

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ,  
ГЕМАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ,  
ГЕМАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ**

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ  
XII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

Минск, 2012

УДК 616-006+616.15+616-097] – 053.2  
ББК 55.6+54.11

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

Алейникова О.В., Углова Т.А., Белевцев М.В., Спивак Л.В., Исмагилова М.Г.

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ, ГЕМАТОЛОГИИ И  
ИММУНОЛОГИИ: Сборник научных трудов - Минск 2012. – 258 с.**

В сборник включены материалы научных исследований, освещающие вопросы патогенеза и терапии онкологических и гематологических заболеваний у детей, а также фундаментальных исследований в области детской онкогематологии.

Материалы сборника представляют интерес для онкологов гематологов, иммунологов, врачей всех специальностей, научных работников, студентов медицинских университетов.

**РЕЦЕНЗИОННЫЙ СОВЕТ:**

Потапнев М.П., Углова Т.А., Белевцев М.В., Алейникова О.В., Конопля Н.Е.

© Республиканский научно-практический центр  
детской онкологии, гематологии и иммунологии, 2012

# **ОСТРЫЙ ЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ У ДЕТЕЙ АЗЕРБАЙДЖАНА, ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА И РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПО ПРОТОКОЛУ ОЛЛ МВ-2002**

*Багиров И.А.<sup>1</sup>, Алейникова О.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> НИИ Гематологии, Баку Азербайджан

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии  
Минск, Беларусь

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) - наиболее часто встречаемое злокачественное новообразование у детей в возрасте от 0 – до 14 лет. Последние 4 десятилетия ознаменовались огромными успехами в лечении этого, еще некогда фатального, заболевания детского возраста. Выживаемость 70 -80% была достигнута во многих развитых странах Западной Европы и Северной Америки еще в 90-е годы двадцатого столетия. Результаты лечения ОЛЛ у детей в России в 70-80-е годы XX века оставались очень плохими [1, 2]. Лишь с начала 90-х годов началось повсеместное внедрение западных протоколов (преимущественно кооперативной немецкой группы BFM) во всех вновь образованных странах бывшего Советского Союза. В это же время, в отделении гематологии Российской детской клинической больницы впервые началось использование оригинального протокола ОЛЛ-МВ 91 (Москва-Берлин), разработанного А.И.Карачунским с помощью немецких коллег из детского отделения онкологии/гематологии клиники «Шарите» Университета имени Гумбольта (руководитель – проф. Г.Хенсе). С 1992 года в России началось первое мультицентровое клиническое исследование сравнения двух протоколов лечения ОЛЛ у детей: протокола ALL-BFM 90М и ОЛЛ-МВ 91. К 2000 году набор пациентов в исследование закончился и статистический анализ показал абсолютную идентичность результатов лечения по обоим протоколам в пользу меньшей токсичности протокола ОЛЛ-МВ 91 [3]. С 2002 года к Российскому исследованию подключилась Беларусь (центры детской онкологии/гематологии в Минске, Гомеле и Могилеве) и впервые

образовалась межгосударственная кооперативная мультицентровая группа по изучению ОЛЛ у детей.

В республике Азербайджан системное внедрение программного лечения ОЛЛ у детей началось с 2002 года, когда в республике появился протокол российско-белорусской кооперативной группы ОЛЛ-МВ 2002. Азербайджанские дети получали лечение по данному протоколу как в самой республике (г. Баку), так и в республике Беларусь (г. Минск).

Учитывая различия в этнической принадлежности азербайджанских детей (тюрская группа) и детей славянских национальностей, нами впервые проанализированы особенности клинических и лабораторных проявлений, результаты лечения и факторы прогноза ОЛЛ у детей Азербайджана в сравнении с белорусскими детьми, страдающими ОЛЛ.

*Пациенты и методы.* В исследование включены 54 пациента, граждан республики Азербайджан, в возрасте от 1 до 14 лет (медиана – 6,84 г.) с первично установленным диагнозом ОЛЛ, получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МВ-2002 с ноября 2002г. по ноябрь 2008г. 32 пациента лечились в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии и гематологии (РНПЦДОГ) г. Минска, 22 пациентам лечение проводилось в НИИ гематологии г. Баку (Республика Азербайджан).

Группу сравнения составили 159 пациента, граждан республики Беларусь такого же возраста (медиана – 4,91 года), получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МВ-2002 с ноября 2002г по ноябрь 2008 года в РНПЦДОГ.

Все больные удовлетворяли критериям протокола ОЛЛ-МВ-2002: возраст на момент установления диагноза – от 0 до 19 лет; диагноз ОЛЛ подтвержден клинико-лабораторными исследованиями; отсутствовало тяжёлое сопутствующее заболевание, не позволяющее проводить ПХТ по протоколу; получено согласие родителей или других законных представителей пациента на лечение.

При определении событий руководствовались критериями протокола:

- ремиссию заболевания констатировали при наличии в костном мозге (КМ)  $\leq 5\%$  бластных клеток при нормальной или несколько сниженной клеточности КМ, нормальном анализе крови и ликвора и отсутствии экстрамедуллярных лейкемических очагов;

- не ответившими на лечение (non-responder - НО) считали пациентов, не достигших ремиссии на 36-й день индукции и после 3-х блоков терапии для HRG (группы высокого риска);

- смерть в индукции (СИ) регистрировалась у пациентов, погибших до наступления ремиссии;

- смерть в ремиссии (СР) определялась как смерть от любых причин во время ремиссии основного заболевания;

- рецидив (Р) заболевания констатировали при наличии  $\geq 25\%$  бластных клеток в КМ и/или наличию экстрамедуллярных лейкемических очагов;

- пациента считали выпавшим из-под наблюдения (lost of follow up – LFU) при отсутствии сведений о нем более 6 месяцев.

Результаты терапии оценивали по числу пациентов, достигших полной ремиссии (ПР), количеству индукционных смертей, количеству смертей в ремиссии, количеству рецидивов и выпавших из-под наблюдения, а также по числу пациентов, находящихся в полной продолжительной ремиссии (ППР). Общую (ОВ), бессобытийную (БСВ) и безрецидивную выживаемости (БРВ) рассчитывали по методу Каплан-Майера [9].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Access, Statistica 6.0. Оценка статистической значимости различий (p) между сравниваемыми показателями проводилась в группах по индивидуальным параметрам с помощью  $\chi^2$  теста, а для вариационных рядов – U тестом Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Статистические различия между кривыми выживаемости рассчитывали с помощью непараметрического критерия log-rank. Для оценки влияния нескольких

независимых факторов на выживаемость использовали регрессионный анализ по методу Соx [17].

*Результаты исследования и их обсуждение.*

В таблице 1 представлены основные инициальные характеристики пациентов исследуемой группы.

Таблица 1- Инициальные характеристики азербайджанских пациентов с ОЛЛ

|                                             | Граждане РА<br>(Минск) |       | Граждане<br>РА (Баку) |       | р    |
|---------------------------------------------|------------------------|-------|-----------------------|-------|------|
|                                             | абс.                   | %     | абс.                  | %     |      |
| Всего                                       | 32                     | 100,0 | 22                    | 100,0 |      |
| Пол                                         |                        |       |                       |       |      |
| мальчики                                    | 23                     | 71,9  | 14                    | 63,6  | 0,52 |
| девочки                                     | 9                      | 28,1  | 8                     | 36,4  |      |
| Возраст                                     |                        |       |                       |       |      |
| < 10 лет                                    | 24                     | 75,0  | 13                    | 59,1  | 0,22 |
| ≥ 10 лет                                    | 8                      | 25,0  | 9                     | 40,9  |      |
| Медиана возраста                            | 6,47                   |       | 9,92                  |       | 0,25 |
| Количество лейкоцитов, х 10 <sup>9</sup> /л |                        |       |                       |       |      |
| <50                                         | 25                     | 78,1  | 16                    | 72,7  | 0,65 |
| >=50                                        | 7                      | 21,9  | 6                     | 27,3  |      |
| Иммунофенотип                               |                        |       |                       |       |      |
| В-клеточный                                 | 29                     | 90,6  | 14                    | 82,4  | 0,42 |
| Т-клеточный                                 | 3                      | 9,4   | 3                     | 17,6  |      |
| не определен                                | 0                      |       | 5                     |       |      |
| Поражение ЦНС                               |                        |       |                       |       |      |
| Нет                                         | 31                     | 96,9  | 22                    | 100,0 | 0,43 |
| Есть                                        | 1                      | 3,1   | 0                     | 0,0   |      |
| Увеличение средостения                      |                        |       |                       |       |      |
| Нет                                         | 31                     | 96,9  | 19                    | 86,4  | 0,15 |
| Есть                                        | 1                      | 3,1   | 3                     | 13,6  |      |
| Гепатоспленомегалия                         |                        |       |                       |       |      |
| печень ≥ 4 см                               | 18                     | 56,3  | 12                    | 54,5  | 0,9  |
| селезенка ≥ 4 см                            | 16                     | 50,0  | 10                    | 45,5  | 0,74 |
| Группа риска                                |                        |       |                       |       |      |
| SRG                                         | 18                     | 56,3  | 12                    | 54,5  | 0,9  |

Продолжение таблицы 1

|      |    |      |    |      |      |
|------|----|------|----|------|------|
| ImRG | 13 | 40,6 | 10 | 45,5 | 0,72 |
| HRG  | 1  | 3,1  | 0  | 0,0  | 0,4  |

Среди азербайджанских пациентов с ОЛЛ, получавших лечение в обеих клиниках, преобладали мальчики – 71,9% в Минске и 63,6% в Баку. Соотношение мальчики/девочки статистически значимо не отличались в двух группах и составляло 2,55/1,0 и 1,75/1,0 соответственно ( $p > 0,05$ ). Достоверных различий в клинических и лабораторных данных в дебюте ОЛЛ у пациентов, получавших лечение в РНПЦДОГ и НИИГРА, не выявлено. Это позволило объединить инициальные клинические и лабораторные данные азербайджанских детей с ОЛЛ, лечившихся в обеих клиниках, для проведения сравнительного анализа по этническому признаку. Группой сравнения послужили инициальные клинико-лабораторные характеристики белорусских детей, получавших лечение по поводу ОЛЛ в РНПЦДОГ в аналогичный период. Результаты представлены на рисунке 1.

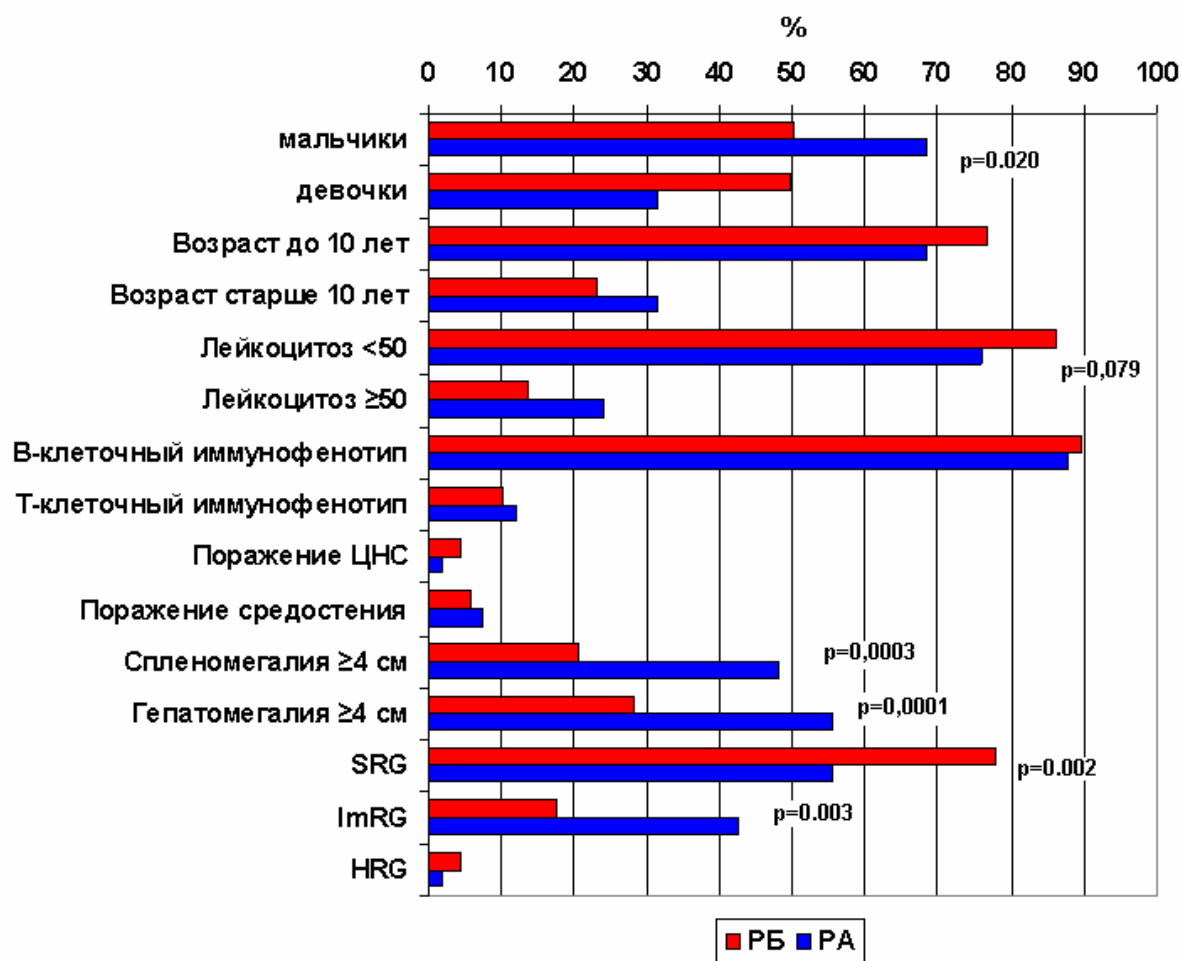


Рисунок 1- Инициальные характеристики детей с ОЛЛ в зависимости от национальной принадлежности

Нами установлено, что имеются достоверно значимые различия по полу у детей с ОЛЛ азербайджанской и белорусской национальности, получивших лечение по протоколу ОЛЛ МВ-2002. В группе азербайджанских пациентов преобладали мальчики – 68,5% , что статистически значимо отличалось от группы белорусских детей ( $p=0,020$ ). У детей азербайджанской национальности в клинической картине дебюта заболевания значимо чаще преобладал гиперпластический синдром, что вероятно было связано с более длительным преддиагностическим периодом. Так, увеличение печени и селезенки более 4 см наблюдалось у 55,6% и 48,1% азербайджанских пациентов и у 28,3% и 20,8% белорусских пациентов ( $p= 0,0003$  и  $0,0001$  соответственно). Число пациентов с уровнем лейкоцитов более 50 тысяч, основная масса которых была представлена бластными клетками,



существенно чаще встречалось в группе азербайджанских детей ( $p=0,079$ ). Все вышеперечисленные признаки, используемые для стратификации пациентов по группам риска, свидетельствовали не в пользу пациентов азербайджанской национальности в отношении распространенности патологического процесса в дебюте заболевания. Этим объясняются статистически значимые различия в распределении пациентов по группам риска протокола ОЛЛ-МВ-2002: лишь 55,6% азербайджанских детей было отнесено к SRG (группа стандартного риска) по сравнению с 78,0% белорусских детей ( $p=0,002$ ); соответственно большее число азербайджанских пациентов относились к ImRG (группа промежуточного риска) (42,6%), по сравнению с белорусскими детьми (17,6%) ( $p=0,003$ ). В группу HRG (группа высокого риска) вошли 7 белорусских и 1 азербайджанский пациент в соответствии с критериями протокола ОЛЛ-МВ-2002: наличие  $t(9;22)$  или  $t(4;11)$  или отсутствие ремиссии после завершения терапии индукции (день 36). К сожалению, в республике Азербайджан цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование не проводилось.

В проведенном нами анализе инициальных гематологических показателей в 2-х сравниваемых группах также выявлены значительные различия. Уровень лейкоцитов в группе азербайджанских пациентов был значительно выше, чем в группе белорусских детей ( $p<0,0001$ )(рис.2).

Статистически значимые различия отмечались по уровню гемоглобина ( $p<0,0001$ ) и тромбоцитов ( $p=0,003$ ), что клинически проявлялось выраженным анемическим и геморрагическим синдромами (рис 3, 4).

Уровень бластной метаплазии костного мозга и содержания бластных клеток в периферической крови не различался в обеих группах (рис. 5, 6).

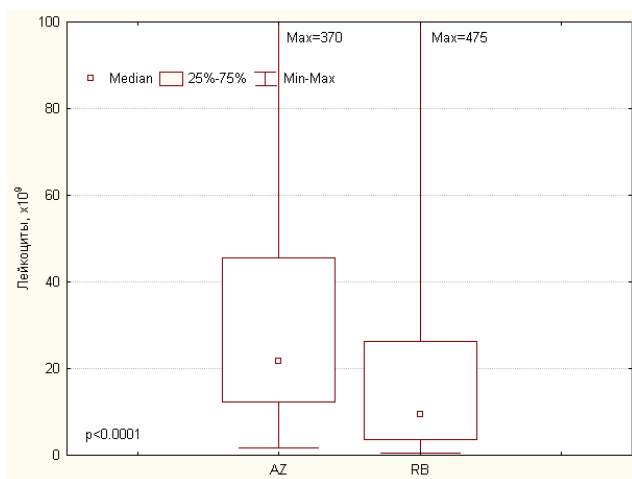


Рисунок 2 –Инициальный количество лейкоцитов

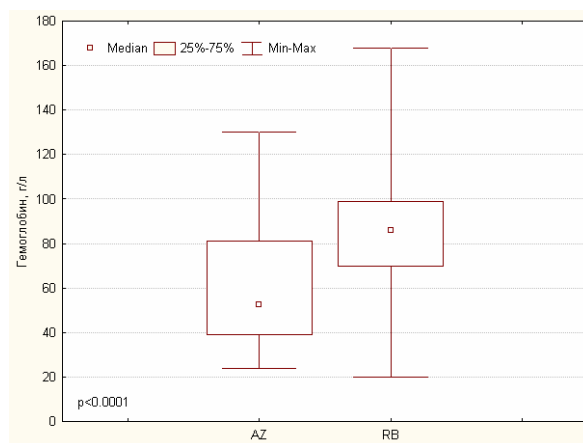


Рисунок 3 – Инициальный концентрация гемоглобина

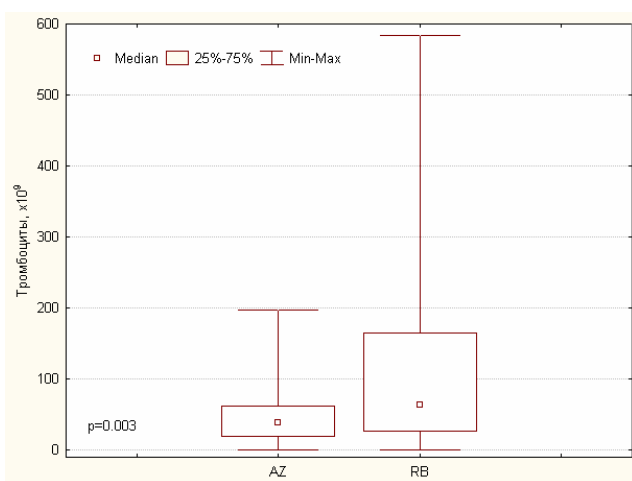


Рисунок 4 – Инициальное количество тромбоцитов

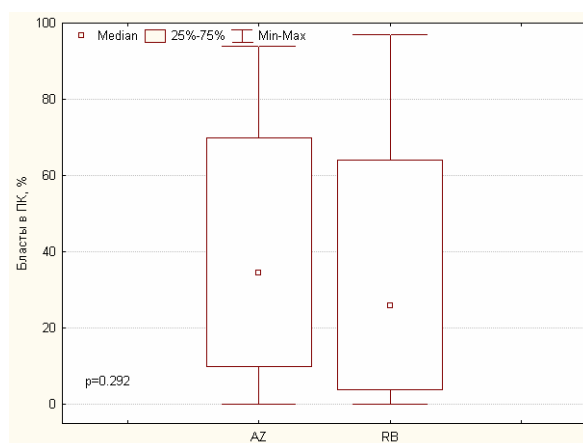


Рисунок 5 – Инициальный уровень бластов в ПК

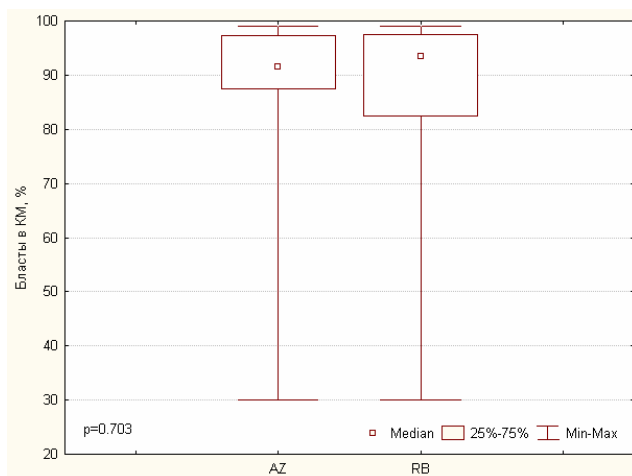


Рисунок 6 - Инициальное количество бластных клеток в периферической крови

В литературе хорошо представлены данные о расовых различиях в клинической презентации ОЛЛ у детей [5, 8]. Так, в когортном исследовании Smita Bhatia et al [5], охватившим период с 1983 по 1995 год были проанализированы клинические характеристики 14 117 детей и подростков в дебюте ОЛЛ. Показано, что гиперлейкоцитоз и более старший возраст характерны для пациентов черной расы, что достоверно чаще относилось к пациентам черной расы в высокую группу риска. Наиболее лучшие результаты лечения имели уроженцы Азии по сравнению с пациентами других рас. В данном исследовании соотношение мальчики/девочки во всей когорте 1,33/1 и не отличалось в различных расовых группах пациентов [5]. Гендерные различия с преобладанием мальчиков при ОЛЛ отмечаются во всех географических регионах, с соотношением мальчики/девочки 1,02/1 в Израиле до 2,31/1 – в Новой Зеландии [6]. В нашем исследовании соотношение мальчики/девочки у азербайджанских детей составляло 2,18/1, что значительно отличалось от белорусских пациентов [4]. Однако эти данные не отражают истинную картину половых различий у детей азербайджанской национальности, так как до настоящего времени в республике Азербайджан нет национального регистра злокачественных новообразований у детей.

