или к тем, кому нужно обязательно назначать ви-

тамин К)? К сожалению, это далеко не праздные вопросы, так как на основании своей статьи авторы дают однозначные рекомендации по лечению (назначение СЗП или витамина К) и обследованию (определение уровня факторов свертывания и т. д.). С учетом небезопасности любого дополнительного медицинского вмешательства (в т. ч. и инфузий СЗП и викасола), а также ограниченности ресурсов лабораторий, хотелось бы понимать кому конкретно, в каких дозах, с какого момента, с какой периодичностью и как долго авторы проводили обследование и лечение (и, соответственно, рекомендуют проводить и нам). Предложенная авторами система «стадирования» ГС весьма интересна, однако хотелось бы знать, на основании чего она создана. Насколько нам известно, большинство систем стадирования изначально опираются на различия исходов (и/или различие подходов к лечению) у больных, отнесенных к различным стадиям. Например, I стадия заболевания имеет лучший прогноз, чем IV, и требует совершенно другого лечения. Аналогично этому работают и общепринятые шкалы токсичности, используемые в клинических исследованиях (например, шкала токсичности CTC/AE v.3) — чем больше степень токсичности, тем больше нарушается качество жизни пациента, тем больший риск она представляет и, соответственно, тем более агрессивных интервенций (или модификации лечения) требует. Проводили ли авторы исследования того, насколько ухудшается прогноз (выживаемость, потребность в пребывании в стационаре, жизнеугрожающие кровотечения и т. д.) у больных с единичными спонтанными петехиями, экхимозами и мелкими гематомами (2 балла согласно авторской классификации) по сравнению с больными, имеющими единичные петехии и экхимозы (1 балл)? И должно ли различаться лечение этих больных? В случае если подобных исследований не проводилось, то, боюсь, выбор снижения степени «тяжести» ГС по шкале, предложенной авторами, служит весьма сомнительной конечной целью лечения. Согласитесь, что и больному, и врачу не важно, сколько баллов было и сколько стало, если снижение балла не приводит к клинически значимым целям — снижению летальности, риска «больших» кровотечений, стоимости лечения и т. д. Правда, даже этой шкалой авторы пользуются весьма вольно. В результатах работы указано, что больные группы сравнения имели средний балл 2,1, что тут же описывается авторами как «кровотечения только на коже в виде небольшого количества экхимозов». Однако средний балл 2,1 подразумевает, что как минимум у 1 из этих боль-

ных имелось более 2 баллов по предложенной шкале, а это уже, как минимум, «множественные спонтанные петехии, экхимозы, гематомы, необильное носовое кровотечение». Правда, на фоне путаницы с названиями групп, эти нестыковки практически незаметны: весьма непросто докопаться до смысла написанного, когда 1-ю группу сравнивают с группой сравнения, 2-ю с основной, и, что самое увлекательное, контрольную группу сравнивают с группой сравнения. К сожалению, для меня так и остался непонятным замысел авторов, использовавших «вразнобой» 6 названий для 3 групп больных (к сожалению, авторы даже не потрудились хотя бы в одном месте указать, что соответствует 1-й, 2-й и 3-й группам — основная, контрольная или группа сравнения).

Как ни жаль, но результаты как раз напрямую вытекают из предыдущего раздела («Материалы и методы»). Все, что было «недосказано» при описании групп, путает и авторов, и читателя, не давая им выявить настоящие «причинно-следственные» связи. Например, авторы пишут о прекрасном результате инфузий СЗП у больных 1-й группы (она же, судя по всему, основная). В тексте говорится о купировании ГС на первые же сутки терапии. Можно только поздравить коллектив со столь эффективным лечением! Однако при взгляде на рис. 1 оказывается, что это утверждение, мягко говоря, не совсем корректно. Согласно графику до начала лечения (исходно) ГС имели 80% больных, на первые сутки — 60%, и даже через 6–8 суток — около 40%. Даже с учетом «заветного» $p < 0,05$ вряд ли это можно назвать купированием ГС в первые сутки лечения. Кроме того, возникает закономерный вопрос — если в основную группу включали пациентов, у которых ГС проявлялся «спонтанными петехиями и экхимозами, гематомами и кровотечениями из слизистых ЖКТ» (об этом написано несколькими абзацами выше графика), то почему, согласно графику, ГС у больных в основной группе исходно отмечался лишь в 80%? На основании чего тогда в основную группу были включены 20% больных, ГС не имевших. Более того, развивая описание проводимого лечения (правда, почему-то в разделе «Результаты»), авторы упоминают о том, что ряду больных одновременно с назначением СЗП проводили и инфузии донорских тромбоцитов. Согласитесь, что после этого становится совсем непонятно — благодаря чему уменьшилось число больных с ГС (благодаря СЗП или тромбоцитам). Существует и третья причина, которая могла повлиять на интенсивность ГС — время. К сожалению, как мы уже писали выше, в разделе «Материалы и методы» авторы подробно описали возрастные и половые характеристи-

ки пациентов, но не дали информации о других признаках, с нашей точки зрения гораздо более активно влияющих на нарушение коагуляции и ГС. Например, нет данных о том, когда в процессе лечения (через сколько дней после последнего введения цитостатиков) развивались эти проблемы. А ведь чем больше интервал после проведенного лечения, тем больше вероятность «спонтанного» прекращения ГС и уменьшения нарушений коагуляции — просто вследствие восстановления гемопоэза, «стихания» инфекционных осложнений и мукозитов. И в таком случае «причинно-следственная» связь между проводимым лечением (как инфузиями СЗП, так и введением витамина К) становится все менее очевидной.