Начальные симптомы ОЛЛ у детей крайне вариабельны: в большинстве случаев заболевание начинается остро, и клинические симптомы отражают степень поражения костного мозга и экстрамедуллярного распространения злокачественного процесса [7]. В группе азербайджанских пациентов явления злокачественной гиперплазии, а вследствие этого более выраженных проявлений угнетения нормального кроветворения статистически значимо отличались от таковых у белорусских детей. По-видимому, это связано с более поздним обращением в специализированные медицинские учреждения пациентов азербайджанской группы.

Лечение ОЛЛ по протоколу ALL-MB-2002 в РНПЦДОГ получили 191 детей (159 – граждан республики Беларусь, 32 – граждан республики

Азербайджан), в НИИГА – 22 ребенка. Результаты лечения в зависимости от клинической базы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты лечения пациентов с ОЛЛ (дети 1-14 лет) в зависимости от клинической базы

| Параметр               | Клиническая база |      |        |      | р     |
|------------------------|------------------|------|--------|------|-------|
|                        | РНПЦДОГ          |      | НИИ ГА |      |       |
|                        | абс.             | %    | абс.   | %    |       |
| Результаты индукции    |                  |      |        |      |       |
| Всего пациентов        | 191              | 100  | 22     | 100  |       |
| Смерть в индукции      | 4                | 2,1  | 1      | 4,5  | 0,472 |
| Рефрактерность (НО)    | 2                | 1,0  | 0      | 0    | 0,630 |
| Достигли ПР            | 185              | 96,9 | 21     | 95,5 | 0,727 |
| Статус полной ремиссии |                  |      |        |      |       |
| Всего пациентов        | 185              | 100  | 21     | 100  |       |
| Умерли в ремиссии      | 2                | 1,1  | 2      | 9,5  | 0,008 |
| Рецидив                | 19               | 10,3 | 2      | 9,5  | 0,915 |
| Вторая опухоль         | 1                | 0,5  | 0      | 0    | 0,736 |
| LFU                    | 1                | 0,5  | 0      | 0    | 0,736 |
| В ППР                  | 162              | 87,6 | 17     | 81,0 | 0,395 |

При анализе событий (таблица 2) обращает на себя внимание выявленные различия в управляемых причинах летальности в 2-х исследуемых группах, связанных с терапией ОЛЛ. Так в группе Азербайджанских пациентов, лечившихся в Баку, количество смертей в ремиссии было статистически значимо выше по сравнению с пациентами, лечившимся в Минске ( $p = 0,008$ ). В НИИ ГА 3 (13,6%) пациентов умерли от управляемых причин. У 2-х из 3-х умерших в Баку детей, причиной смерти явился тяжелый геморрагический синдром, вследствие ограничения возможности коррекции тромбоцитопении трансфузиями тромбоконцентрата. 1 ребенок умер от сепсиса, развившегося в стадии ремиссии на фазе S2 консолидации.

Унивариантный анализ общепринятых факторов риска в исследуемой группе пациентов представлен в таблицах 3 и 4.

Таблица 3- Результаты выживаемости пациентов с ОЛЛ (дети 1 – 14 лет) в зависимости от инициальных характеристик, раннего ответа на терапию и клинической базы

| Показатели                       | N   | %    | ОВ        | Р<br>ОВ | БСВ       | Р<br>БСВ | БРВ       | Р<br>БРВ |
|----------------------------------|-----|------|-----------|---------|-----------|----------|-----------|----------|
| Всего                            | 213 | 100  | 0.88±0.02 |         | 0.82±0.03 |          | 0.88±0.02 |          |
| Пол                              |     |      |           |         |           |          |           |          |
| Мальчики                         | 117 | 54,9 | 0.87±0.03 | 0.869   | 0.82±0.04 | 0.876    | 0.87±0.03 | 0.467    |
| Девочки                          | 96  | 45,1 | 0.88±0.03 |         | 0.82±0.04 |          | 0.90±0.03 |          |
| Возраст                          |     |      |           |         |           |          |           |          |
| <10 лет                          | 159 | 74,6 | 0.91±0.02 | 0.025   | 0.85±0.03 | 0.097    | 0.89±0.02 | 0.611    |
| ≥10 лет                          | 54  | 25,4 | 0.78±0.06 |         | 0.74±0.06 |          | 0.85±0.05 |          |
| Лейкоциты (х 10 <sup>9</sup> /л) |     |      |           |         |           |          |           |          |
| < 50                             | 178 | 83,6 | 0.91±0.02 | 0.0005  | 0.86±0.03 | 0.001    | 0.91±0.02 | 0.009    |
| ≥ 50                             | 35  | 16,4 | 0.69±0.08 |         | 0.61±0.08 |          | 0.71±0.08 |          |
| Иммунофенотип                    |     |      |           |         |           |          |           |          |
| В-линейный                       | 186 | 87,3 | 0.90±0.02 | 0.053   | 0.85±0.03 | 0.004    | 0.91±0.02 | 0.006    |
| Т-линейный                       | 22  | 10,3 | 0.77±0.09 |         | 0.56±0.11 |          | 0.64±0.11 |          |
| Не определен                     | 5   | 2,4  |           |         |           |          |           |          |
| Поражение ЦНС                    |     |      |           |         |           |          |           |          |
| Нет                              | 205 | 96,2 | 0.89±0.02 | 0.011   | 0.83±0.03 | 0.083    | 0.88±0.02 | 0.660    |
| Есть                             | 8   | 3,8  | 0.63±0.17 |         | 0.63±0.17 |          | 0.83±0.15 |          |
| Увеличение средостения           |     |      |           |         |           |          |           |          |
| Нет                              | 200 | 93,9 | 0.88±0.02 | 0.623   | 0.83±0.03 | 0.165    | 0.90±0.02 | 0.060    |
| Есть                             | 13  | 6,1  | 0.85±0.10 |         | 0.54±0.14 |          | 0.58±0.14 |          |
| Спленомегалия                    |     |      |           |         |           |          |           |          |
| <4 см                            | 154 | 72,3 | 0.90±0.02 | 0.182   | 0.84±0.03 | 0.263    | 0.92±0.02 | 0.042    |
| ≥4 см                            | 59  | 27,7 | 0.82±0.05 |         | 0.76±0.06 |          | 0.80±0.05 |          |
| Ответ к 15 дню                   |     |      |           |         |           |          |           |          |
| М1 <5                            | 152 | 72,4 | 0.92±0.02 | 0.035   | 0.87±0.03 | 0.005    | 0.90±0.02 | 0.074    |
| М2 ≥5- <25                       | 43  | 20,5 | 0.81±0.06 |         | 0.74±0.07 |          | 0.84±0.06 |          |
| М3 ≥25                           | 15  | 7,1  | 0.80±0.10 |         | 0.66±0.12 |          | 0.76±0.12 |          |
| Группа риска                     |     |      |           |         |           |          |           |          |
| SRG                              | 154 | 72,3 | 0.91±0.02 | 0.011   | 0.86±0.03 | 0.003    | 0.91±0.02 | 0.366    |
| ImRG                             | 51  | 23,9 | 0.80±0.06 |         | 0.72±0.06 |          | 0.80±0.06 |          |
| HRG                              | 8   | 3,8  | 0.63±0.17 |         | 0.50±0.18 |          | 0.80±0.16 |          |
| Клиника                          |     |      |           |         |           |          |           |          |
| РНПЦДОГ                          | 191 | 89,7 | 0.89±0.02 | 0.045   | 0.84±0.03 | 0.022    | 0.88±0.02 | 0.784    |
| НИИ Гематологии                  | 22  | 10,3 | 0.75±0.09 |         | 0.66±0.10 |          | 0.85±0.08 |          |
| Национальность                   |     |      |           |         |           |          |           |          |

Продолжение таблицы 3

|               |     |      |           |       |           |       |           |       |
|---------------|-----|------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| Беларусы      | 159 | 74,6 | 0.89±0.02 | 0.345 | 0.83±0.03 | 0.614 | 0.88±0.03 | 0.618 |
| Азербайджанцы | 54  | 25,4 | 0.83±0.05 |       | 0.79±0.06 |       | 0.89±0.04 |       |

Нами не выявлено достоверно значимых различий в выживаемости пациентов в зависимости от пола.

Во многих исследованиях возраст больных старше 10 лет является неблагоприятным прогностическим фактором [10, 11, 12, 19]. В нашем исследовании это подтвердилось только в отношении общей (ОВ) выживаемости ( $p=0,025$ ), в то время как бессобытийная (БСВ) и безрецидивная (БРВ) выживаемости достоверно значимо не отличались в младшей и старшей группе детей.

В протоколе ОЛЛ МВ-2002 инициальный лейкоцитоз  $\geq 50 \times 10^9$  /л является одним из критериев отнесения пациента в промежуточную группу риска (ImRG) (9). Это нашло свое подтверждение в нашем исследовании: ОВ, БСВ и БРВ пациентов при  $L \geq 50 \times 10^9$  /л были достоверно значимо ниже, чем при  $L \leq 50 \times 10^9$  /л ( $p=0,0005$ ;  $p=0,001$ ;  $p=0,009$  соответственно).

У 10,3% пациентов был Т-линейный иммунофенотип, который явился неблагоприятным фактором прогноза в отношении БСВ и БРВ.

Нейролейкемия в дебюте заболевания также неблагоприятно сказывалась на показателях ОВ и БСВ, однако это не влияло на повышение частоты рецидивов.

Спленомегалия  $\geq 4$  см в нашем исследовании явилась неблагоприятным прогностическим фактором только в отношении БРВ ( $p=0,042$ ).

Национальность прогностического значения не имела, однако клиническая база, в которой лечились пациенты, имела прогностическое значение в отношении ОВ и БСВ. Так, дети получавшие лечение по поводу ОЛЛ в РНПЦДОГ имели шанс выжить на 14% в отношении ОВ и на 18% в отношении БСВ больше, чем в Азербайджане, что соответствует более высокому уровню сопроводительной терапии в РНПЦДОГ. Знаменательно,

что БРВ в обеих клиниках не отличались, что свидетельствует о воспроизводимости антилейкемического эффекта протокола ОЛЛ МВ-2002.

Одним из наиболее значимых факторов прогноза является ранний ответ на терапию таблица 3, определяемый по исчезновению бластных клеток из периферической крови после 7-дневного лечения стероидами или характером ответа по уровню бластных клеток в КМ на 15-й день лечения (М1, М2 или М3) [13, 14, 15, 18].

Таблица 4 – Результаты выживаемости пациентов с ОЛЛ (дети 1 – 14 лет) в зависимости от раннего ответа на терапию

|       | М1        | М2        | М3        | р<br>М1-М2 | р<br>М1-М3 | р<br>М2-М3 |
|-------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Всего | 152       | 43        | 15        |            |            |            |
| ОВ    | 0.92±0.02 | 0.81±0.06 | 0.80±0.10 | 0.026      | 0.077      | 0.929      |
| БСВ   | 0.87±0.03 | 0.74±0.07 | 0.66±0.12 | 0.016      | 0.008      | 0.548      |
| БРВ   | 0.90±0.02 | 0.84±0.06 | 0.76±0.12 | 0.182      | 0.059      | 0.529      |

В нашем исследовании наиболее неблагоприятным фактором в отношении ОВ, БСВ и БРВ являлось наличие более 25% бластных клеток в костном мозге (М3) .

Для оценки независимого влияния факторов прогноза на эффективность терапии, нами дополнительно были проанализированы с помощью многофакторного анализа (регрессионный анализ Кокса) все достоверно значимые в унивариантном анализе прогностические факторы относительно времен наблюдения и цензоров ОВ и БРВ (табл.5).

Таблица 5- Регрессионный анализ Кокса

| Прогностические факторы   | Цензоры БСВ           |                 |       | Цензоры БРВ           |                 |      |
|---------------------------|-----------------------|-----------------|-------|-----------------------|-----------------|------|
|                           | Пропорциональный риск | Статистика Wald | р     | Пропорциональный риск | Статистика Wald | р    |
| Клиническая база          | 3.01                  | 6.51            | 0.011 | 1.42                  | 0.21            | 0.65 |
| Ответ на 15 день<br><=5 % | 2.84                  | 8.56            | 0.003 | 1.44                  | 1.23            | 0.27 |

Продолжение таблицы 5

|                                                       |      |      |       |      |      |      |
|-------------------------------------------------------|------|------|-------|------|------|------|
| Инициальный лейкоцитоз $\geq 50 \times 10^9/\text{л}$ | 2.05 | 3.74 | 0.053 | 2.28 | 2.43 | 0.12 |
| Иммунофенотип В/Т                                     | 1.32 | 0.50 | 0.48  | 1.54 | 0.55 | 0.46 |

Установлено, что независимое прогностическое влияние на бессобытийную выживаемость оказывает только клиническая база, в которой проводилось лечение пациентов ( $p = 0,0107$ ) и ранний ответ на терапию (М1 статус на 15 день -  $p = 0,003$ ), в то время как иммунофенотип потерял свое прогностическое значение. Для оценки безрецидивной выживаемости независимых прогностических факторов не выявлено.

*Заключение.* В настоящей работе впервые представлена наиболее полная характеристика острого лимфобластного лейкоза у детей Азербайджана, факторы прогноза и результаты их лечения по протоколу ОЛЛ МВ-2002. При проведении сравнительного анализа между азербайджанскими и белорусскими детьми выявлены различия в демографических и клинических характеристиках ОЛЛ в 2-х этнических группах детей, которые свидетельствуют о большей запущенности патологического процесса в дебюте заболевания у азербайджанских детей по сравнению с белорусскими пациентами. Следствием этого явилось отнесение большего числа детей азербайджанской национальности к промежуточной группе риска. Современные протоколы лечения ОЛЛ у детей нивелируют различия в степени распространенности злокачественного процесса в дебюте заболевания, однако для лечения пациентов промежуточной группы риска требуется больший объем химиотерапии и терапии осложнений.

Проведенный нами анализ прогностических факторов у пациентов с ОЛЛ, получивших идентичное лечение в разных центрах, выявил достоверно значимое влияние уровня сопроводительной терапии на выживаемость ОЛЛ у детей. Укрепление материально-технической базы, улучшение трансфузиологической помощи и адекватная диагностика и лечение инфекционных осложнений в Азербайджанском центре будут способствовать



нивелированию различий в выживаемости ОЛЛ. В то же время ранний ответ на терапию имеет общебиологический смысл и не утратит своего значения для прогноза ОЛЛ у детей независимо от места проведения и вида терапии.

Авторы выражают благодарность руководителю протоколов ОЛЛ МВ д.м.н. профессору А.И.Карачунскому за совместную работу.

## Литература

1. Кошель И.В. Результаты полихимиотерапии острого лимфобластного лейкоза у детей. // Гематология и трансфузиология. - 1986. -N4Сс. 13-16
2. Кисляк Н.С, Махонова Л.А, Кошель И.В. и др. Поздние рецидивы острого лейкоза у детей. // Гематология и трансфузиология. - М., 1989. -том 34, №9. -С. 8-12.
3. Карачунский А.И. Стратегия терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Автореферат диссертации доктора мед. наук. 1999
4. Савва Н.Н., Збоорвская А.А., Алейникова О.В. Злокачественные новообразования у детей республики Беларусь. Минск, 2008
5. Smita Bhatia, Harland N. Sather, Nyla A. Heerema, Michael E. Trigg, Paul S. Gaynon, and Leslie L. Robison. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. // Blood. 2002. – V. 15 -P. 1957-1964
6. Ferlay J., Bray.F., Pisani P., Parkin D.M. GLOBOCAN 2000;Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon, France: IARC Press,2001
7. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia // Childhood leukemias. Second edition, 2006, pp 439 - 472
8. Nina S. Kadan-Lottick; Kirsten K. Ness; Smita Bhatia; et al.Survival Variability by Race and Ethnicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia // JAMA. - 2003. – V. 290(15). - P. 2008-2014
9. Ю.В. Румянцева, А.И. Карачунский, О.В.Алейникова и соавт. Прогностические факторы в мультицентровом исследовании лечения острого лимфобластного лейкоза у детей в протоколах Москва – Берлин // Онкогематология – 2010ю– №1. – с. 37-49
10. Shultz K.R., Pullen D.J., Sather H.N. et al. Risk and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combine analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children Cancer Group (CCG) // Blood – 2007. –V.109. – P. 926 – 935
11. Pui C.-H., Carroll W. L., Meshinchi S., Arcenci R. J. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update // J Clin Oncol – 2011. – v.29. – p. 551-565.
12. Volkan Hazar, Gulsun Tezcan Karasu, Vedat Uygun et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Turkey: Factors Influencing Treatment and Outcome. A Single Center Experience // J Pediatr Hematol Oncol – 2010. –V. 32. –P.317–322.
13. Arico M., Basso G., Mandelli F. et al. Good steroid response in vivo predicts a favorable outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia // Cancer. - 1995. –V.75. – P.1684-1693
14. Gajjar A., Ribeiro R., Hancock M.L. et al. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia // Blood. - 1995. – V. 86. – P. 1292-295.
15. Gaynon P.S., Desai AA., Bostrom B.C. et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia // Cancer. - 1997. – V.80. – P. 1717-1726
16. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation// J Am Stat Assoc . -1958. – V. 53. – P. 457-481.

17. Cox D.R. *Regression models and life tables* // J R Stat Soc. - 1972. – V. 34. – P. 187
18. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Breneman J.C. et al. *Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia - the importance of early marrow response: report from the Children's Cancer Group* // J.Clin.Oncol. - 1996. – V.14. – P.389-398
19. Chessells JM. *Risk analysis in acute lymphoblastic leukaemia: problems and pitfalls* // Eur J Cancer . - 1995. – V.31. – P. 1656-1659.

## **РЕАЛИЗАЦИЯ КОНЦЕПЦИИ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕТОДА МЕДИЦИНСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ГЕМОДИНАМИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПОРАЖЕННЫХ ОРГАНОВ У ДЕТЕЙ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ**

*Бегун И.В.*

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

В предложенной ранее концепции (2002 г) учитывалась необходимость разработки диагностических критериев при неинвазивной динамической оценке васкуляризации, сосудистой архитектоники, системной и регионарной гемодинамики при опухолевых поражениях печени, почек и забрюшинного пространства у детей по данным комплексного ультразвукового исследования. Для ее практической реализации требовалось решение следующих задач: 1. Выбор наиболее эффективных количественных и качественных доплерографических показателей и получение на их основе новых индексов для адекватной характеристики конкретной гемодинамической ситуации в зоне интереса при злокачественных поражениях органов брюшной полости и забрюшинного пространства. 2. Описание сосудистых “паттернов” и характеристик к кровотока опухолевых поражений у детей с использованием современных доплеровских технологий для оценки процесса ангиогенеза при динамическом наблюдении больных на этапах полихимиотерапии и к моменту хирургического лечения. 3. Моделирование гемодинамического обеспечения органа и региона в условиях перехода кровообращения на

новый уровень функционирования при злокачественных новообразованиях у детей.

Свое развитие концепция получила в 2004-2007гг. Проведенные исследования [1] позволили изучить регионарную гемодинамику у детей с нефробластомой, забрюшинной нейробластомой, гепатобластомой, злокачественным поражением тканей нижних конечностей. Получены результаты сопряжения с показателями центральной гемодинамики параметров доплерограмм кровотока магистральных артерий портوپеченочного бассейна, почек и сосудистого русла нижних конечностей. На основании полученных данных определена тактика в изучении конкретной гемодинамической ситуации региона поражения при опухолевом заболевании. Центральным звеном алгоритма диагностики при поражении парного органа явилась оценка регионарного кровообращения при сопоставлении с контрлатеральным сосудистым регионом. Помимо диагностики опухолей почек и конечностей такой подход может быть применим при поражении любого парного органа (глазные яблоки, легкие, яичники, яички) с условием методически выполнимого определения информативных гемодинамических показателей для питающей артерии. Это в определенной степени позволило нивелировать неизбежно возникающие методические погрешности при проведении доплерографии и доплерометрии по крайней мере для одного исследователя. Результаты последних исследований в прикладном аспекте приведены ниже.

В работе [2] представлена оценка данных сравнительного ультразвукового исследования гемодинамики региона поражения у 49 детей и подростков 8–18 лет с морфологически установленным диагнозом: остеогенная саркома, саркома Юинга или примитивная нейроэктодермальная опухоль при локализации опухолевого процесса на нижних конечностях. В группу сопоставления вошли 45 пациентов такого же возраста с доброкачественными образованиями аналогичной локализации. Как у пациентов с остеогенной саркомой, так и у пациентов с саркомой Юинга

наблюдается феномен увеличения объемной скорости кровотока по главной артерии, обеспечивающей кровоснабжение анатомического региона поражения, на фоне снижения абсолютных значений уголнезависимых индексов (*RI* – индекс резистентности, *PI* – пульсационный индекс), характеризующих резистентность дистального циркуляторного русла конечности. Отмечен перераспределительный характер нарушения регионарной гемодинамики. О влиянии злокачественного новообразования на работу центрального звена кровообращения (сердца) можно было судить по наличию корреляционных связей между объемом злокачественной опухоли и сердечным выбросом. Полученные данные позволили неинвазивно диагностировать перестройку гемодинамического обеспечения конечностей у пациентов со злокачественными опухолями. Запатентован способ, в котором процентные отклонения величин доплеровских показателей больной конечности в сопоставлении с таковыми контрлатеральной (*Q%* (*Q* – объемный кровоток), *RI%* и *PI%*) для общей бедренной артерии (ОБА) могут рассматриваться как эффективные дифференциально-диагностическими критерии перестройки гемодинамического обеспечения конечностей у пациентов с подозрением на костную опухоль. Для пороговых уровней маркеров (*Q%* = 15,0%, *RI%* = 12,0%, *PI%* = 23,0%) (решающее правило: параметр > порогового значения) чувствительность и специфичность доплерографического исследования при разграничении злокачественных опухолей и доброкачественных костных образований составили 78–92% и 93–98% соответственно.

Приемлемая вариабельность относительных гемодинамических показателей, как сопряженных маркеров ангионеогенеза при костных саркомах, и валидность предложенного диагностического алгоритма предполагали изучение прогностической значимости этих показателей. Для проверки этой гипотезы в исследовании [3] анализировались данные в группах больных с различными исходами заболевания. Проведена ретроспективная оценка доплерографических показателей

гемодинамического обеспечения нижних конечностей у больных костными саркомами и изучена их прогностическая значимость для общей выживаемости. Использовались результаты сравнительного ультразвукового исследования кровотока по ОБА. При этом, наряду с объемом опухоли, требующей для своего роста изменений в гемодинамическом обеспечении конечностей, в качестве прогностических факторов общей выживаемости не исключалась возможность рассмотрения относительных величин изменения резистентности циркуляторного русла пораженной конечности. Установлено, что на момент анализа живы 66% пациентов при медиане наблюдения 30 мес. Неблагоприятный исход в 88% случаев констатирован на фоне резистентности опухоли к лечению либо в результате прогрессирования основного заболевания. У умерших больных было отмечено статистически значимое превышение величин процентного отклонения  $RI$  и  $PI$  для ОБА ( $P < 0,01$ ), что позволило рассматривать эти показатели в качестве возможных прогностических факторов. Установленные нами факты легли в основу методологического подхода к разработке нового предиктора. Для оценки прогностической эффективности величин отклонений  $PI$  и  $RI$  (в %) при заданных пороговых значениях предикторов анализировали общую выживаемость. Значения точек разделения показателей выбирали таким образом, чтобы информативность данных анализа была максимальной. Оказалось, что полученные для отклонений  $PI$  и  $RI$  значения (33 и 36%) соответствовали оптимальным. У больных всех групп наилучшая статистическая репрезентативность представлена результатами прогноза общей выживаемости, где в качестве предиктора использовалось отклонение индекса  $PI$  при его пороговом значении 33%. Данное исследование легло в основу нового способа прогнозирования, который заключается в том, что больному с подозрением на костную саркому или с диагностированной костной саркомой нижней конечности помимо базового выполняют расширенное ультразвуковое исследование с доплерографией кровотока ОБА обеих конечностей. Информативным критерием служит процентное

отклонение пульсационного индекса для ОБА на стороне поражения, получаемое при сопоставлении с таковым для контрлатеральной конечности. По процентным величинам отклонений (в сторону снижения) его значений, относящихся к одному из двух диапазонов, ассоциированных либо со 100%-ной выживаемостью в случае вхождения в диапазон 33% и менее, либо с выживаемостью  $25 \pm 8\%$  в случае вхождения в диапазон более 33%, прогнозируют наиболее вероятную общую пятилетнюю выживаемость. Результаты этого исследования в перспективе могут использоваться для стратификации пациентов, а также для идентификации больных с риском неблагоприятного исхода заболевания.

Целью еще одного исследования с применением предложенного концептуального подхода, являлось повышение эффективности дифференциальной диагностики у детей с нефробластомой и нейробластомой надпочечника путем комплексирования ультразвуковых методов в случаях, когда рентгенологические и клинико-лабораторные данные имеют неоднозначную трактовку. Как [нейробластома](#) надпочечника, так и нефробластома у большинства пациентов первично диагностируются при УЗИ и обычно визуализируются в виде больших солидных масс, связанных с почками. Дифференциация этих опухолей затруднена, особенно при линейных размерах 10 см и более. По собственным данным результатов анализа лучевых методов обследования 170 пациентов в возрасте от 1 месяца до 18 лет с новообразованиями почек в 17% возникали затруднения при дифференциации злокачественного поражения почки и нейробластомы. В ходе исследования оценены доплерографические показатели, полученные в процессе первичной диагностики нефробластомы (23 ребенка) и нейробластомы надпочечника (21 ребенок). Было установлено, что при нефробластоме увеличивается объемный кровоток по главной почечной артерии пораженной почки относительно контрлатеральной ( $p=0,00003$ ), чего не наблюдалось в случаях с нейробластомой надпочечника при сопоставимых объемных (252(143-420)

см? и 202(50-270) см? ( $p=0.07$ )) и сходных качественных сонографических характеристиках этих опухолей. Объем пораженной почки при нефробластоме коррелировал с объемным кровотоком по ее главной артерии ( $r=0,45$ ;  $p<0,05$ ). По результатам ROC анализа оценена диагностическая эффективность доплерографии при выделении больных нефробластомой в случаях необходимости дифференциации с нейробластомой надпочечника. Предложен способ диагностики, где в качестве диагностического критерия использовалась величина изменения объемной скорости кровотока по главной почечной артерии на стороне поражения относительно контрлатеральной в процентном измерении. Для порогового уровня маркера 20% (решающее правило: параметр  $>$  порогового) чувствительность и специфичность составили 83% (95% доверительный интервал 61%-95%) и 100% (95% доверительный интервал 84% - 100%) соответственно. Также было установлено, что диагностическая эффективность при сопоставлении относительного показателя увеличения объемной скорости кровотока по главной артерии пораженной почки статистически значимо выше, чем при сопоставлении абсолютных значений объемной скорости кровотока на стороне поражения.

Таким образом, доказано, что при комплексном ультразвуковом обследовании у пациентов со злокачественными новообразованиями парного органа наряду с топографо-анатомическими и локальными гемодинамическими характеристиками опухоли возможно адекватное определение степени нарушения гемодинамического обеспечения пораженного органа. При этом изучение направленности и степени изменения каждого гемодинамического показателя в отдельности или группы величин интегральных показателей в сравнительном аспекте для определенных нозологических форм позволяет выделить и эффективно использовать ряд критериев. Это: 1. дополнительные диагностические критерии для подтверждения злокачественности характера поражения к моменту постановки морфологического диагноза, 2. дополнительные

диагностические критерии в плане дифференциальной диагностики злокачественных новообразований, 3. информативные прогностические критерии.

## Литература

1. И.В. Бегун, И.И. Папкевич, Р.А. Тарасевич. Оценка нарушений гемодинамического обеспечения пораженного органа при опухолях печени, почек, забрюшинного пространства и конечностей у детей с использованием ультразвуковых доплеровских технологий / Достижения медицинской науки Беларуси: рецензируемый научно практический ежегодник. Выпуск XII. – Минск, 2007. – с. 59-60.
2. И.В. Бегун. Характеристика гемодинамического обеспечения нижних конечностей и диагностические возможности доплерографического исследования у больных костными саркомами // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2012. - №2. – С. 72-83.
3. И.В. Бегун. Относительная величина изменения пульсационного индекса для главной артерии пораженной конечности как прогностический фактор общей выживаемости при костных саркомах // Весці НАН Беларусі. - Сер. мед. навук. 2011.- №4.- С. 38-46.

## ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ АБДОМИНАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ У ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ

*Бегун И.В., Зборовская А.А.*

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

Злокачественные новообразования (ЗН) у детей первого года жизни имеют эпидемиологические особенности, особенности диагностики, отличия по факторам риска, прогнозу и биологическому поведению от ЗН в других возрастных группах. Заболеваемость ЗН у детей первого года жизни имеет значительные географические вариации, показатель колеблется от 7,5 до 27 на 100 тысяч младенцев, что, несомненно, связано и с региональными возможностями по своевременному выявлению этой патологии [1]. В странах с высоким уровнем эффективности диагностики, пик детской заболеваемости ЗН приходится именно на первый год жизни [2, 3]. По данным ученых США и Германии нейробластомы надпочечника и забрюшинного пространства



составляют более 30% случаев ЗН у детей первого года жизни. Опухоли почек и печени на первом году жизни имеют самые высокие по возрасту показатели заболеваемости, составляя около 10% и 3%, соответственно [2, 3]. В республике Беларусь, согласно опубликованным данным, за последние 10 лет произошли значительные изменения в структуре заболеваемости ЗН у детей первого года жизни [4-6]. За период 2001-2010 годы, в данной возрастной группе отмечен самый высокий темп прироста заболеваемости – 2,63% в год, что свидетельствует о значительном улучшении диагностических возможностей. Тем не менее, согласно данным детского канцер субрегистра Республики Беларусь сохраняется проблема диагностики злокачественных новообразований у детей в ‘запущенной форме’ [6], что не только снижает шансы пациентов на выздоровление, но и значительно увеличивает токсичность и стоимость лечения [7, 8].

Величина и локализация опухоли зачастую являются основополагающими для формулировки диагноза на этапе первичной визуализации объемного образования у ребенка. Ультразвуковое исследование (УЗИ) в настоящее время является методом выбора первичной визуализации пальпируемого абдоминального новообразования по критериям безвредности, относительной доступности и информативности. Вместе с тем, по собственным неопубликованным данным, *фактический возраст* первичной визуализации абдоминального ЗН у младенцев для вышеуказанных нозологических форм (без учета нейробластомы надпочечника) составил в среднем *6,1 месяца*, а *объем опухоли* - *219 см<sup>3</sup>*. Внедрение дородовых скрининговых программ привело к тому, что все возрастающее число случаев опухолей выявляют пренатально [9, 10]. Однако, большинство новообразований, диагностируемых у плода, являются доброкачественными [11].

В цели исследования входило изучить динамику роста типичных злокачественных абдоминальных опухолей у грудных детей (почек,

забрюшинной нейробластомы и гепатобластомы) для рационального планирования мероприятий по их ранней диагностике.

*Пациенты и методы.* Проведен ретроспективный клинико-анамнестический анализ данных первичной диагностики ЗН у 87 младенцев обоего пола, поступивших для обследования и лечения в специализированные детские онкологические отделения в период с 1990 по 2012гг. В изучаемую группу вошли: 25 детей с опухолями почек, 46 - с абдоминальной нейробластомой и 16 грудных детей с гепатобластомой. Диагнозы были подтверждены морфологически у 86 пациентов. Объем опухоли ( $V$ ) по данным ультразвукового исследования определяли по формуле:

$$V = a \cdot b \cdot c \cdot 0,53, \text{ см}^3,$$

где  $a$ - длина,  $b$ - ширина,  $c$ - толщина опухоли в см.

Период удвоения объема опухоли ( $DT$ , *сутки*) рассчитывали, используя уравнение:

$$DT = \Delta T \cdot \ln 2 / \ln(V1/V0),$$

где  $\Delta T$  – время предполагаемого роста опухоли по достижении объема  $V1$ , начиная с объема  $V0$  [12].

Статистическая обработка данных выполнялась в компьютерной программе Statistica V7.0 (StatSoft Inc., США). Результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25–75-й перцентили). Характер и силу корреляционных связей определяли методом Спирмена. Уровень значимости  $p$  принимался менее 0,05.

Для расчета популяционного возраста младенцев при заданных объемах опухолей применяли упрощенную модель, полученную путем преобразования из уравнения (1):

$$As = Af - (DT \cdot \ln(V1/V0) / \ln 2),$$

где  $Af$  - фактический возраст младенца на момент первичной диагностики,  $As$  - предполагаемый скрининговый возраст младенца при том, что  $Af - As = \Delta T$ .

*Результаты исследования и их обсуждение.* В изучаемой группе плановое пренатальное УЗИ в 95% случаев не позволяло выявить абдоминальную опухоль, диагностируемую впоследствии при фактических объемах ее первичной визуализации 250 см<sup>3</sup> и более в среднем в 43% случаев (для нейробластомы - 24%, гепатобластомы - 50%, опухолей почек - 76%). Возраст пациентов в объединенной по трем нозологиям группе составил 5,9 (3,0-9,6) месяцев, а объем опухоли на момент ее первичной визуализации 158 (33-355) см<sup>3</sup>. Для объективизации последующих расчетов из объединенной группы были исключены 11 пациентов с нейробластомой, обладающей регрессионным потенциалом. Фактическое число удвоений объема опухоли в клинической фазе роста (начиная с 1 см<sup>3</sup>) для нефробластомы, нейробластомы, гепатобластомы у грудных детей на момент первичной визуализационной диагностики составило 8,3 (7,8-8,9); 6,2 (4,3-7,8) и 8,0 (7,3-9,0) соответственно, притом, что значения данного показателя равные 10-11 ассоциированы с состоянием, несовместимым с жизнью. Требуемая для эффективной ультразвуковой диагностики абдоминальных ЗН у младенцев адекватная кратность обследования разрабатывалась на основе информации о максимальной скорости роста опухоли. Диапазоны скорости роста опухоли по периоду удвоения, приведены в единичных литературных источниках [13-15]. Полученные собственные расчетные характеристики периодики удвоения не противоречили литературным. При интеграции данных минимальный период удвоения объема ЗН в среднем составил: для нефробластомы 11 сут, для нейробластомы 13 сут, для гепатобластомы – 10 сут. Следовательно, в изучаемой группе опухоль могла расти, начиная с 1см<sup>3</sup> и до объема первичной визуализации, как минимум 2,9-3,3 месяцев при поражении почки, 2,4-3,0 месяца при гепатобластоме и 1,9-3,4 месяца – при нейробластоме. Для эффективной диагностики ЗН период необходимого визуализационного контроля, по крайней мере, не должен превышать время роста опухоли с 1см<sup>3</sup> до момента появления первых клинических симптомов.

Таким образом, установленные минимальные интервалы эффективной диагностики злокачественной абдоминальной опухоли с использованием ультразвука у грудных детей должны быть не более 1,9-2,9 месяцев между исследованиями (ориентировочно 2-3 месяца в зависимости от нозологической формы).

В объединенной группе была установлена корреляция между объемом опухоли и возрастом: коэффициент  $r=0,50$  ( $p<0,05$ ) свидетельствовал о наличии прямой средней силы связи. Мы предположили, что клиническая фаза роста ЗН с 4-9 разовым диапазоном удвоений, начиная с 1 см<sup>3</sup>, может быть описана логистической или экспоненциальной функциями, представляющими подобные для восходящих участков кривых роста данные из области значений. Аппроксимация данных показала, что обе модели, как и предполагалось, обладали сходными характеристиками. Однако, ввиду небольшой величины статистической значимости в обоих случаях ( $R^2<0,3$ ) аппроксимирующие функции не могли адекватно описывать биологическую закономерность, и с их помощью экстраполировать переменные не представлялось возможным.

Понимая, что экстраполяцию следует рассматривать как математический инструмент лишь начала построения окончательных прогнозов, нами все же была сделана еще одна попытка обосновать приемлемый возраст для первичного обследования грудного ребенка на предмет наличия ЗН. Для расчетов использовали уравнение 2. Было очевидно, что оптимальный возраст должен соответствовать минимально возможному числу доклинических абдоминальных ЗН объемом менее 1 см<sup>3</sup> (когда УЗИ не эффективно) и опухолей объемом более 250-300 см<sup>3</sup> (когда наблюдается рост числа продвинутых стадий, либо возникает угроза разрыва опухоли). С другой стороны, на практике минимальные фактически диагностируемые объемы абдоминальных опухолей у младенцев значительно превышают принятый в качестве порогового 1 см<sup>3</sup>. Так, для выше указанных нозологий они составили по результатам усреднения трех

минимальных значений 22см? (ЗН почек), 7см? (нейробластома) и 38см? (гепатобластома). При индивидуальной экстраполяции популяционного возраста младенцев до величин, соответствующих минимальным фактически диагностированным усредненным объемам, получен достаточно узкий, приемлемый для раннего диагностического охвата усредненный диапазон (99-119 дней или 3-й месяц жизни) с нормальными распределениями значений для каждой нозологической группы.

*Заключение.* Значительные фактические объемы первично визуализируемых абдоминальных ЗН у грудных детей требуют разработки методологии их ранней постнатальной диагностики. Стратегические направления такой методологии (разработка специальных образовательных программ для врачей-педиатров, более широкое внедрение ультразвуковой диагностики и ультразвукового скрининга в повседневную практику) обозначены авторами в работе [7]. Полученные в ходе настоящего исследования данные, а это возраст первичного скрининга – 3-й месяц жизни младенца с периодичностью последующих осмотров 2-3 месяца при соответствующем организационном обеспечении позволяют практически реализовать хронологические аспекты требуемой методологии.

## Литература

1. *International incidence of childhood cancer: IARC scientific publications/ D. Parkin [et al.], v.II, Lyon, 1998. - P. 144.*
2. *J.G.Gurney, M.A.Smith, J.A.Ross. Cancer among infants. SEER pediatric monograph. 1998. - P.149-156.*
3. *Kaatsch P., Spix C. German childhood cancer registry. Annual report 2005 (1980-2004). Mainz. 2006, 78 p.*
4. *Особенности заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в Республике Беларусь. С.В. Петрович, О.В. Алейникова, Е.С. Лапотентова и др. Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. 2004. - № 1. - С. 3-11.*
5. *Савва Н.Н., Зборовская А.А., Алейникова О.В. Злокачественные новообразования у детей Республики Беларусь: заболеваемость, выживаемость, смертность, паллиативная помощь. Минск, РМНБ, 2008, 184 с.*
6. *Зборовская А.А., Алейникова О.В.. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей Республики Беларусь / Материалы IV Съезда онкологов Республики Беларусь // Онкологический журнал. – 2011. - №3. -С. 161-162.*
7. *Качанов Д.Ю., Крючко Н.В., Абдуллаев Р.Т. и др. Медико-частотные характеристики злокачественных новообразований у детей первого года жизни в*

- Московской области (популяционное исследование) // Онкогематология. - 2010.- №2.- С55-62.
8. Pearson A.D. J. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial // *Lancet Oncol.* -2008. – V9. – P. 247–256.
  9. Baun J, Garsia K. Prenatal Diagnosis of Neuroblastoma: Color Doppler Imaging May Increase Accuracy // *Journal of diagnostic medical sonography.* – 2004. - V. 20. - P. 1-4.
  10. [Sbragia L](#), [Paek BW](#), [Feldstein VA](#) et al. Outcome of prenatally diagnosed solid fetal tumors // *J Pediatr Surg.* - 2001. – V. 36(8). – P.1244-1247.
  11. [Kamil D](#), [Tepelmann J](#), [Berg C](#) et al. Spectrum and outcome of prenatally diagnosed fetal tumors // *Ultrasound Obstet Gynecol.* - 2008.- V.31(3). – P.296-302/
  12. Ozono S, Miyao N, Igarashi T et al. Tumor Doubling Time of Renal Cell Carcinoma Measured by CT: Collaboration of Japanese Society of Renal Cancer // *Jpn J Clin Oncol.* - 2004. – V. 34(2). -P. 82–85.
  13. Cell, Tissue and Tumor Kinetics. Part of the course: [Principles of Radiation Interactions. Fall 2004.](#) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.wepapers.com/course\\_view/60/Principles\\_of\\_Radiation\\_Interactions,\\_Fall\\_2004/Courses/384/](http://www.wepapers.com/course_view/60/Principles_of_Radiation_Interactions,_Fall_2004/Courses/384/)
  14. [Panetta J.C](#), [Schaiquevich P](#), [Santana V.M](#), [Stewart C.F](#). Using pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling and simulation to evaluate importance of schedule in topotecan therapy for pediatric neuroblastoma // *Clin Cancer Res.* - 2008. – V.14(1). – P.318-325.
  15. Бегун И.В.. Типичные злокачественные опухоли почек у грудных детей: клинико-анамнестические и сонографические аспекты опухолевого роста // *Детская онкология.* – 2010. - №4. – С. 17-23.

## РАБОЧИЙ АЛГОРИТМ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ АБДОМИНАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ У ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ

**Бегун И.В., Зборовская А.А., Тарасевич Р.А., Папкевич И.И., Горовикова М.М.**

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

За последние 10 лет произошли значительные изменения в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗН) у детей первого года жизни [1, 2]. За период 2001-2010 годы, в данной возрастной группе отмечен самый высокий темп прироста заболеваемости – 2,63% в год [3], что может свидетельствовать о значительном улучшении диагностических

возможностей, и прежде всего – ультразвукового исследования (УЗИ). Нейробластомы надпочечника и забрюшинного пространства составляют более 30% случаев ЗН у детей первого года жизни, а опухоли почек и печени на первом году жизни имеют самые высокие по возрасту показатели заболеваемости, составляя около 10% и 3%, соответственно [4, 5]. Эти эмбриональные опухоли даже в клинической фазе роста, достигнув определенных размеров, чтобы быть зафиксированными при помощи методов медицинской интроскопии, часто длительно не вызывают видимых объективных изменений.