Дабы не утомлять читателя повторениями, отмечу, что аналогичные вопросы возникают и при анализе «доказательств» эффективности витамина К для предотвращения ГС у больных из группы сравнения (судя по всему, она же группа 2). Встречаются, правда, и «новые» логические нестыковки. Так, например, авторы говорят о достоверном снижении частоты кровоточивости к шестому дню терапии витамином К, что послужило поводом для его отмены. Однако, снижение частоты — это не исчезновение ГС (т. е. у ряда больных ГС сохранялся и на шестые сутки). Тогда почему же эффективный, по мнению авторов, препарат отменяется у всех больных (в т. ч. и у больных с сохраняющимся ГС)?

А вот выводы, которые делают авторы из проведенного исследования, по форме как раз не вызывают никаких нареканий. Предельно четко и понятно утверждается, что больным НЕОБХОДИМЫ и обследования, и лечение, которые авторы использовали в своем исследовании, так как они «дают отчетливый положительный клинический и лабораторный эффект у всех больных». Однако, рассматривая всю статью в целом, я бы не рекомендовал читателям немедленно внедрять разработанную методику, во всяком случае, до получения дополнительной информации, позволяющей однозначно охарактеризовать ее (методику) суть, границы принятия решений (о начале и прекращении лечения), оценки эффективности и, разумеется, получения более четкого доказательства связи между ее применением и достигнутыми результатами.

С уважением,

Жуков Николай Владимирович,
к.м.н., зав. отделением клинической
онкологии ФГУ ФНКЦ ДГОИ

E-mail: zhukov.nikolay@rambler.ru



- Стандарт лечения и профилактики ЦМВ-инфекции на фоне иммуносупрессии
- Сокращает смертность от ЦМВ на 74%
- Сокращает общую смертность на 37%

Вальцит[®]
валганцикловир

ЗАО «Рош-Москва»
Официальный дистрибьютор
«Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Швейцария)
Россия, 107031 Москва
Трубная площадь, дом 2
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»
Тел.: +7 (495) 229-29-99
Факс: +7 (495) 229-79-99
www.roche.ru



ТЕРАПИЯ ВЫСОКИХ ДОСТИЖЕНИЙ



Показания. *Неходжкинская лимфома* Рецидивирующая или химиоустойчивая В-клеточная, CD20-положительная неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности или фолликулярная. Фолликулярная лимфома III-IV стадии в комбинации с химиотерапией у ранее нелеченных пациентов. Фолликулярная лимфома в качестве поддерживающей терапии после ответа на индукционную терапию. CD20-положительная диффузная В-крупноклеточная неходжкинская лимфома в комбинации с химиотерапией по схеме СНОР. *Хронический лимфолейкоз* в комбинации с химиотерапией у пациентов, ранее не получавших стандартную терапию. Рецидивирующий или химиоустойчивый хронический лимфолейкоз в комбинации с химиотерапией. *Ревматоидный артрит* (активная форма) у взрослых в комбинации с метотрексатом при непереносимости или неадекватном ответе на текущие режимы терапии, включающие один или более ингибиторов фактора некроза опухолей (ФНО- α). Безопасность и эффективность препарата у детей не установлены. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к ритуксимабу, любому компоненту препарата или к белкам мыши, острые инфекционные заболевания, выраженный первичный или вторичный иммунодефицит. **Правила приготовления и хранения раствора.** Необходимое количество препарата набирают в асептических условиях и разводят до расчетной концентрации (1-4 мг/мл) в инфузионном флаконе (пакете) с 0,9% раствором натрия хлорида для инфузий или 5% раствором декстрозы (растворы должны быть стерильными и апиrogenными). Приготовленный инфузионный раствор Мабтеры физически и химически стабилен в течение 12 ч при комнатной температуре или в течение не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Мабтеру вводят внутривенно, инфузионно (медленно), через отдельный катетер. Нельзя вводить в/в болюсно или в виде в/в инъекций. **Дополнительная информация в инструкции по применению.**

МабТера
Ритуксимаб
В ЦЕНТРЕ УСПЕХА

ЗАО «Рош-Москва»
Официальный дистрибьютор
«Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд.» (Швейцария)
Россия, 107031 Москва
Трубная площадь, дом 2
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»
Тел.: + 7 (495) 229-29-99
Факс: + 7 (495) 229-79-99
www.roche.ru