В 40% случаев наличия злокачественных новообразований у детей в неонатальном периоде (при заболеваемости 1,88-3,65 на 100 тыс. рожденных живыми) опухоль может быть выявлена уже при рождении [6]. Экстраполировав данные на популяцию грудных детей можно предположить (при заболеваемости в развитых странах 22,3-24,8 на 100 тыс.), что у одного ребенка из не более, чем 25 с диагностируемым злокачественным новообразованием (4%) объективно констатируется клиническая фаза внутриутробного роста опухоли. Естественно, данная частота может варьировать в зависимости от нозологической формы. Так, для гепатобластомы она составила около 15%. В связи с этим, особого внимания заслуживает пренатальная диагностика. Однако, по данным различных авторов, большинство опухолей, диагностируемых пренатально с помощью УЗИ, являются доброкачественными [7]. Лишь 9-28% ЗН диагностируется пренатально (для основных абдоминальных нозологических форм) от впоследствии установленных опухолей у младенцев [8, 9, 10]. По собственным неопубликованным данным плановое пренатальное УЗИ в 95% случаев не позволяло выявить злокачественную абдоминальную опухоль, диагностируемую впоследствии при фактических объемах ее первичной визуализации 250 см<sup>3</sup> и более в среднем в 43% случаев (для нейробластомы - 24%, гепатобластомы - 50%, опухолей почек - 76%). Такая

ситуация может характеризовать как определенные диагностические резервы пренатального УЗИ, так и темпы пре/постнатального роста ЗН.

С учетом значительного объема диагностируемой у грудного ребенка абдоминальной злокачественной опухоли нами разработан алгоритм первичной диагностики абдоминальных новообразований, в котором учитываются результаты как пренатального, так и постнатального исследований (рисунок). Базовым элементом такого алгоритма могут являться данные пренатально проведенного УЗИ. Предполагаются следующие возможные варианты результатов этого исследования: 1 - пренатальное выявление образования почки, печени, забрюшинного пространства объемом менее 10 куб. см. без регистрации сосудистых паттернов; 2 - пренатальное выявление объемного образования почки, печени, забрюшинного пространства объемом более 10 куб. см. с или без сосудов, или менее 10 куб.см, но с сосудами в структуре; 3 - пренатально - плод без опухолевой патологии, но входящий в группу риска возникновения злокачественного новообразования; 4 - пренатально - без опухолевой патологии. В группу риска должны входить беременные с семейным опухолевым анамнезом по конкретным нозологическим формам, подвергшиеся воздействию вредных влияний во время беременности (например, рентгенологические исследования) [11]. Критический объем 10 см<sup>3</sup> выбран как средний объем пренатально диагностируемой с помощью УЗИ забрюшинной нейробластомы (наиболее часто диагностируемом злокачественном новообразовании) при ее усредненном для трех срезов линейном размере 2,7 см, что, в свою очередь, в 1,2-1,4 раза меньше приводимых в литературе размеров опухоли [12,13]. Прирост объема опухоли в 5 см<sup>3</sup> ассоциирован с увеличением ее линейных размеров примерно на 4 мм. Измерения размеров опухоли в диапазоне ниже этого значения приводят к росту, как между исследовательской, так и внутри исследовательской вариабельности данных.



Постнатальная диагностика и динамическое наблюдение должны проводиться путем выполнения серии УЗИ. Постнатальное ультразвуковое диагностическое сканирование служит как методом выбора при наличии пальпируемого образования в животе ребенка, так и системообразующим, динамичным видом исследования при доклиническом установлении диагноза абдоминального злокачественного новообразования. По собственным данным к настоящему времени УЗИ является методом первичной инструментальной визуализации абдоминальной опухоли у грудных детей в абсолютном большинстве случаев. Периодика проведения диагностических исследований на первом году жизни устанавливалась исходя из значений предполагаемого диапазона скорости роста эмбриональной опухоли и в соответствие со степенью ее васкуляризации. Кроме того, учитывалась возможность спонтанной регрессии, по крайней мере, для нейробластомы.

Настоящее исследование входит в разрабатываемый комплекс мероприятий, направленных на повышение эффективности выявления абдоминальных злокачественных опухолей у младенцев на ранних стадиях.

## Литература

1. Особенности заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в Республике Беларусь. С.В. Петрович, О.В. Алейникова, Е.С. Лапотенцова и др. Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. 2004,- № 1,- С. 3-11.
2. Савва Н.Н., Зборовская А.А., Алейникова О.В. Злокачественные новообразования у детей Республики Беларусь: заболеваемость, выживаемость, смертность, паллиативная помощь. Минск, РМНБ, 2008, -184 с.
3. А.А. Зборовская, О.В. Алейникова. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей Республики Беларусь / Материалы IV Съезда онкологов Республики Беларусь // Онкологический журнал. – 2011. - №3. - С. 161-162.
4. J.G.Gurney, M.A.Smith, J.A.Ross. Cancer among infants. SEER pediatric monograph.- 1998 - P.149-156.
5. P.Kaatsch, C. Spix. German childhood cancer registry //Annual report .- 2005 (1980-2004). Mainz.- 2006,- 78 p.
6. А.М. Ожегов. Особенности эпидемиологии, диагностики и прогноза злокачественных опухолей у детей первого года жизни. Практическая медицина. – 2010, -№6. - С.44-49.
7. [Kamil D](#), [Tepelmann J](#), [Berg C](#) et al. Spectrum and outcome of prenatally diagnosed fetal tumors // [Ultrasound Obstet Gyneco](#) – 2008. - V.31(3)- P. 296-302.
8. Hart Isaacs. Fetal and neonatal hepatic tumors // Journal of Pediatric Surgery- 2007. – V. 42. – P. 1797–1803.

9. Hart Isaacs. *Fetal and neonatal renal tumors* // *Journal of Pediatric Surgery*. - 2008. –V. 43. – P. 1587–1595.
10. Dhir S., Wheeler K. *Neonatal neuroblastoma* // *Early Human Development*. - 2010- V. 86.- P. 601–605.
11. Л.Г. Соленова. Факторы онкологического риска у детей и подходы к профилактике их воздействия. *Педиатрия*. - 2011,- том 90, -№ 4, - С. 120-126.
12. A. R. Capelanes, G. Valero, P. Jeanty. *Neuroblastoma*. 2001. Режим доступа: [[www.thefetus.net/](http://www.thefetus.net/)].
13. *Врожденные пороки развития: пренатальная диагностика и тактика*. Под. ред. Петриковский Б.М., Медведев М.В., Юдина Е.В.- М.: Реальное Время, 1999. - 256 с.

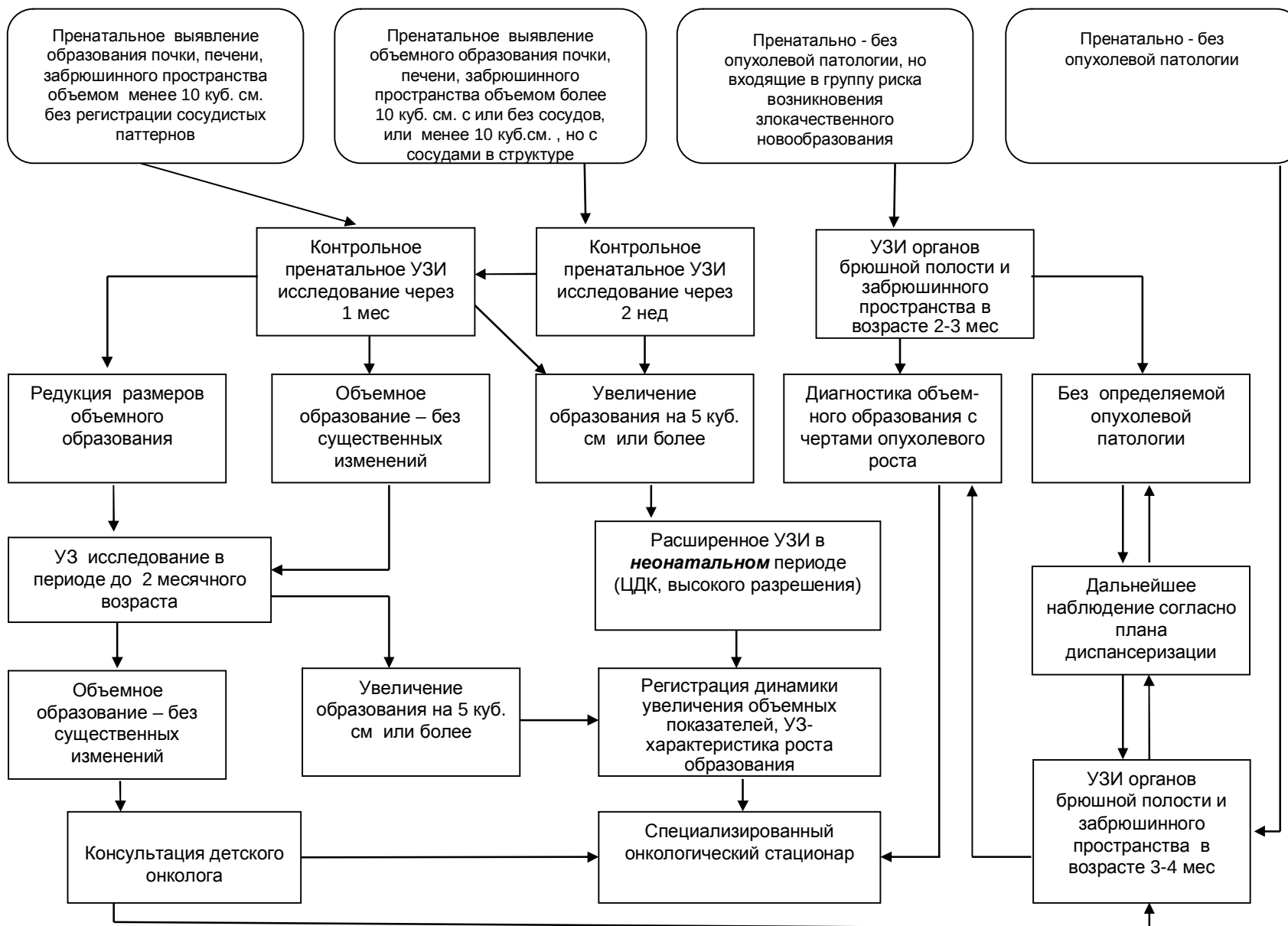


Рисунок - Рабочий алгоритм первичной УЗ-диагностики абдоминальных новообразований у грудных детей

# **ОЦЕНКА АКТИВАЦИИ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК, ЭКСПАНСИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ**

***Вашкевич Е.П., Шман Т.В.***

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

Способность естественных киллерных (ЕК, CD3-CD56+) клеток к цитотоксической активности без предварительной сенсibilизации дает им преимущество перед Т лимфоцитами в иммунотерапии онкологических заболеваний. Эффективность лизиса опухолевых клеток естественными киллерами зависит от соотношения между данными эффекторами и мишенями. Однако трудности получения ЕК клеток в достаточном количестве являются препятствием к их активному использованию в терапии. Применяемые в настоящее время способы наращивания ЕК клеток (из селектированных CD3-CD56+ лимфоцитов, в составе моноклеарных клеток периферической крови с помощью цитокинов, различных фидерных клеток и др.) позволяют не только получить необходимое количество данных эффекторов, но и повысить их цитотоксическую активность [1-6]. Целью нашей работы был анализ экспансии, активации и цитотоксического действия ЕК клеток при их культивировании в составе моноклеарных клеток периферической крови и в чистой популяции ЕК в присутствии интерлейкина (ИЛ)-2, -15 и -21.

*Материалы и методы.* Объектом исследования являлись ЕК клетки и моноклеарные клетки периферической крови (МНК) здоровых доноров. МНК выделяли на градиенте плотности, дважды отмывали в культуральной среде. Выделенные МНК (n=14) культивировали в среде IMDM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и антибиотиков в концентрации 0,5 млн/мл в течение 21 суток с еженедельной

сменой среды без/с добавлением следующих цитокинов: ИЛ-2 (500 МЕ/мл), ИЛ-15 (10 нг/мл), ИЛ-2+ИЛ-15 (500 МЕ/мл и 10 нг/мл соответственно).

Селекцию ЕК клеток проводили иммуномагнитным методом с использованием коктейля специфических антител и магнитных частиц. Выделенные данным способом ЕК клетки (n=7) культивировали в среде АИМ-V с добавлением 10% АВ сыворотки человека, L-глутамина и антибиотиков в концентрации 1 млн/мл в течение 21 суток со сменой среды каждые 3-4 дня без/с добавлением следующих цитокинов: ИЛ-2 (1000 МЕ/мл), ИЛ-15 (10 нг/мл), ИЛ-2+ИЛ-21 (1000 МЕ/мл и 10 нг/мл соответственно), ИЛ-15+ИЛ-21 (10 нг/мл и 10 нг/мл соответственно).

На 7, 14 и 21 сутки определяли прирост клеток в культуре с использованием красителя трипанового синего; субпопуляционный состав лимфоцитов и противоопухолевую активность определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Для оценки субпопуляционного состава, в т.ч. активации и чистоты селекции, исследуемые клетки до и после культивирования инкубировали со специфическими моноклональными антителами (мАТ) к CD3-FITC, CD56-PC5, CD69-PE/PC7, NKp44-PE (CD336).

При определении противоопухолевой активности в день постановки теста клетки-мишени (опухолевая линия К-562) отмывали в культуральной среде, окрашивали карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинилмидил эфиром (КФСЭ) и инкубировали в течение 20 минут. Затем клетки отмывали полной питательной средой, ресуспендировали в ней и смешивали с клетками-эффекторами, в качестве которых использовали МНК (соотношения эффектор:мишень составили 10:1, 20:1, 40:1) или селектированные ЕК клетки (соотношения эффектор:мишень составили 1:1, 2:1, 5:1). Цитотоксический тест проводили в течение 4-х часов. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид (ПИ). При анализе клетки-мишени выделяли по флуоресценции КФСЭ, количество погибших клеток определяли по окрашиванию ПИ.

Для оценки дегрануляции цитотоксические клетки смешивали с линией К-562 в соотношении 1:1, в культуру добавляли МАТ к CD107a-PE. После 1 часа инкубации в клеточную смесь добавляли монензин для стабилизации антигена CD107a на поверхности клеточной мембраны эффекторов. По окончании всего процесса культивирования (4 часа) клетки окрашивали антителами к CD3-FITC, CD56-PC5, затем отмывали в ФСБ и анализировали количество CD107a+ клеток среди ЕК.

*Результаты.* При оценке экспансии ЕК клеток в составе МНК наибольший прирост исследуемых клеток был выявлен в присутствии как ИЛ-2 и ИЛ-15, так и их комбинаций на 14-е сутки культивирования, после чего наблюдали снижение эффективности экспансии клеток. Так количество ЕК клеток на 14-е сутки в присутствии ИЛ-2 увеличивалось в  $5,2 \pm 1,9$  раза, ИЛ-15 – в  $5,2 \pm 1,8$  раза, сочетания ИЛ-2 и ИЛ-15 – в  $4,6 \pm 1,6$  раз по сравнению с числом ЕК клеток на 0-й день (Рис. 1А). Достоверных различий в приросте исследуемых клеток в зависимости от выбранного цитокина – ИЛ-2 и/или ИЛ-15 – выявлено не было.

При экспансии селектированных клеток также наблюдали активный рост ЕК клеток на 2-й неделе культивирования, который увеличивался к 21-м суткам. Так, на 21-е сутки инкубации в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 прирост ЕК клеток составил  $13,6 \pm 3,3$  и  $12,5 \pm 3,0$  раз соответственно, при добавлении ИЛ-21 к ИЛ-2 или ИЛ-15 –  $18,0 \pm 5,2$  и  $17,1 \pm 4,9$  раз соответственно (Рис. 1Б). При этом чистота популяции ЕК клеток после экспансии на 21-е сутки составила более 80%. В контрольных образцах без добавления цитокинов роста ЕК не наблюдалось.

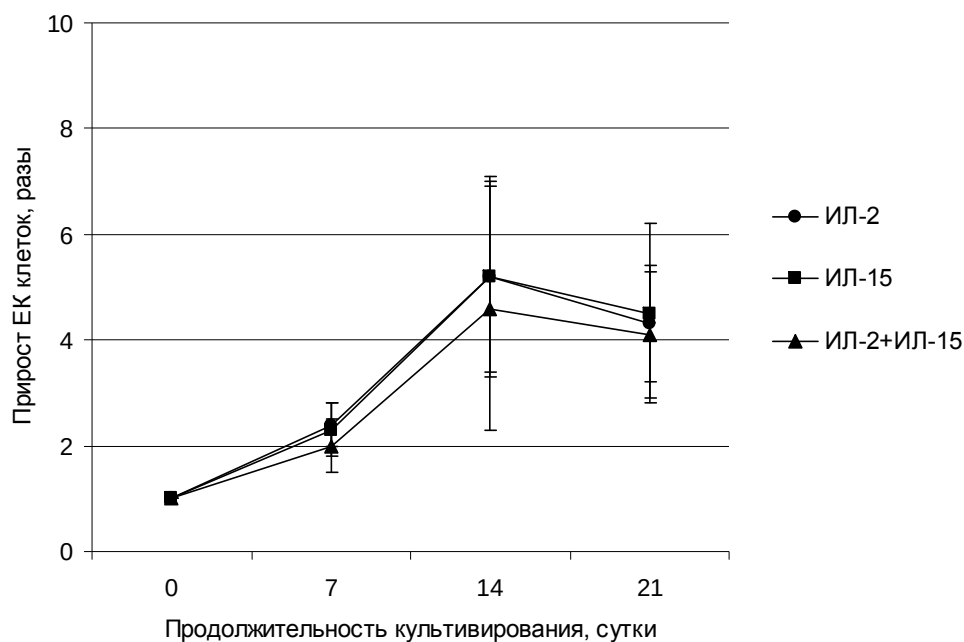
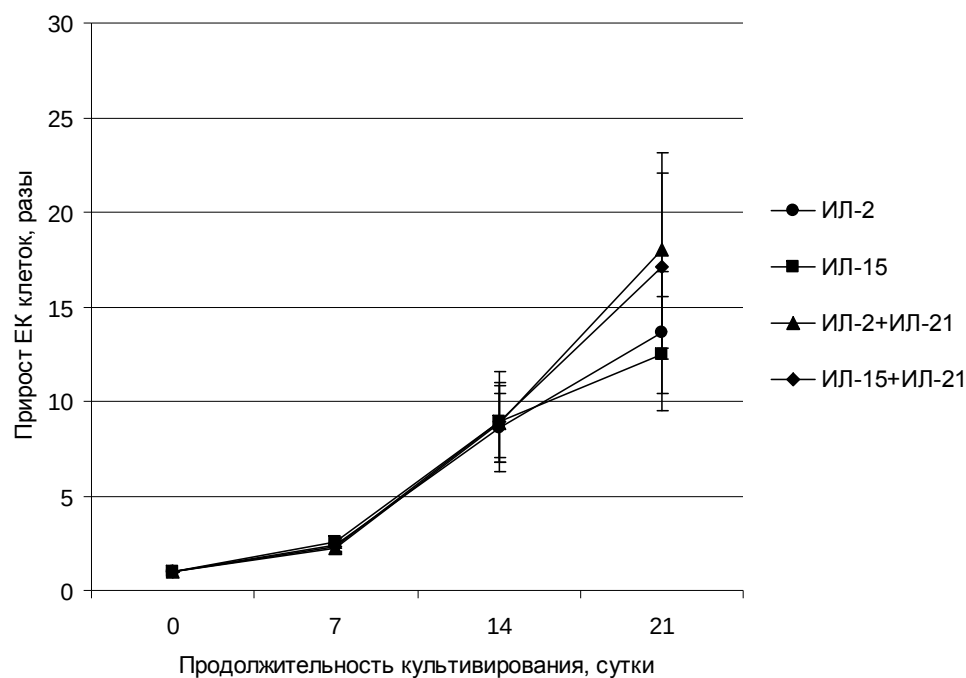
**А****Б**

Рисунок 1 – Экспансия ЕК клеток среди МНК (А) и в чистой популяции (Б).

Экспансия с использованием исследуемых цитокинов и их комбинаций также достоверно повышала процент CD69<sup>+</sup> и NKp44<sup>+</sup> ЕК клеток. Рецепторы CD69 и NKp44 являются маркерами активации и их экспрессия увеличивается при стимуляции лимфоцитов [6-8]. Полученные результаты были достоверны для ЕК клеток, экспансированных с помощью цитокинов как в составе МНК, так и в чистой популяции. Было показано, что процент CD69<sup>+</sup> ЕК клеток повышался с 4% на 0-й день более чем 80% на 7-е сутки в

присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 и оставался высоким на протяжении всего периода культивирования МНК (Рис. 2А). При культивировании селектированных клеток максимальный процент CD69+ ЕК получили на 21-е сутки инкубации с ИЛ-2 и ИЛ-15, который составил более 90% (Рис. 2Б). При этом добавление ИЛ-21 либо комбинация ИЛ-2 и ИЛ-15 не способствовали дополнительному усилению активации. Исследуемые цитокины также повышали процент NKp44+ ЕК клеток.

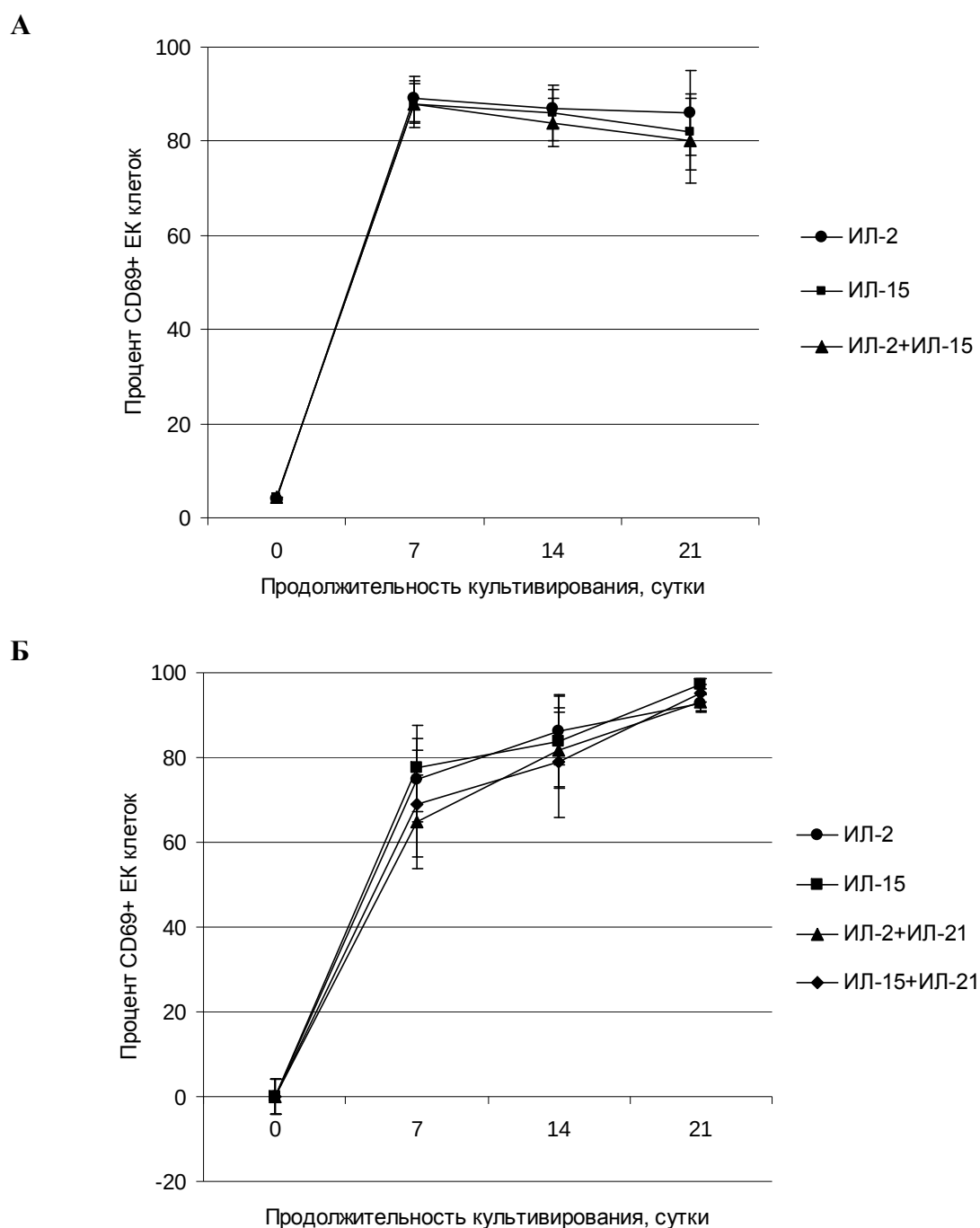


Рисунок 2 – Активация ЕК клеток среди МНК (А) и в чистой популяции (Б).



При анализе прямого противоопухолевого действия получено, что при экспансии как МНК, так и селектированных ЕК клеток, лизис клеток-мишеней повышался в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 на 7-е, 14-е и 21-е сутки наблюдения по сравнению с лизисом К-562, определенным на 0-й день. Комбинация ИЛ-2 и ИЛ-15, их сочетание с ИЛ-21 достоверно не способствовали усилению противоопухолевой активности ЕК (Рис. 3).

А

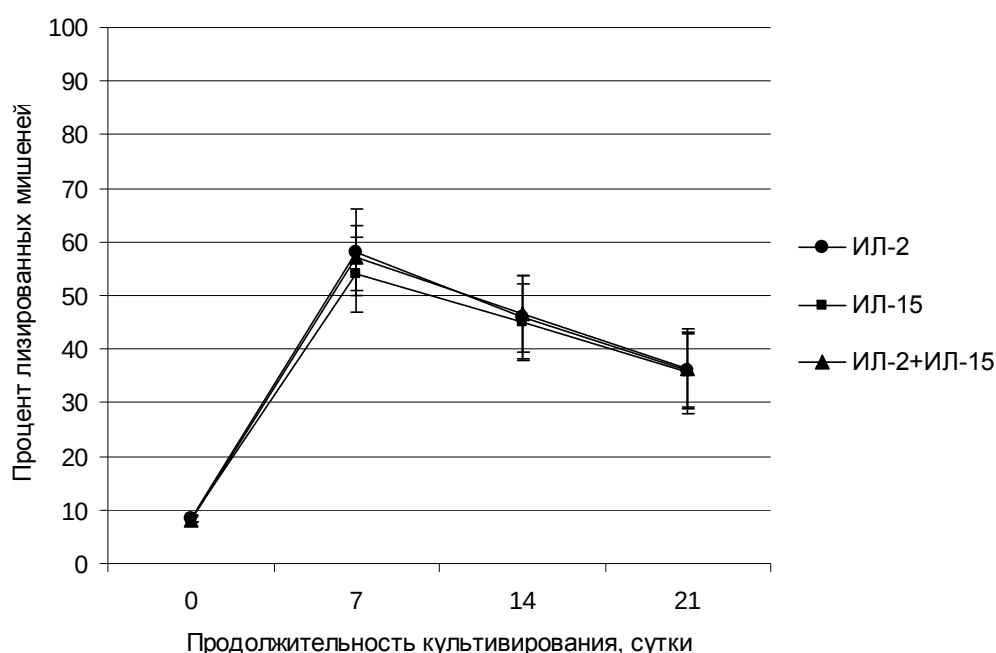


Рисунок 3А – Цитотоксическая активность ЕК клеток среди МНК (А).  
Соотношение эффектор: мишень составило 20:1 (А)

Б

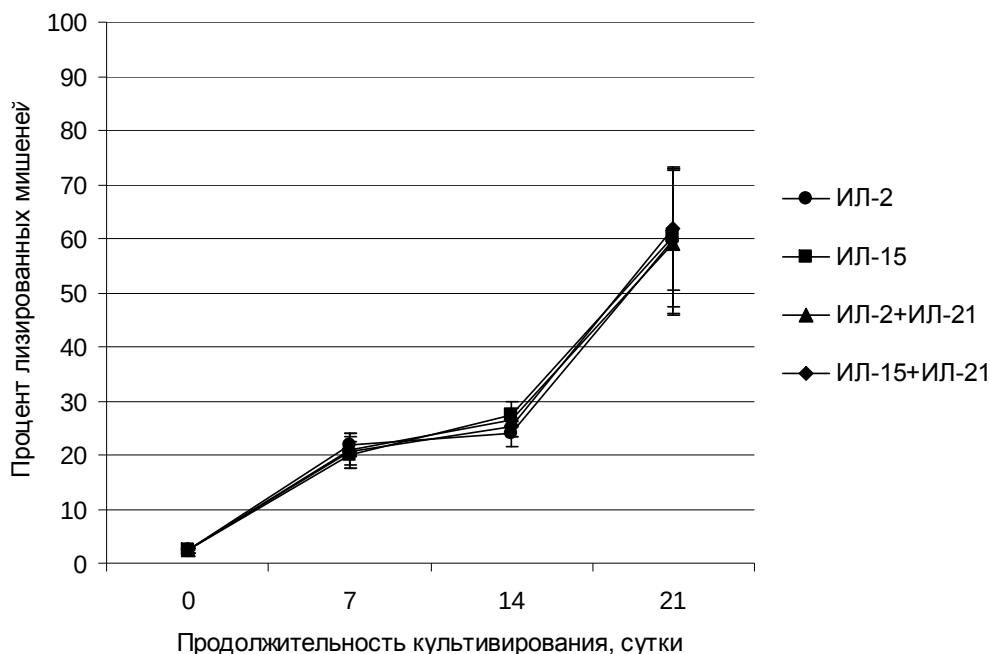


Рисунок 3Б – Цитотоксическая активность ЕК клеток в чистой популяции (Б).  
Соотношение эффектор: мишень составило 5:1 (Б).

Для оценки количества активных клеток-эффекторов была определена дегрануляция ЕК клеток по экспрессии маркера CD107a, который является белком мембраны литических гранул цитотоксических клеток и обнаруживается на их поверхности во время активации [9-11]. Данный метод показал, что инкубация ЕК клеток в присутствии опухолевой линии К-562 способствовала достоверному повышению процента ЕК клеток, экспрессирующих CD107a. Дополнительная стимуляция эффекторов в присутствии ИЛ-2, -15 или их сочетания с ИЛ-21 также приводила к увеличению экспрессии CD107a на исследуемой популяции лимфоцитов.

**Заключение.** Проведенные исследования показали возможность экспансии ЕК клеток *in vitro* в присутствии ИЛ-2 и/или ИЛ-15 либо их комбинации с ИЛ-21 в культуре чистой популяции CD3-CD56+ лимфоцитов и в составе МНК. Использование данных цитокинов способствовало повышению активации и противоопухолевого действия ЕК клеток. Прирост ЕК клеток в чистой популяции был более эффективен по сравнению с приростом клеток, культивируемых в составе МНК.

## Литература

1. Cho D., Campana D. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy // *Korean J. Lab. Med.*- 2009.- V. 29.- P. 89-96.
2. Voskens C.J., Watanabe R., Rollins S. et al. Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody direct cellular cytotoxicity // *J. of Exp. Clin. Cancer Res.*- 2010. - V. 29. -P. 134-1146.
3. Koehl U., Esser R., Zimmermann S. et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children // *Klin. Padiatr.*- 2005.- V. 217. –P-. 345-350.
4. Berg M., Lundqvist A., McCoy P.J.R. et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic against tumor cells // *Cytotherapy.*- 2009. -V. 11. - P. 341-355.
5. Dunne J., Linch S., O'Farrelly C. et al. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15 // *J. of Immunol.* 2001 -. V. 167. - P. 3129-3138.
6. Condiotti R., Zakai Y.B., Barak V., Nagler A. Ex vivo expansion of CD56<sup>+</sup> cytotoxic cells from human umbilical cord blood // *Exp. Hematol.*- 2001.- V. 29. - P. 104-113.
7. Simms P.E., Ellis T.M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 1996. -V. 3. - P. 301-304.
8. Vitale M., Bottino C., Sivori S. et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis // *J. Exp. Med.*-1998.- V. 187.- P. 2065-2072.
9. Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation // *J. of Immunol. Methods.* - 2003.- V. 281. - P. 65-78.
10. Penack O., Gentilini C., Fischer L. et al. CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>neg</sup> cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets // *Leukemia.* - 2005. - V. 19. - P. 835-840.
11. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity // *J. of Immunol. Methods.* – 2004. - V. 294. - P. 15-22.

## МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЕМОФИЛИЧЕСКОЙ АРТРОПАТИИ

**Волкова Л.И., Качан Г.Л.**

Белорусская медицинская академия последипломного образования

Минск, Беларусь

Диагностика гемофилии основывается на клинической симптоматике заболевания, данных лабораторного обследования пациента и инструментальных методах исследования осложнений. Известно, что повторные внутрисуставные кровоизлияния приводят к развитию гемофилической артропатии. При этом наиболее часто поражаются крупные суставы: коленные, локтевые и голеностопные. Первичная диагностика и

мониторирование изменений в суставах необходимы для выбора терапевтической тактики. Для этого возможно использование различных современных инструментальных методов обследования. Выявляемые изменения в суставах зависят от степени тяжести гемофилии, возраста пациента и частоты внутрисуставных кровоизлияний. К наиболее часто встречающимся дегенеративным процессам относятся: кровоизлияния в сустав (гемартроз), отечность мягких тканей, эпифизарные разрастания, субхондральные кисты, узурация эпифизов[4]. Для оценки состояния сустава широко могут быть использованы современные визуализирующие методы: традиционная рентгенография, ультразвуковой метод исследования (УЗИ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) [2].

На протяжении многих десятилетий рентгенологический метод успешно использовался для объективной оценки стадии гемофилической артропатии. С помощью данного метода выявляются остеопороз, остеонекроз, разрастания эпифизов, расширение межсуставной щели в коленном суставе, кисты, нарушение конгруэнтности суставных поверхностей, ротация коленного и голеностопного сустава, а также сужение суставной щели на поздних стадиях. Начальные изменения при гемофилической артропатии - утолщение синовиальной оболочки и мягкотканые изменения - плохо диагностируются при рентгенологическом методе. В данный период деструкция хрящевой ткани не может быть четко визуализирована и основывается на таких изменениях, как сужение суставной щели и наличие неровности субхондральных поверхностей. Костные изменения в суставах при гемофилии появляются лишь на более поздних стадиях гемофилической артропатии. Кроме того, у детей оценка степени сужения суставной щели может быть затруднена из-за отсутствия предыдущих рентгенограмм. В то время как рентгенологический метод по-прежнему является высокочувствительным методом диагностики начала появления костных изменений, он менее информативен для оценки степени прогрессирования гемофилической артропатией, в том числе и у пациентов, получающих

вторичную профилактику. Следует помнить, что выявленные впервые костные рентгенологические изменения считаются необратимыми и, при отсутствии адекватной терапии, возможно прогрессирующими. Всемирная Федерация гемофилии рекомендует использовать рентгенологическую классификацию Pettersson et al. для оценки изменений в суставе не только при тяжелой гемофилии, но и при среднетяжелой и легкой [4].

Метод ультразвукового исследования (УЗИ)- является прогрессивным и информативным методом обследования мышечно-скелетной системы, не требующий седации маленького пациента во время обследования. Он широко применяется для оценки гемофилической артропатии, позволяет оценивать ситуацию в настоящий момент и в динамике, является безопасным. При УЗИ для визуализации доступны синовия, связки, мышцы и остеохондральные поверхности сустава. УЗИ также может быть использовано для диагностики кровоизлияния при остром гематрозе, для оценки прогрессирования или уменьшения гематом (межмышечных, внутри мышечных) и гемофилических псевдоопухолей. УЗИ часто используется перед выполнением магнитно-резонансной томографии.

МРТ является более преимущественным методом исследования гемофилических артропатий по сравнению с рентгенологическим, так как, позволяет получить больше информации о состоянии мягких тканей и изменениях хряща. МРТ выявляет кровоизлияние в сустав на ранних стадиях, кровотечение, гипертрофию синовиальной оболочки, отложение гемосидерина и незначительные повреждения хряща на стадии без сужения суставной щели. Более того, МРТ дает представление о значительных изменениях в суставе на поздних стадиях таких как: эрозии, субхондральные кисты, и хрящевые деструкции при сужении суставной щели [1]. Не смотря на высокую информативность МРТ при обследовании коленного сустава, данный метод не является чувствительным при обследовании голеностопного и локтевого сустава.

Компьютерная томография (КТ), как и МРТ, является полезным методом диагностики гемофилической псевдоопухоли, оценки ее протяженности и толщины капсулы, а также выявления повреждения близлежащих костных структур.

Таким образом, визуализирующие методы диагностики успешно используются для объективной оценки стадии гемофилической артропатии. Рентгенографические методы могут быть применены для мониторинга прогрессирования внутрисуставных дефектов, после впервые выявленного повреждения хряща или костной структуры. Ультразвуковое исследование является дополнительным методом оценки отслеживания изменения мягких тканей при артропатии. МРТ позволяет четко оценить ранние внутрисуставные изменения, но в меньшей степени поздние на фоне вторичной профилактики. Также МРТ является методом выбора для оценки патологических изменений гемофилической артропатии, стадирования процесса и отслеживания эффекта от проводимой терапии.

## Литература

1. Fodiadis N, Economou I, Haritante A et al. *The compatible MRI scoring system for staging of haemophilic arthropathy* // *Haemophilia*- 2008- V.14. – P.866-867
2. Jelbert A, Vaiya S, Fotialis N. *Imaging and staging of haemophilic arthropathy* // *Clin Radiol* 2008. - V. 64. - P.1119-1128.
3. Kerr R. *Imaging of musculoskeletal complications of hemophilia*// *Musculoskel Radiol* 2003. - V.7. – P.127-136.
4. Peterson H, Ahlberg A, Nilsson IM. *A radiologic classification of hemophilic arthropathy* // *Clin Orthop Relat Res*. – 1980. – V. 149. – P.153-159.

# **ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ПРИЧИНЫ ПРИ ЮВЕНИЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ 12-18 ЛЕТ**

<sup>1</sup>*Дмитриев В.В.,* <sup>2</sup>*Можейко Л.Ф.,* <sup>2</sup>*Гузей И.А.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии<sup>1</sup>

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Кафедра акушерства и гинекологии<sup>2</sup>

Минск, Беларусь

Первые клинические проявления маточных кровотечений пубертатного периода манифестируют в период становления менструального цикла. Основные причины, обусловленные нарушениями свертывания крови, вызваны нарушением функции тромбоцитов и, чаще всего, нарушениями в системе фактора Виллебранда. Функциональная активность тромбоцитов и уровень фактора Виллебранда в крови пациента зависят от общего состояния организма, приема лекарственных препаратов, физической нагрузки, перенесенных заболеваний, а также группы крови больного. На уровень активности фактора Виллебранда оказывает влияние и фаза менструального цикла. Поэтому после однократного исследования свертывающей системы крови без учета фазы цикла практически никогда не удастся отличить болезнь Виллебранда от дисфункциональных нарушений, обусловленных нарушениями гормонального фона и связанной с ним нарушением сократительной способности матки. Исследование гемостаза параллельно с оценкой гормонального фона у девочек-подростков в динамике менструального цикла позволяет отличить преходящие изменения свертывания крови, свойственные соответствующей фазе месячного цикла, от дефицита фактора Виллебранда или его функциональных нарушений, характерных для различных типов болезни Виллебранда.

Цель исследования: разработать модель лабораторной диагностики для выявления причины ювенильных маточных кровотечений у девочек-подростков 12-18 лет

Обследовано 145 пациенток в возрасте 12-18 лет, обратившихся в ГУ РНПЦДОГ за период 2010-2012 года. Критерии включения в исследование: длительные (более 7 дней) и обильные месячные (более 80 мл), рецидивирующие ювенильные маточные кровотечения (ЮМК), отсутствие эффекта от проводимой симптоматической и гормональной терапии по устранению гиперполименореи. Наличие одного из перечисленных признаков, зарегистрированного на протяжении 12 месяцев, предшествовавших обращению в ГУРНПЦДОГ, определяло показания для включения в исследование, оценки коагуляционного статуса и гормонального фона на 3-5 и 20-21 день месячного цикла.

Исследование гемостаза включало: регистрацию активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) по Саен (1968); протромбинового времени по Quick (1935) с расчетом активности факторов протромбинового комплекса и международного нормализованного отношения (МНО) с учетом чувствительности тромбопластина; тромбинового времени по Biggs, Macfarlane (1962); определение содержания плазменного фибриногена, коагулируемого тромбином. Одностадийным клоттинговым методом у всех пациентов регистрировали активность факторов VIII и IX. Регистрировали уровень белка, обладающего свойствами антигена фактора Виллебранда (Ag vWF) и ристоцетин-кофакторную активность (функциональную активность) фактора Виллебранда (vWF:RCo). Оба показателя определяли турбидиметрическим методом на коагулометре ACL-9000 (USA) диагностическими наборами фирмы Instrumentation Laboratory). Иммуноферментным фотохемилюминисцентным методом на анализаторе "Cobas e 411" фирмы «Roche Hitachi» с использованием оригинальных реагентов определяли содержание прогестерона, тестостерона,



фолликулостимулирующего гормона, пролактина и кортизола. У всех пациенток определена группа крови

Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по критерию Mann-Whitney Test (U), а для попарно связанных вариантов по парному критерию Вилкоксона (T). Значимыми признаны различия для  $P < 0,05$ . Для выявления взаимосвязи между фактом кровотечения с одной стороны и состоянием свертывания крови и гормональным статусом с другой стороны использованы непараметрические методы корреляционного анализа с определением коэффициента корреляции G. Для определения диагностического порога наиболее значимых показателей использован метод построения классификационного дерева принятия решения.

Для анализа были использованы показатели 16 пациенток с ЮМК на день исследования и 52 пациенток без признаков гиперполименореи, у которых параллельно были выполнены в полном объеме все необходимые исследования. Пациенты с доказанной болезнью Виллебранда на этапе первой фазы цикла в анализ включены не были. Для формулирования решающего правила по выявлению пациенток, у которых сочетанные изменения свертывания крови и гормонального фона могли быть причиной геморрагических осложнений в первую фазу цикла выполнено построение классификационного дерева принятия диагностического решения. Для построения классификационного дерева принятия решения привлечены признаки: уровень функциональной активности фактора Виллебранда, уровень тестостерона и прогестерона. Из 68 пациенток, чьи результаты параллельных исследований в первую фазу цикла включены в разработку, при уровне прогестерона более 1,75 нг/мл гиперполименорея имела место у 1 из 30 пациенток. При уровне прогестерона менее 1,75 нг/мл гиперполименорея имела место у 15 из 38 девочек-подростков данной подгруппы. Из 38 девочек при уровне активности фактора Виллебранда в диапазоне 30-39% гиперполименорею имели 5 из 6 пациенток (все 5

пациенток с О(І) групповой принадлежностью); при уровне активности фактора Виллебранда более 39% гиперполименорея отмечена у 10 из 32 подростков. Независимо от функциональной активности фактора Виллебранда из 32 пациенток гиперполименорея выявлена у 2 девочек с уровнем тестостерона менее 0,26 нг/мл, что в 10 раз меньше, чем в контроле  $2,0 \pm 0,8$  нг/мл. При уровне активности фактора Виллебранда, превышающем 39% и уровне тестостерона более 0,26 нг/мл 8 из 30 пациенток имели геморрагический синдром. Гиперполименорея у пациенток с низким уровнем прогестерона была взаимосвязана со снижением содержания тестостерона ( $\chi^2 = 4,7$ ;  $p=0,03$ ).

Во второй фазе цикла для анализа были использованы показатели 9 пациенток с ЮМК на день исследования и 57 пациенток без признаков геморрагических выделений из половых путей, у которых на момент составления отчета были выполнены в полном объеме все необходимые исследования, включая коагуляционный и гормональный статус. Для построения классификационного дерева принятия решения привлечены признаки, для которых характерна наиболее сильная степень корреляционной связи с фактом маточного кровотечения: уровень функциональной активности фактора Виллебранда, а так же уровень прогестерона и тестостерона по аналогии с первой фазой. Среди 66 пациенток, чьи результаты исследований использованы для расчетов, болезнь Виллебранда была доказана у 7 (уровень активности фактора Виллебранда менее 30%). Из 7 пациенток с болезнью Виллебранда 6 имели геморрагические выделения из половых путей. Уровень активности и/или содержания фактора Виллебранда у 59 превышал 30%, кровянистые выделения из половых путей со слов родителей имели место у троих пациенток. У 22 пациенток с уровнем активности фактора Виллебранда более 29% и содержанием тестостерона свыше 1,12 нг/мл геморрагический синдром отсутствовал. При содержании тестостерона менее 1,12 нг/мл и активности фактора Виллебранда 30%-35% только 1 пациентка из 3 имела геморрагический синдром. Две другие

пациентки с активностью фактора Виллебранда от 35 до 50% имели геморрагический синдром на фоне уровня тестостерона менее 1,12 нг/мл и снижения содержания прогестерона менее 1,55 нг/мл. Данное обстоятельство указывало на вероятность развития геморрагического синдрома на фоне гормональной дисфункции и снижения активности фактора Виллебранда.

Разработано решающее правило распознавания ситуации, при которой возможно дисфункциональное кровотечение:

#### 1. Первая фаза цикла

- Если уровень прогестерона превышает 1,75 нг/мл, то у пациенток, не имеющих болезни Виллебранда с уровнем активности фактора Виллебранда более 30%, гиперполименореи, как правило, не бывает

- Если уровень прогестерона менее 1,75 нг/мл, а активность фактора Виллебранда в первой фазе цикла изменяется в диапазоне 30-39%, то изменения свертывания могут быть одной причин гиперполименореи на фоне гормональной дисфункции практически у всех пациенток.

- Если уровень активности фактора Виллебранда в первой фазе цикла превышает 39%, то кровотечение из половых путей возможно у пациенток с уровнем

прогестерона менее 1,75 нг/мл и уровнем тестостерона менее 0,26 нг/мл.

#### 2. Вторая фаза цикла

- Геморрагические выделения из половых путей зарегистрированы у пациенток

с уровнем активности фактора Виллебранда менее 29% при болезни Виллебранда, независимо от гормонального фона.

- Если активность фактора Виллебранда превышает 30%, то геморрагические выделения из половых путей могут иметь место при уровне тестостерона менее 1,1 нг/мл у пациенток с уровнем прогестерона менее 1,55 нг/мл, что подтверждает дисфункциональный характер кровотечения.

В соответствии с рекомендациями американского общества гематологов диагноз болезни Виллебранда является доказанным, если зарегистрировано снижение содержания и/или активности фактора Виллебранда менее 30%. Диапазон содержания и/или активности 30-50% в соответствии с рекомендациями американского общества гематологов, экспертов национального Американского института по лечению заболеваний сердца, легких и крови [1] и английского гемофилического центра [2] исследователи рассматривают как “серую зону”, или зону сниженной функциональной активности и/или сниженного содержания фактора Виллебранда. Часть пациентов может иметь уровень фактора Виллебранда в этом диапазоне, но при этом не иметь клинического подтверждения заболевания. Данное обстоятельство указывает на необходимость уточнения уровня содержания и уровня активности фактора Виллебранда, выше которых пациентки с ювенильным маточным кровотечением в анамнезе в течение ближайшего года, не имели гиперполименореи на момент исследования в первую фазу цикла. Пациентки (n=94) с ЮМК в анамнезе на момент исследования не имели со слов родителей признаков гиперполименореи в первую фазу цикла при содержании и активности фактора Виллебранда 36% и более. Содержание фактора Виллебранда, представленное как медиана, 25 и 75 перцентили, для пациенток с O(I) группой крови составило 78 (50-100)% при минимальном уровне 36%, а максимальном значении 150%. Активность фактора Виллебранда для пациенток с O(I) группой крови составила 75 (52-102)% при минимальном уровне 37%, а максимальном уровне 155%. Содержание фактора Виллебранда, представленное для пациенток с A(II) группой крови составило 92 (75-110)% при минимальном уровне 39,5%, а максимальном значении 178%. Активность фактора Виллебранда для пациенток с A(II) группой крови составила 100 (70-120)% при минимальном уровне 40%, а максимальном уровне 160%. Из 8 пациенток с уровнем активности фактора Виллебранда 30-50% меноррагия была отмечена у 5 пациенток с O(I) и 1 пациентки с A(II)

групповой принадлежностью – у всех шести уровень и/или активность фактора Виллебранда изменялись в диапазоне от 30 до 40%. Для пациенток с В(III) и АВ(IV) групповой принадлежностью минимальное значение содержания и активности фактора Виллебранда, не имевших геморрагического синдрома на момент исследования, составляло не менее 50%. Данное обстоятельство позволяет расширить до 35% для пациенток с О(І)-групповой принадлежности и до 39% для пациенток с А(II), В(III) и АВ(IV) групповой принадлежностью, диагностический диапазон активности и содержания фактора Виллебранда, в пределах которых гиперполименорею рассматривают как клинический признак «скрытых» нарушений свертывания, связанных с конституциональной особенностью организма в виде болезни Виллебранда.

Таким образом, снижение уровня фактора Виллебранда в диапазоне 30-35% для пациенток О (І)-групповой принадлежности и в диапазоне 30-39% для пациенток с А(II), В(III) и АВ(IV) групповой принадлежностью является одним из наиболее часто встречающихся типов нарушений свертывания, способствующих ювенильному кровотечению на фоне гормональной дисфункции.

Верхний предел диагностического диапазона активности или содержания фактора Виллебранда, в пределах которого гиперполименорею рассматривают как клинический признак «скрытой» формы болезни Виллебранда, должен быть расширен с 30% до 36% для пациенток с О(І)-групповой принадлежностью и до 40% для пациенток с А(II), В(III) и АВ(IV) групповой принадлежностью.

## Литература

1. *National Heart, Lung, and Blood Institute. NHLBI / Von Willebrand Disease Expert Panel. Md.: U.S. Department of Health and Human Services; December 2007. // <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/index.htm>. Accessed ],*
2. *Pasi K.J., Collins P.W., Keeling D.M, et al Management of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization // Haemophilia.-2004. – V.10. – P.218-231.*

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И СХЕМА  
ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
ПРИ ЮВЕНИЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ  
У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ 12-18 ЛЕТ**

<sup>1</sup>*Дмитриев В.В.,* <sup>2</sup>*Можейко Л.Ф.,* <sup>2</sup>*Гузей И.А.*

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный  
медицинский университет». Кафедра акушерства и гинекологии  
Минск, Беларусь

Вопросы лечения и реабилитации пациенток с маточными кровотечениями весьма актуальны, т. к. рецидивы заболевания ухудшают прогноз в отношении генеративной функции, что является социальной и экономической проблемой. Часто очень трудно дифференцировать, в результате чего у девочек подростков возникает маточное кровотечение и что первично: гормональные нарушения или нарушения в системе свертывания.

Цель исследования: Обосновать и разработать протокол лабораторной диагностики нарушений свертывания и схему гемостатической терапии с использованием концентрата факторов свертывания для остановки дисфункциональных маточных кровотечений у девочек-подростков 12-18 лет.

*Материал и методы.* Обследовано 145 пациенток в возрасте 12-18 лет, обратившихся в ГУ РНПЦДОГ за период 2010-2012 года. Критерии включения в исследование: длительные (более 7 дней) и обильные месячные (более 80 мл), рецидивирующие ювенильные маточные кровотечения (ЮМК), отсутствие эффекта от проводимой симптоматической и гормональной терапии по устранению гиперполименореи. Наличие одного из перечисленных признаков, зарегистрированного на протяжении 12 месяцев, предшествовавших обращению в ГУРНПЦДОГ, определяло показания для включения в

исследование, оценки коагуляционного статуса и гормонального фона на 3-5 и 20-21 день месячного цикла.

Исследование свертывания крови включало: регистрацию хронометрических и структурных показателей свертывания крови. У всех пациенток определена группа крови

*Результаты исследования.* Проведено комплексное обследование, что позволило сформулировать протокол обследования пациенток и схему гемостатической терапии, необходимой для остановки кровотечения.

Причину ювенильного маточного кровотечения уточняют на основании изучения анамнестических данных, предшествовавшего лечения. Оценка жалоб и первичный осмотр позволяют выявить наличие или отсутствие ЮМК на момент обращения и его клинические проявления. Дополнительно уточняют наличие геморрагического синдрома иной локализации. Наличие геморрагического синдрома на момент обращения или его упоминание в анамнезе определяют показания для первичного диагностического исследования. Лабораторные исследования выполняют в первую неделю цикла, или при обращении за медицинской помощью по факту возникновения геморрагического синдрома, независимо от фазы цикла.

Первичный диагностический комплекс включает регистрацию показателей:

1. Активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) с расчетом отношения АПТВ пациент / АПТВ контроль .

2. Протромбиновое время (ПВ) Квика с расчетом активности факторов протромбинового комплекса и международного нормализованного отношения.

3. Уровень фибриногена крови.

4. Тромбоциты крови.

5. Активность фактора Виллебранда (ристоцетин-кофакторная активность – vWF:RCo).

6. Агрегационная активность тромбоцитов с конечной концентрацией индуктора:

- натриевая соль аденозиндифосфата  $5 \cdot 10^{-6}$  М/л и  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М/л.
- гидрохлорид адреналина  $5 \cdot 10^{-6}$  М/л.

7. При удлинении АПТВ или ПВ выполняют факторный анализ внешнего и внутреннего пути свертывания крови.

При уровне активности фактора Виллебранда менее 35% для пациенток O(I)-групповой принадлежности и менее 39% для пациенток с A(II), B(III) и AB(IV) групповой принадлежностью объем исследований расширяют с целью уточнения типа, или исключения болезни Виллебранда, для чего дополнительно определяют:

- содержание фактора Виллебранда (vWF:Ag);
- активность фактора VIII;
- агрегацию тромбоцитов с конечной концентрацией ристоцетина 0,8 мг/мл и 1,0 мг/мл.

Снижение в первую фазу цикла содержания фактора Виллебранда в сочетании со снижением его активности в диапазоне 30-35% для пациенток O(I)-групповой принадлежности и 30-39% для пациенток с A(II), B(III) и AB(IV) групповой принадлежностью является одним из наиболее частых типов нарушений свертывания крови, способствующих ювенильному кровотечению на фоне гормональной дисфункции. Другие типы нарушений свертывания, связанные со снижением уровня фибриногена, факторов свертывания крови V, VII, X, XI, XIII встречаются значительно реже.

Уровень активности фактора Виллебранда более 36% для пациенток O(I)-групповой принадлежности и более 40% для пациенток с A(II), B(III) и AB(IV) групповой принадлежностью в первую фазу цикла, и более 30% во вторую фазу цикла определяет показания для консультации детского гинеколога, оценки гормонального статуса и решения вопроса о назначении эстроген содержащих лекарственных средств.



Увеличение отношения АПТВ пациент / АПТВ контроль или международного нормализованного отношения (МНО) до 1,3 и выше определяет показания для ситуационной оценки активности факторов внутреннего (факторы VIII, IX, XI, XII), внешнего (факторы II, V, VII, X) пути свертывания крови, активности фактора XIII, или выявления эффекта волчаночного антикоагулянта, соответственно, независимо от этапа исследования. Отсутствие эффекта заместительной терапии эстроген-содержащими лекарственными средствами в данном случае подтверждает необходимость углубленного обследования пациентки.

Проведение консервативных мероприятий, минимизирующих кровопотерю женщины вследствие меноррагии, основано на использовании гормональных и гемостатических препаратов.

Женщинам, у которых меноррагия связана с нарушением свертывания крови, рекомендована специфическая гемостатическая терапия с учетом ведущего механизма коагуляционных нарушений. Несмотря на доказанный механизм нарушения свертывания крови, в качестве препаратов первой линии специалисты настоятельно рекомендуют гормональные препараты, антифибринолитики, а в отдельных случаях десмопрессаин.

В случае дисфункциональных маточных кровотечений у девочек подростков с нарушением свертывания крови оправдано в качестве стартовой терапии использование эстроген-содержащих лекарственных средств. При отсутствии эффекта гормональной терапии, или в случае продолжающейся меноррагии на фоне коррекции гормонального фона у пациенток с нарушением свертывания крови оправдана гемостатическая терапия с использованием концентрата факторов свертывания крови. Выбор лекарственного средства осуществляют с учетом ведущего механизма и степени выраженности нарушений.

Пациенткам с болезнью Виллебранда для возмещения дефицита фактора Виллебранда показаны лекарственные средства, содержащие концентрат фактора Виллебранда. Диагностический диапазон содержания

и/или активности фактора Виллебранда 30-35% для лиц с O(I) и 30-39% для лиц с A(II), групповой принадлежностью при наличии клинических проявлений геморрагического синдрома является критерием, позволяющим выделить данных пациенток в отдельную группу. Характерной особенностью пациенток данной группы является сочетанное нарушение гормонального статуса на фоне снижения уровня фактора Виллебранда, что стало причиной меноррагии. Снижение уровня и активности фактора Виллебранда, ниже указанных диагностических пределов при отсутствии эффекта заместительной гормональной терапии определяет показания для назначения лекарственного средства, содержащего определенное количество фактора Виллебранда с известным уровнем его активности. Однократное введение в дозе 25-30 МЕ/кг концентрата фактора свертывания крови VIII и фактора Виллебранда пациенткам с исходным уровнем фактора Виллебранда и его активности 30-40% с целью остановки дисфункционального маточного кровотечения позволило добиться гемостатического эффекта в течение первых 3-4 часов и прекратить гиперполименорею у всех девочек-подростков.

Введение в дозе 25-30 МЕ/кг концентрата фактора свертывания крови VIII и фактора Виллебранда пациенткам с исходным уровнем фактора Виллебранда и его активности 30- 40% не привело к повышению величины коагуляционных показателей, превышающих возрастную норму. Это указывает на отсутствие угрозы развития тромботических осложнений.

Варианты мероприятий по коррекции редких нарушений, связанных с дефицитом факторов свертывания крови у женщин с меноррагиями при отсутствии эффекта от гормональных препаратов, или в случае кровотечения, угрожающего жизни, в том числе во время и после родов:

- А\гипофибриногенемия. Для женщин с афибриногенемией показано введение лекарственного средства, содержащего концентрат фибриногена с целью поддержания уровня фибриногена не менее 1,0-1,5 г/л. На этапе родоразрешения уровень фибриногена не менее 1,5 г/л.

- Фактор II. С целью остановки кровотечения поддерживать уровень фактора II в пределах 20-30% путем введения концентрата факторов протромбинового комплекса в дозе 20-30 МЕ/кг

- Фактор V. С целью предотвращения кровотечения при врожденном или приобретенном дефиците фактора V вводят вирус-инактивированную СЗП в количестве, необходимом для поддержания активности фактора V в крови на гемостатическом уровне 15-25%

- Фактор VII. Для женщин с дефицитом фактора VII и положительным геморрагическим анамнезом и кровотечением требуется поддержание активности фактора VII на уровне не менее 10-20% путем введения rVIIa из расчета 15-30 мкг/кг

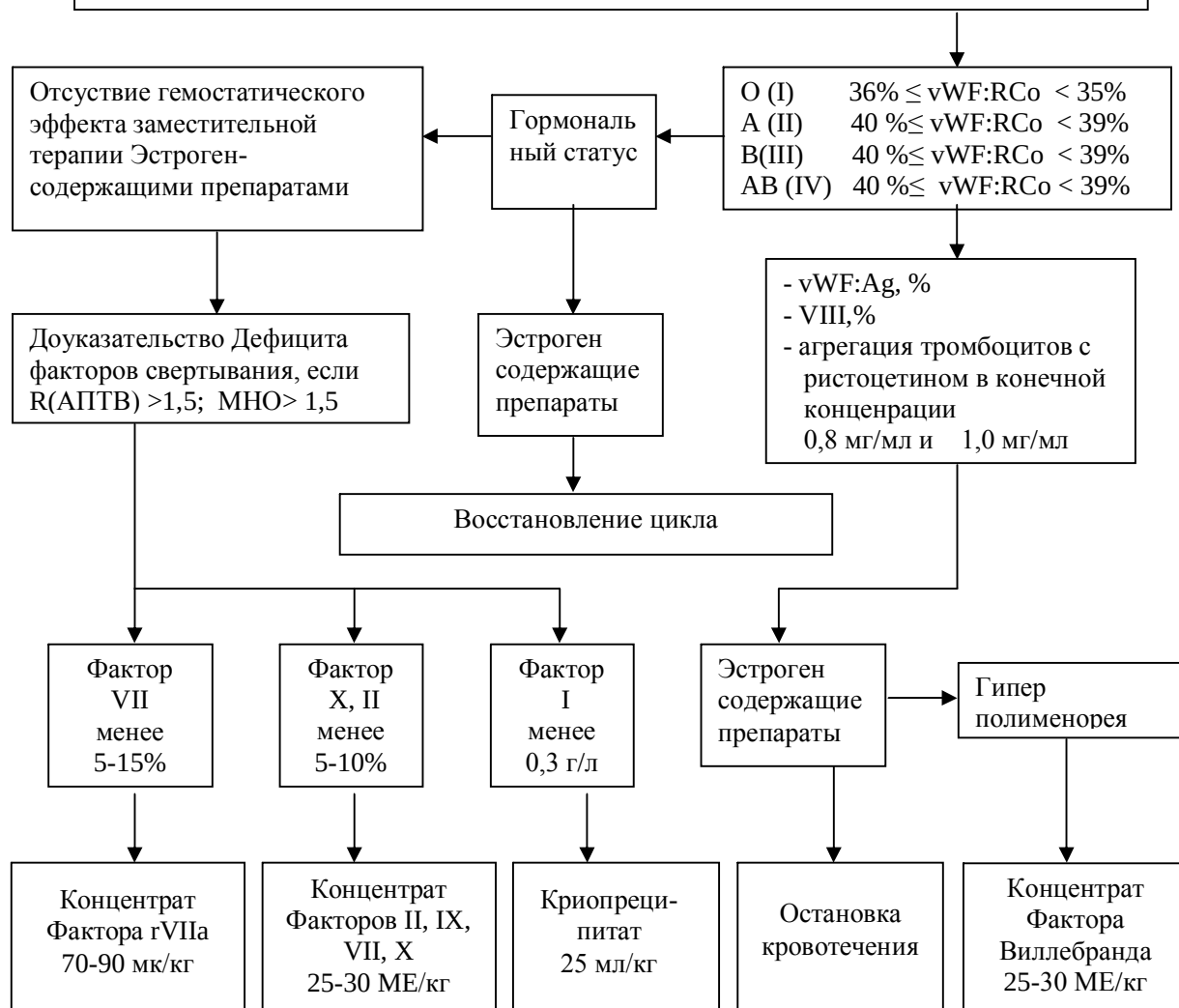
- Фактор X. Показан концентрат факторов протромбинового комплекса в количестве, позволяющем поддерживать гемостатический уровень FX более 10-20 %.

- Фактор XI. Рекомендовано использование транексамовой кислоты на протяжении 3-5 дней. Не допустимо введение транексамовой кислоты и концентрата фактора XI, во избежание тромбоза. В качестве альтернативного варианта вводят криоплазму.

- Фактор XIII. Поддержание активности фактора XIII в крови пациентки на гемостатическом уровне 20-30% путем введения концентрата фактора XIII или донорской криоплазмы.

Приведенные рекомендации представлены в виде схемы гемостатической терапии с использованием концентрата факторов свертывания для остановки дисфункциональных маточных кровотечений у девочек 12-18 лет

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Жалобы, <b>геморрагический анамнез</b> , прешествующее лечение, осмотр, <b>клиника ЮМК</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Лабораторное исследование                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 1. R (АПТВ)<br>2. Протромбиновое время, активность факторов протромбинового комплекса, МНО<br>3. Фибриноген крови<br>4. Тромбоциты крови<br>5. Активность фактора Виллебранда (vWF:RCo)<br>6. Агрегация тромбоцитов с индуктором в конечной концентрации<br>Адреналин $5 \cdot 10^{-6}$ М/л, АДФ 2,5 и $5 \cdot 10^{-6}$ М/л<br>7. R (АПТВ) > 1,3 – VIII, IX, XI, XII, XIII факторы<br>8. МНО > 1,3 – II, V, VII, X факторы,<br>9. Групповая принадлежность пациента по системе АВО. |



Протокол лабораторной диагностики и схема гемостатической терапии для остановки дисфункциональных маточных кровотечений

# ФАРМАКОКИНЕТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ У ПАЦИЕНТОВ В ЦИТОПЕНИИ С СЕПСИСОМ

<sup>1</sup>Захаревич В.И., <sup>2</sup>Грушевский В.В. <sup>1</sup>Дмитриев В.В.

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

<sup>2</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования  
Минск, Беларусь

Оптимизация дозирования антимикробных препаратов у пациентов в критическом состоянии является сложной задачей, невыполнение которой может привести к ухудшению результатов лечения пациентов. Использование с этой целью информации, содержащейся в инструкциях производителей, зачастую недостаточно для назначения адекватных режимов дозирования у данной категории пациентов. Патофизиология критических состояний оказывает существенное влияние на фармакокинетику (РК) антимикробных препаратов, однако индивидуальная вариабельность этих процессов по-прежнему требует дополнительного изучения и оценки. Фармакокинетические эффекты гипопроотеинемии, органной дисфункции и увеличенного почечного клиренса могут привести к непредсказуемости концентрации антимикробных препаратов в плазме, что в свою очередь может привести к токсичности или недостаточной эффективности в отношении микроорганизмов.

*Материалы и методы.* Производили заборы образцов крови у пациентов с гемобластозами и злокачественными новообразованиями, получающих колистин, амикацин и ванкомицин по поводу сепсиса и с целью профилактики инфекционных осложнений.

Пациенты, получавшие каждый из антибиотиков, были разделены на 2 группы: опытную группу составили пациенты в нейтропении (уровень лейкоцитов  $< 1 \times 10^9/\text{л}$  или уровень гранулоцитов  $< 500/\text{мм}^3$ ) с сепсисом, контрольную – пациенты в нейтропении, у которых не выполнялись критерии сепсиса. Забор крови для последующего определения концентрации

антибиотиков в плазме крови проводили в определенные временные интервалы:

Колистин:

- непосредственно после завершения инфузии препарата;
- через 1 час после завершения инфузии препарата;
- через 2 часа после завершения инфузии препарата;
- через 4 часа после завершения инфузии препарата.

Отобранные пробы замораживались и хранились до проведения анализа в коллекции при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Амикацин:

- непосредственно перед очередным введением препарата;
- непосредственно после завершения инфузии препарата;
- через 1 час после завершения инфузии препарата;
- через 2 часа после завершения инфузии препарата;
- через 4 часа после завершения инфузии препарата;
- через 8 часов после завершения инфузии препарата.

Ванкомицин:

- непосредственно перед очередным введением препарата;
- непосредственно после завершения инфузии препарата;
- через 1 час после завершения инфузии препарата;
- через 2 часа после завершения инфузии препарата;
- через 4 часа после завершения инфузии препарата;
- через 8 часов после завершения инфузии препарата (или непосредственно перед следующим введением препарата при режиме дозирования три раза в сутки).

Концентрации амикацина и ванкомицина определяли методом поляризационной иммунофлюоресценции (FPIA – FluorescencePolarizationImmunoassay) с помощью коммерческих наборов реагентов на аппарате TDXFLX производства Abbott Laboratories Diagnostics Division, USA.

Концентрацию колистина определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на аппаратах «Agilent 1100» и «Agilent 1200/6410».

Расчеты фармакокинетики амикацина и ванкомицина производились по трапезоидальному правилу с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 с использованием однокамерной модели фармакокинетики. Учитывая особенности лекарственной формы, фармакокинетика колистина не может быть описана стандартной однокамерной моделью, но на основании полученных данных возможен расчет следующих фармакокинетических параметров: максимальная концентрация ( $C_{\max}$ ), минимальная концентрация ( $C_{\min}$ ) (путем экстраполяции экспоненциальной функции), площадь под фармакокинетической кривой (AUC). Статистический анализ проводился с помощью системы статистического анализа R (opensource). При нормальном распределении вариант в выборке результат представлен как среднее и среднее квадратичное отклонение ( $\bar{X} \pm SD$ ). Для выборки, не подчиняющейся распределению Гаусса, результат представлен в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей.

*Результаты.* Фармакокинетика амикацина была изучена у 9 пациентов опытной группы и 12 – контрольной. AUC, представленная в виде медианы (25-75) перцентилей составила в опытной группе 254,0 (180,65 - 277,46) мг/сут/л, в контрольной – 100,7 (77,24 - 149,3) мг·сут/л ( $p=0,09908$ ). Режим дозирования, определявшийся назначениями лечащего врача, в обеих группах не имел достоверных отличий ( $16,03 \pm 3,37$  мг/кг/сут и  $14,47 \pm 0,86$  мг/кг/сут в опытной и контрольной группах, соответственно;  $p = 0,2083$ ). Период полувыведения  $T_{1/2}$ , представленный в виде медианы (25-75) перцентилей, также не имел статистически достоверных отличий между группами: 3,193 (2,55– 4,68) ч и 1,901 (1,65– 2,038) ч в опытной и контрольной группах соответственно ( $p = 0,1532$ ). Объем распределения амикацина в опытной группе составил  $0,34 \pm 0,156$  л/кг, в контрольной –  $0,3792 \pm 0,153$  л/кг ( $p = 0,57$ ). Общий клиренс имел существенные различия в исследуемых группах: в опытной –  $2,766 \pm 1,06$  мл/кг/ч, в контрольной –

6,149±2,717 мл/кг/ч ( $p = 0,001321$ ). Максимальная концентрация амикацина  $C_{\max}$ , представленная в виде медианы (25-45) перцентилей, в опытной группе составила 67,48 (61,96– 80,7) мг/л, в контрольной – 44,16 (34,38– 63,6)мг/л;  $p=0,07982$ .

Ввиду применения режима дозирования с однократным введением суточной дозы, целевые значения пиковой концентрации (более 20 мг/л) были достигнуты у всех пациентов как опытной, так и контрольной группы. У одного пациента опытной группы остаточная концентрация превысила целевую (менее 8 мг/л), что явилось следствием почечной недостаточности.

Фармакокинетика ванкомицина была изучена у 13 пациентов с сепсисом и 12 – контрольной группы. AUC, представленная в виде медианы (25-75) перцентилей, в опытной группе составила 827,3(661,3– 1000,0)мг/сут/л, в контрольной – 419,1(374,9– 501,9)мг/сут/л;  $p = 0,006756$ . Режим дозирования, определявшийся назначениями лечащего врача, в обеих группах не имел достоверных отличий(38,28±7,27мг/кг/сут в опытной группе и 38,93±2,3 мг/кг/сут в контрольной;  $p = 0,7643$ ). Период полувыведения  $T_{1/2}$ , представленный в виде медианы (25-75) перцентилей, в опытной группе составил 5,975 (4,04–7,15) ч, в контрольной – 2,935 (2,828– 3,2)ч;  $p = 0,0006824$ . Объем распределения ванкомицина достоверно не различался у пациентов опытной и контрольной группы: 0,4208±0,19л/кг и 0,4183±0,14 л/кг соответственно;  $p = 0,9712$ . Общий клиренс имел существенные различия в исследуемых группах: в опытной – 2,385±1,56мл/кг/ч, в контрольной – 4,11±1.45 мл/кг/ч;  $p= 0,008656$ . Минимальная концентрация  $C_{\min}$  (являющаяся целевым параметром терапевтического лекарственного мониторинга), представленная в виде медианы (25-75) перцентилей, также существенно различалась в опытной и контрольной группах: 12,06 (6,49– 28,91)мг/л и 4,295 (3,188– 5,96 мг/л. ,  $p = 0,007187$ ).

Учитывая изменения фармакокинетики ванкомицина у пациентов с сепсисом, целевые значения остаточной концентрации (10-20 мг/л) были достигнуты лишь у 3 пациентов (25%), у четырех пациентов (33,3%) эти



значения превысили целевые (что повышает риск токсичности), и еще у пятерых (41,7%) – не достигли целевых (что может привести к неэффективности терапии). Ни у одного пациента контрольной группы не были достигнуты целевые значения остаточной концентрации ванкомицина. Эти данные свидетельствуют в пользу обязательного проведения терапевтического лекарственного мониторинга и необходимости коррекции дозы у всех пациентов с нейтропенией, получающих ванкомицин.

Проанализированы 15 образцов плазмы пациентов с сепсисом, получавших колистин. AUC, представленная в виде медианы (25-75) процентилей, составила 12,64(9,602 – 25,39)мг/сут/л. Период полувыведения  $T_{1/2}$ , представленный в виде медианы (25-75) процентилей, составил 4,305 (2,95 – 5,73) ч. Максимальная концентрация колистина  $C_{max}$ , представленная в виде медианы (25-75) процентилей, у пациентов с сепсисом составила 0,9967 (0,8366 – 1,4050) мг/л.

Из приведенных данных можно сделать заключение о существенной вариабельности фармакокинетических параметров колистина у пациентов с сепсисом, которая отражает, по-видимому, степень нарушения функции тех или иных органов и систем. Однако максимальная концентрация колистина у всех исследованных пациентов была очень низка, у 93,3% пациентов она была ниже порогового значения MIC, определяющего чувствительность микроорганизмов ( $\leq 2$  мг/л для *P. aeruginosa* и *A. baumannii*), а у 46,7% больных пиковая концентрация была менее 1 мг/л. Учитывая, что по своим фармакодинамическим свойствам колистин относится к препаратам, чья эффективность определяется пиковой концентрацией ( $C_{max}/MIC$ ) и площадью под фармакокинетической кривой ( $AUC/MIC$ ), а также слабо выраженный постантибиотический эффект и быстрое возобновление роста микроорганизмов после снижения концентрации, столь низкие значения максимальной концентрации могут быть причиной недостаточного клинического эффекта антибактериальной терапии.

Таким образом, полученные данные указывают на необходимость коррекции доз колистина у пациентов с нейтропенией. Кроме того, очевидна целесообразность лекарственного мониторинга с определением максимальной концентрации колистина в крови.

#### *Заключение.*

Применение режима дозирования амикацина с однократным введением суточной дозы позволяет достичь целевых терапевтических концентраций и избежать токсических у большинства пациентов. Терапевтический лекарственный мониторинг амикацина целесообразен у пациентов с нарушением функции почек.

Для оптимизации антибактериальной терапии и профилактики у пациентов в нейтропении целесообразен контроль концентрации ванкомицина и колистина в плазме крови с соответствующей коррекцией режима дозирования.

## **ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА 25-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД (1986 - 2010 гг.)**

*Зборовская А.А., Лапотенцова Е.С., Зборовский Д.К.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии, детский канцер субрегистр Республики Беларусь.

Минск, Беларусь

Согласно мировым данным пик детской заболеваемости злокачественными новообразованиями (далее – ЗН) приходится на детей первого года жизни и составляет 10% в структуре детской (0-14 лет) онкологической заболеваемости [1]. По имеющимся отечественным данным (1992-2001 гг.) это лишь 4,2% [2], пик заболеваемости приходится на возраст 2-3 года [2, 3] Отличается и структура ЗН выявляемых на 1-м году жизни: так, по данным США и Германии [4, 5] на первом месте стоят опухоли

симпатической нервной системы (28-32%), затем опухоли ЦНС и лейкозы (по 14-15%) и далее располагаются ретинобластомы, опухоли почек герминоклеточные опухоли и саркомы мягких тканей (по 7-9%). В Республике Беларусь в 1992-2001 гг. лидировали лейкозы, составляя 23%, опухоли симпатической нервной системы составили около 20%, что свидетельствует о недостаточной выявляемости этой патологии на первом году жизни [2]. Показатель заболеваемости ЗН детей первого года жизни в США (1976-1994 гг.) и Германии (2000-2004 гг.) составил 23,3; 24,8 на 100 000 детей в возрасте до года, соответственно; в РБ (1992-2001 гг.) – 13,3 на 100 000. Поэтому несомненный интерес представляют республиканские данные по изменению показателя заболеваемости ЗН у детей первого года жизни и ее структуры в динамике.

*Результаты.* Всего за 25 летний период (1986-2010 гг.) в РБ зарегистрировано 446 случаев ЗН у детей в возрасте до 1 года, что составило 6,3% в структуре детской (0-14 лет) онкологической заболеваемости. Грубый показатель заболеваемости детей до года за весь 25 летний период составил  $15,5 \pm 0,73$  на 100 000, при этом в динамике с анализом по 5-летним периодам данные изменялись следующим образом: 1986-1990 гг. – 14,1; 1991-1995 гг. – 11,2; 1996-2000 гг. – 14,0; 2001-2005 гг. – 17,6 и заметное увеличение показателя отмечается, начиная с 2006 г., в 2006-2010 гг. показатель заболеваемости составил – 22,8 на 100 000 детей в возрасте до 1 года. При анализе структуры заболеваемости ЗН в РБ у детей в возрасте до 1 года в сравнении с данными США и Германии заметны различия на этапах 1986-2005 гг. и относительное выравнивание показателей, начиная с 2006 г. (таблица 1).

Таблица – Показатель и структура заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в США [4] (1976-1994 гг.), Германии [5] (2000-2004 гг.) и Республике Беларусь<sup>1</sup> (1986-1990, 1991-2005, 2006-2010 гг.)

| Страны                       | США             |     | Германия  |      | Республика Беларусь |      |           |      |           |      |
|------------------------------|-----------------|-----|-----------|------|---------------------|------|-----------|------|-----------|------|
| Периоды                      | 1976-1994       |     | 2000-2004 |      | 1986-1990           |      | 1991-2005 |      | 2006-2010 |      |
| показатель/<br>нозологизация | IR <sup>2</sup> | %   | IR        | %    | IR                  | %    | IR        | %    | IR        | %    |
| лейкозы, из них              | 4,1             | 17  | 3,7       | 14,7 | 6,3                 | 44,4 | 3,4       | 24,5 | 2,8       | 12,2 |
| ОЛЛ                          | 2,1             |     | 1,7       |      | 2,6                 |      | 1,5       |      | 2,2       |      |
| ОНЛЛ                         | 1,1             |     | 1,6       |      | 3,1                 |      | 1,5       |      | 0,6       |      |
| Нейробластома                | 6,5             | 28  | 7,9       | 32,8 | 1,2                 | 8,5  | 2,8       | 20,1 | 6,4       | 28,1 |
| ЦНС                          | 3,0             | 13  | 3,3       | 13,3 | 1,4                 | 9,9  | 2,0       | 14,4 | 4,4       | 19,3 |
| ретинобластома               | 2,7             | 12  | 2,6       | 10,6 | 0,4                 | 2,7  | 1,1       | 7,9  | 3,8       | 16,7 |
| опухоль Вильмса              | 2,3             | 9   | 2,3       | 9,1  | 1,2                 | 8,5  | 2,1       | 15,1 | 1,6       | 7,0  |
| герминоклеточ-ные<br>опухоли | 1,5             | 6   | 1,6       | 6,5  | 0,4                 | 2,7  | 0,7       | 5,0  | 1,0       | 4,4  |
| саркомы мягких<br>тканей     | 1,5             | 6   | 2,1       | 8,6  | 1,2                 | 8,5  | 0,9       | 6,5  | 1,2       | 5,3  |
| Гепатобластома               | 1,0             | 4   |           |      | 1,2                 | 8,5  | 0,5       | 3,6  | 1,0       | 4,4  |
| Другие                       | <1,0            |     |           |      | 0,9                 | 6,3  | 0,4       | 2,9  | 0,6       | 2,6  |
| Все ЗН                       | 23,3            | 100 | 24,8      | 100  | 14,2                | 100  | 13,9      | 100  | 22,8      | 100  |

Обращает на себя внимание высокий показатель заболеваемости лейкозами у белорусских детей на первом году жизни в 1986-1990 годах (IR – 6,3 на 100 000 младенцев), что составило 44,4% в структуре онкологической заболеваемости в данной возрастной группе за указанный период. Повышение заболеваемости отмечено преимущественно за счет острых нелимфобластных лейкозов с дальнейшей тенденцией к снижению.

Известно, что прогноз выживаемости при ЗН у детей первого года жизни хуже, чем в других возрастных группах [4, 5]. По данным Детского канцер субрегистра Республики Беларусь, показатель 5-летней выживаемости для детей, заболевших в возрасте до года (все нозологические группы) составил в 1986-1990 гг. 35%; в 1991 – 2005 гг. – 54%, в 2006-2010 гг. – 66%. Самый высокий показатель выживаемости отмечен при нейробластоме – 79% за период 1986-2010 гг., что сопоставимо с данными США и Германии (около 80% и около 90%, соответственно).

<sup>1</sup> Данные детского канцер субрегистра Республики Беларусь.

<sup>2</sup> IR (incidence rate) – грубый интенсивный показатель заболеваемости на 100 000 детей в возрасте до 1 года

*Выводы.* В 1986-2005 гг. у детей первого года жизни лучше диагностировались опухоли с агрессивным характером течения (лейкозы, опухоли почек, печени, саркомы мягких тканей), при этом выявление опухолей симпатической нервной системы было заметно ниже, чем в США и Германии. Структура и уровень выявляемости злокачественных новообразований у детей первого года жизни в Республике Беларусь заметно изменились за последние 5 лет. С 2006 г. диагностика злокачественных опухолей на первом году жизни стала сопоставима с данными других стран, что свидетельствует об эффективности мероприятий, направленных на обследование и диспансерное наблюдение детей первого года жизни.

#### Литература

1. *International incidence of childhood cancer: IARC scientific publications/ D. Parkin [et al.], Vol.II, Lyon, 1998, 144 p.*
2. *Особенности заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в Республике Беларусь. С.В. Петрович, О.В. Алейникова, Е.С. Лапотенцова и др., Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС, 2004. - № 1. - С. 3-11.*
3. *Савва Н.Н., Зборовская А.А., Алейникова О.В.. Злокачественные новообразования у детей Республики Беларусь: заболеваемость, выживаемость, смертность и паллиативная помощь. Минск, РНМБ, 2008.*
4. *Gurney J.G., Smith M.A., Ross J.A. Cancer among infants. SEER pediatric monograph. 1998 - P.149-156.*
5. *Kaatsch P., Spix C. German childhood cancer registry. Annual report 2005 (1980-2004). Mainz. 2006.- 78 P.*

## **ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТЕРОИДОРЕЗИСТЕНТНОЙ РТПХ**

***Исайкина Я.И., Минаковская Н.В., Алейникова О.В.***

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время не имеет альтернативы для пациентов, имеющих

прогрессирующие формы и плохой прогноз при ряде гематологических и злокачественных заболеваний крови.

Главным специфическим осложнением аллогенной трансплантации является реакция “трансплантат против хозяина” (РТПХ), а наиболее тяжелой формой – стероидорезистентная РТПХ. Острая стероидорезистентная форма РТПХ определяется у пациентов, получающих для лечения преднизолон в дозе 2 мг/кг/день в течение последующих 3 дней и развивших прогрессирование симптомов РТПХ в течение 7 дней стероидной терапии. Рекомендуются альтернативные фармакологические и клеточные методы лечения. Одним из методов выбора, привлекающих в настоящее время большое внимание, является инфузия мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

РТПХ в настоящее время рассматривается как иммунопатофизиологический процесс, состоящий из трех последовательных фаз: фаза повреждения клеток и тканей реципиента агрессивными факторами, афферентной и эфферентной. В афферентную фазу ткани реципиента активируют донорские Т-лимфоциты, которые начинают активно пролиферировать и в эфферентную фазу Т клетки, реактивные в отношении реципиента, повреждают ткани хозяина, как непосредственно, так и опосредованно через мобилизацию вторичных эффекторов ЕК клеток и макрофагов. Исследования *in vitro* показали, что МСК супрессируют активность и пролиферацию Т клеток, что может применяться в целях профилактики и лечения острой и хронической РТПХ после аллогенных ТГСК у пациентов [1].. Это подтвердили и первые клинические испытания по трансплантации МСК (ТМСК) при аллогенной трансплантации ГСК при HLA-несовместимости между донором и реципиентом [2, 3].

Как следует из вышеизложенного, МСК имеют следующие характеристики, делающие их наиболее перспективными для применения в клеточной терапии при РТПХ:

- 1) легкость в получении,

2) высокий пролиферативный потенциал,  
3) генетическая стабильность,  
4) воспроизводимость основных характеристик от пассажа к пассажи,  
5) иммуномодулирующая способность, 6) регенерирующая функция [4 – 7].  
Le Blanc K. et al в 2004 г. впервые применили *in vitro* экспансированные МСК для пациента с тяжелой РТПХ IV стадии и наблюдали значительное улучшение его состояния [8]. Положительный результат был получен в мультицентровом клиническом исследовании при инфузии аллогенных МСК для лечения стероидорезистентной формы РТПХ у 55 пациентов, 30 из которых дали полный ответ на введение МСК и 9 показали улучшение [9]. В другом исследовании применение МСК, полученных *in vitro* из костного мозга для лечения рефрактерной острой РТПХ, вызвало полный ответ у 15% пациентов и частичный ответ у 45% пациентов [10].

Целью нашей работы являлось исследование эффективности применения МСК для лечения тяжелых стероидорезистентных форм РТПХ после аллогенной трансплантации у детей с гематологическими заболеваниями и злокачественными новообразованиями и определение линии терапии стероидорезистентной РТПХ аллогенными МСК.

*Материалы и методы.* Тридцать один пациент в возрасте 5-24 лет был включен в исследование по применению цитотерапии МСК для лечения стероидорезистентной формы РТПХ, в период с 2008 по 2011 год. Протокол исследования был принят Этическим Комитетом, и подписание информированного согласия являлось обязательным для каждого пациента, а также для доноров ГСК и МСК.

Все пациенты после проведения алло ТГСК получали профилактику РТПХ. Пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ)/миелодиспластическим синдромом (МДС)/хроническим миелолейкозом (ХМЛ)/неходжкинской лимфомой (НХЛ)/хроническим мономиелолейкозом (ХММЛ) получали циклоспорин А (CsA) и метотрексат (MTX), пациенты с

апластической анемией (АА)/анемией Фанкони (АФ) - CsA и микофенолат мофетил (ММФ), пациенты с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) – такролимус и ММФ. Несмотря на профилактику у всех пациентов развилась острая РТПХ, для лечения которой назначался метилпреднизолон в дозе 2 мг/кг. В связи с отсутствием терапевтического эффекта и согласно клиническим критериям у всех пациентов диагностировали стероидорезистентную форму РТПХ 2-4 степени. 20 пациентов получили внутривенное введение МСК в дозе  $1,7 (0,5 - 5,4) \times 10^6/\text{кг}$  (исследуемая группа) и 11 пациентов продолжали лечение стероидами (контрольная группа). Характеристики пациентов приведены в таблице 1.

Таблица 1 -Характеристики пациентов со стероидорезистентной формой РТПХ

| Группы пациентов                  | МСК + (n=20)      | МСК – (n=11)      | Р      |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Медиана возраста, годы            | 10,6 (5 – 24)     | 15 (10 – 22)      |        |
| Пол: мужской/женский              | 17/3              | 5/6               | 0.0203 |
| ОМЛ/МДС                           | 5/1               | 2                 | 0.4718 |
| НХЛ                               | 1                 | -                 | 0.4509 |
| ОЛЛ                               | 8                 | 4                 | 0.8424 |
| ПАА/АФ                            | 5                 | 3                 | 0.8900 |
| ХМЛ/ХММЛ                          | -                 | 1/1               | 0.1183 |
| Острая РТПХ: стадия II            | 5                 | 3                 | 0.2198 |
| стадия III                        | 11                | 7                 | 0.2834 |
| стадия IV                         | 4                 | 1                 | 0.6640 |
| Профилактика РТПХ: CSA+MTX        | 10                | 8                 | 0.8900 |
| Tacrolimus/CSA + steroid (ПАА/АФ) | 5                 | 1                 | 0.6410 |
| Tacrolimus + ММФ (ОМЛ)            | 5                 | 2                 | 0.4294 |
| Режим кондиционирования MAC/RIC   | 17/3              | 8/3               | 0.5930 |
| Параметры трансплантата ГСК       |                   |                   |        |
| ЯСК (x 108/кг)                    | 4,5 (1,4 – 22)    | 5,2 (1,0 – 22,5)  | 0,2548 |
| CD34+ (x 106/кг)                  | 3,5 (0,9 – 18,0)  | 5,15 (0,5 – 18,1) | 0,4832 |
| CD3+ (x 108/кг)                   | 4,2 (0,24 – 57,6) | 3,4 (0,07 – 8,9)  | 0,9662 |

Как видно из приведенных данных, исследуемая и контрольная группы не отличаются ни по нозологическому спектру, ни по параметрам трансплантата ГСК, ни по медикаментозной профилактике РТПХ.



Трансплантат МСК получали из 30-50 мл костного мозга донора методом сепарации клеток и дальнейшей их экспансии *in vitro* в течение 30-35 суток. Продукт МСК содержал не менее  $0,5 \times 10^6$  клеток на кг массы пациента, в объеме 20 мл физиологического раствора и вводился пациенту внутривенно медленно (в течение 10-20 минут) не позднее 30 минут после выделения клеток.

Оценка эффективности применения МСК для лечения стероидорезистентной формы РТПХ была дана по полученному общему ответу (ОО) на цитотерапию, который включал полную ремиссию (ПР), частичную ремиссию (ЧР), отсутствие ремиссии (ОР). Пациенты считались ответившими, если они имели ПР или ЧР. ПР – исчезновение всего симптокомплекса РТПХ, ЧР - уменьшение стадии РТПХ в одном органе, но не исчезновение всех симптомов РТПХ в этом органе, ОР - процесс РТПХ без изменений на фоне лечения или прогрессия РТПХ (увеличение стадии острой РТПХ либо вовлечение в патологический процесс другого (-их) органа (-ов)). Окончательно ответившими считались пациенты со стабильным ответом на день +30. В случае улучшения симптомов, связанных с РТПХ в течение одной недели после инфузии МСК, пациенты определялись как ответившие на лечение МСК. Иммуносупрессивная терапия у них в дальнейшем не усиливалась. Результаты проведения цитотерапии МСК отражены в таблице 2.

Таблица 2-Эффективность трансплантации МСК при острой стероидорезистентной РТПХ

|                  | Общий ответ |      |         |         |         |         |         |         |         |
|------------------|-------------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                  | ПР          |      |         | ЧР      |         |         | ОР      |         |         |
| Группы пациентов | МСК+        | МСК- |         | МСК+    | МСК-    |         | МСК+    | МСК-    |         |
| Острая РТПХ      | 6 (30%)     | 0%   | p=0,04  | 10(50%) | 3 (27%) | p - n.s | 4 (20%) | 8 (72%) | p =0,01 |
| II стадия        | 4 (20%)     | 0%   | p=0,02  | 1 (5%)  | 1 (9%)  | p - n.s | 0%      | 2 (18%) | p - n.s |
| III-IV стадия    | 2 (10%)     | 0%   | p - n.s | 9 (45%) | 2 (18%) | p - n.s | 4 (20%) | 6 (54%) | p =0,02 |

ПР – полная ремиссия, ЧР – частичная ремиссия, ОР – отсутствие ремиссии n.s. - по significant.

Анализ полученных результатов показал, что после ТМСК 16 пациентов из 20, т.е. 80% имели ПР и ЧР острой стероидорезистентной РТПХ, в то время как в контрольной группе только 3 пациента, т.е. 27% вышли в ЧР ( $p=0,0039$ ). Еще более важно, что после получения ТМСК 6 пациентов, т.е. 30% вышли в полную ремиссию, в то время как в контрольной группе таких пациентов не было. После ТМСК 11 пациентов - 55% с РТПХ 3-4 стадии вышли в ПР и ЧР, тогда как в контрольной группе только 2 пациента – 18% ( $p=0,0489$ ).

Оценка острых эффектов процедуры трансплантации МСК показала, что внутривенное введение клеток в дозе до  $5,4 \times 10^6/\text{кг}$  не вызывало каких-либо серьезных осложнений. Во время процедуры введения клеток, длившейся 15-20 мин., не отмечалось динамики АД и ЧСС. Не наблюдалось изменений в общем анализе крови через несколько часов после проведения процедуры по сравнению с результатами анализа, выполненного накануне трансплантации МСК. Ни у одного больного не было отмечено аллергической реакции.

*Заключение.* Предложенный нами способ трансплантации аллогенных МСК для лечения острой стероидорезистентной формы РТПХ в качестве третьей линии терапии можно считать эффективным, так как 80% пациентов ответили на цитотерапию МСК, из них 30% вышли в полную ремиссию и 50% - в частичную.

## Литература

1. Nicola M. Di, Carlo-Stella C., Magni M., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // *Blood*. -2002. – V.99. – P. 3838–3843;
2. Bertz H., Spyridonidis A., Wasch R. et al. A novel GVHD-prophylaxis with low-dose alemtuzumab in allogeneic sibling or unrelated donor hematopoietic cell transplantation: the feasibility of deescalation // *Biol. Blood Marrow Transplant*. – 2009. –V. 15. – P. 1563-1570.
3. Koreth J., Stevenson K., Kim H. et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors // *Blood*. – 2009. –V. 114. –P. 3956-3959;
4. Van Besien K., Dew A., Lin S. et al. Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence // *Leuk. Lymphoma*. – 2009. – V. 50, № 11. – P. 1809-1817;

5. Fenske T., Hari P., Carreras J. et al. Impact of pre-transplant rituximab on survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for diffuse large B cell lymphoma // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2009. – V. 15, № 11. – P. 1455-1464;
6. Nash R., Antin J., Karanes C. et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors // *Blood.* – 2000. – V. 96, № 6. – P. 2062-2068;
7. Platzbecker U., von Bonin M., Goekkurt E. et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with everolimus and tacrolimus is associated with a high incidence of sinusoidal obstruction syndrome and microangiopathy: results of the EVTAC trial // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2009. – V. 15, № 1. – P. 101-108;
8. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells // *Lancet.* – 2004. – V.363. – P.1439-1441;
9. Le Blanc K, Frassonni F, Ball L, Locatelli F. Et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study // *Lancet.* – 2008. – V.371. – P.1579-1586;
10. Von Bonin M, Stoelzel F, Goedecke A. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – V.43. – P. 245-251

## **ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

*Исайкина Я.И., Шман Т.В., Жерносеченко А.А., Тарасова А.В.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии,

Минск, Беларусь

Клетки стромы костного мозга выполняют важнейшую функцию в поддержке гемопоэтического восстановления после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), так как именно они поддерживают их миграцию и пролиферацию после введения пациенту.

Значительную роль для пролиферации и дифференцировки ГСК играет их взаимодействие с адгезионными молекулами экстрацеллюлярного матрикса стромы костного мозга [1]. Seshi в своих опытах с декстеровской культурой продемонстрировал, что стромальный слой в ней, образующийся после посева мононуклеарных клеток костного мозга, уникален и состоит из трех типов клеток (макрофаги – 35%, гемопоэтические клетки – 5%, негемопоэтические клетки: адипоциты, остеобласты, фибробласты, миоциты

и эндотелиальные клетки – 60%), но только отселектированные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способны поддерживать гемопоэз, поскольку на их поверхности выявлялась одновременная экспрессия нескольких гемопоэтических ростовых факторов и рецепторов молекул адгезии, включая Г-КСФ, ФСК (с-kit-лиганд, CD117), VCAM-1 (CD-106), ICAM-1 (CD54) и ALCAM (CD-166) [2]. Наличие молекул адгезии на поверхности МСК, обеспечивающих контакт клеток-предшественников гемопоэза с клетками стромы костного мозга и являющихся необходимым условием для восприятия гемопоэтическими предшественниками фактора роста стволовых клеток (с-kit), подтверждается и в других исследованиях [3].

При сравнении воздействия на пролиферативную активность ГСК непосредственно клеток стромы и растворимых факторов, являющихся продуктом экскреции стромальных клеток, было сделано заключение, что для получения оптимально высокого числа предшественников гемопоэза из CD34<sup>+</sup> клеток необходим тесный контакт стромы и ГСК [4, 5]. Результаты исследования Wagner показали, что фракция примитивных клеток-предшественников адгезирует на слое МСК при постановке декстеровской культуры, в то время как большая часть коммитированных клеток-предшественников находится в суспензии [6]. Тот факт, что клетки стромы поддерживают, в основном, самовоспроизведение ранних клеток-предшественников гемопоэза, но не пролиферацию и дифференцировку зрелых гемопоэтических клеток подтверждают работы других авторов [7]. МСК обладают способностью поддерживать и миелопоэз, и лимфопоэз, способны укреплять активные сайты гемопоэза в негемопоэтических органах, и необходимы для гематопоэтического восстановления после аллогенной трансплантации ГСК.

В модели на мышах показано, что около 25% МСК, экспансированных *in vitro*, после внутривенного введения животному осуществляют хоуминг в костный мозг, где, предположительно, под воздействием микроокружения могут дифференцироваться в клетки стромы костного мозга, сохраняя свою

функциональную активность в поддержке костномозгового кроветворения, как опосредованно, выделяя растворимые цитокины, так и контактно.

Целью наших исследований было доказать, что получаемый нами в лабораторных условиях трансплантат МСК содержит не только клетки с высокой жизнеспособностью, но и обладающие высокой функциональной активностью в поддержке гемопоэза.

*Объект и методы исследования.* Пробы костного мозга 15 здоровых доноров, взятых посредством костномозговой пункции под анестезией для последующей трансплантации пациенту, были использованы для выделения CD34<sup>+</sup> клеток и получения трансплантата МСК.

Для получения трансплантата МСК моноклеональные клетки (МНК) выделяли на Гистопаке плотностью 1,077 (Sigma, США), ресуспендировали в IMDM с 10% ЭТС (Sigma, США) и переносили в концентрации 2–3×10<sup>6</sup>/мл во флакон объемом 175 см<sup>2</sup> (Sarstedt, Германия) в 30 мл среды. Клетки инкубировали при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. При получении конфлюэнтного слоя клетки дезадгезировали при помощи 0,25% трипсин-ЭДТА (Sigma, США) и в количестве 1×10<sup>6</sup>/мл пересаживали в новые культуральные флаконы (I-ый пассаж). Таким образом, производили несколько пассажей, при которых МСК наращивали *in vitro* до нужного объема.

Клетки из образца, отобранного из трансплантата МСК, рассаживали в лунки 24-луночных планшетов в количестве 5×10<sup>5</sup> на лунку и культивировали в IMDM, содержащей 15% ЭТС, 20 часов при +37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для блокировки пролиферации МСК полученный монослой облучали при 30 Гр. CD34<sup>+</sup>-клетки для проведения эксперимента выделяли из костного мозга с помощью набора для CD34-позитивной селекции (StemCell Technologies, Канада). Процедура процессинга этих клеток из фракции МНК костного мозга была выполнена согласно инструкции к набору. На монослой МСК помещали ГСК в концентрации 2×10<sup>4</sup>/мл. Клетки культивировали в IMDM, содержащей 15% ЭТС, 2-меркаптоэтанол. В вариантах эксперимента с использованием факторов роста применяли интерлейкин-3 (20 нг/мл), ИЛ-6

(20 Е/мл), ФСК (50 нг/мл), FLT 3L (100 нг/мл) (все реагенты фирмы Sigma, США). Клетки всех вариантов культивировали 21 день во влажной атмосфере и 5% CO<sub>2</sub> при +37°C. Для поддержания культуры еженедельно проводили смену среды. Рост клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа. Концентрацию гемопоэтических клеток и их жизнеспособность учитывали на 7-й, 14-й и 21-й день методом подсчета под микроскопом. Популяционное удвоение (ПУ) определяли, зная исходное количество клеток и их число на 7-й, 14-й и 21-й день с применением формулы:  $ПУ = \log (\text{кол-во клеток на выходе} / \text{кол-во клеток исходное}) / \log 2$ .

Для проведения анализа пролиферации исследуемые клетки отмывали в среде RPMI-1640 без сыворотки, после чего ресуспензировали в 500 мкл среды. Флуоресцентный зонд CFSE (карбоксифлуоресцеиндиацетат - сукцинилмидил эфир) разводили в 500 мкл среды и раствор красителя добавляли к клеткам. Суспензию клеток инкубировали при 37°C 30 минут. Добавляли равный объем сыворотки и оставляли на 5 минут для связывания свободного красителя с последующей отмывкой в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % сыворотки [8]. Окрашенные клетки оставляли на ночь в термостате [9], CD34<sup>+</sup> клетки выделяли с помощью иммуномагнитной селекции и культивировали в присутствии МСК и без них, а также в присутствии факторов роста и без них в течение 14 дней. Анализ пролиферации проводили на 0-, 4-, 7- и 14-ые сутки с дополнительным окрашиванием клеток с помощью CD34PE и 7-AAD для исключения мертвых клеток из анализа. Исследования проводили на проточном цитофлуориметре FACScan с использованием программы CellQuestPro. Для каждого образца анализировали жизнеспособность клеток, интенсивность флуоресценции (ИФ) CFSE, а также рассчитывали индекс пролиферации (ИП) клеток в программе ModFit LT (BD).

Иммунофенотипический анализ популяции гемопоэтических клеток проводили до и после экспансии и дифференцировки. К образцу (100.000-200.000 клеток) добавляли 20 мкл МКА и инкубировали в темноте при

комнатной температуре в течение 25-30 мин. После инкубации с антителами клетки отмывали ФСБ дважды, центрифугируя 5 мин. при 300g. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCan в программе CellQuest. Изучали экспрессию следующих маркеров: CD45, CD14, CD3, CD34, CD19, CD13, CD33, гликофорин А.

Статистический анализ результатов был проведен с использованием программы STATISTICA 6.0. Достоверность различий в группах оценивалась с использованием парного теста Стьюдента и теста Манн-Уитни. Статистически значимым считалось различие при  $p < 0,05$ .

*Результаты.* Влияние МСК на пролиферативную активность ГСК исследовали в эксперименте с четырьмя вариантами культивирования клеток: CD34<sup>+</sup> клетки на подложке и без подложки МСК, CD34<sup>+</sup> клетки в присутствии факторов роста на подложке и без подложки МСК. Полученные результаты динамики прироста клеток в каждом варианте на 7, 14, 21 дни культивирования представлены на рисунке 1. Как видно на графике, при отсутствии факторов роста и наличии слоя МСК происходит прирост CD34<sup>+</sup> клеток в 2,5 раза к 14 суткам, тогда как при культивировании ГСК в среде без МСК прироста клеток не наблюдалось вовсе ( $p < 0,05$ ). При добавлении факторов роста в среду культивирования наблюдали значительное увеличение количества гемопоэтических клеток уже на 7-е сутки. Средний коэффициент прироста CD34<sup>+</sup> клеток в присутствии МСК на 7-, 14- и 21-сутки составил  $29,02 \pm 2,52$ ,  $127 \pm 5,10$  и  $256 \pm 15,62$  раз, тогда как в отсутствие МСК –  $22,3 \pm 2,0$ ,  $89,67 \pm 6,38$  и  $201 \pm 14,2$  соответственно. Различия статистически достоверны для 7-х ( $p = 0.005$ ) и 14-х ( $p = 0.0076$ ) суток культивирования. На 21-е сутки коэффициент прироста был выше для клеток, культивированных с МСК по сравнению с ростом без МСК, но достоверность различий не наблюдалась ( $p = 0.7$ ).

Было рассчитано совокупное популяционное удвоение, которое характеризовало активность пролиферативного процесса в каждой популяции клеток. При культивировании ГСК в среде без внесения ростовых

факторов и без слоя МСК на 7, 14, 21 сутки пролиферация клеток практически не наблюдалось и популяционное удвоение на 7 и 21 сутки носило даже отрицательный характер за счет гибели клеток (-0,17, 0,14, -0,87), в то время как в присутствии МСК наблюдался прирост популяции на 7 и 14 сутки, кроме 21 суток (0,81, 1,02 и -0,21), ( $p < 0,05$ ).

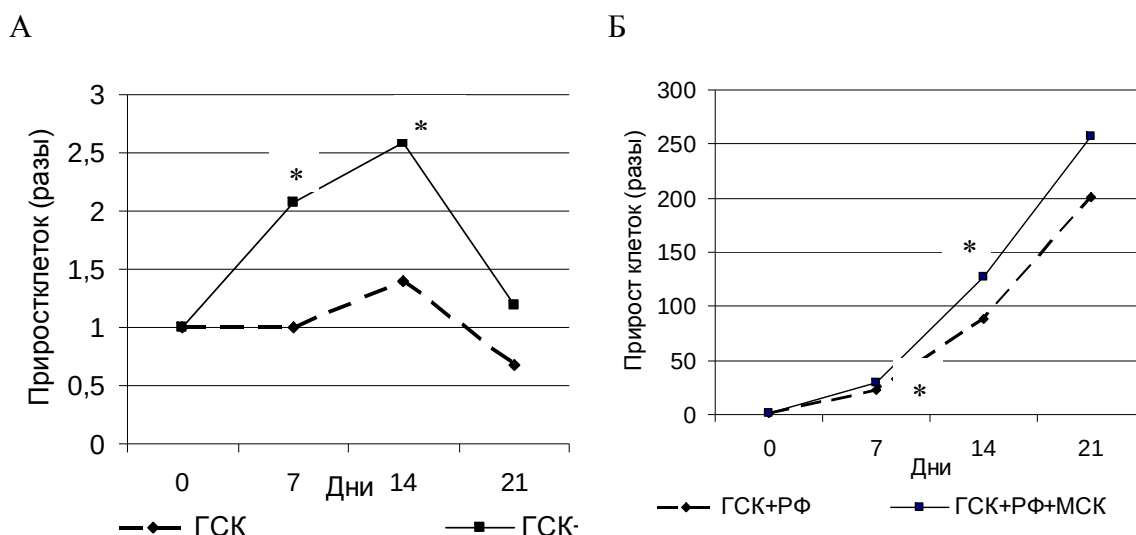


Рисунок 1 – Влияние МСК на экспансию CD34<sup>+</sup> клеток. А – культивирование CD34<sup>+</sup> без факторов роста; Б - культивирование CD34<sup>+</sup> в присутствии факторов роста, РФ – факторы роста, (n=15), \* $p < 0,05$

В присутствии ростовых факторов популяционное удвоение было достоверно выше на 7 и 14 сутки при культивировании ГСК на слое МСК ( $p < 0,05$ ). Отсутствие эффекта МСК на поддержку пролиферации ГСК на 21 сутки возможно связано со значительным приростом клеток на слое МСК, что могло снизить их жизнеспособность при данных условиях культивирования.

Оценка влияния МСК на пролиферативную активность ГСК методом проточной цитофлуориметрии по включению CFCE и анализу ИФ показывают, что при культивировании CD34<sup>+</sup> клеток в присутствии МСК уровень флуоресценции падает с 292 на 0 день до  $58 \pm 20,5$  на 3 сутки, до  $20,15 \pm 5,43$  на 7 сутки и  $16,1 \pm 1,89$  на 14 сутки, что достоверно ниже, чем в контроле, когда динамика выглядит так: 292 на 0 день,  $292 \pm 201,6$  на 3 сутки,  $27,2 \pm 5,2$  на 7 сутки и  $26,4 \pm 9,1$  на 14 сутки. Рассчитанный в каждом варианте ИП показал достоверно более высокий уровень пролиферации



CD34+ клеток на 3 и 7 дни культивирования в присутствии МСК без дополнительного внесения ростовых факторов (2,8 против 1,64 на 3 сутки и 10,6 против 6,02 на 7 сутки) ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 2).

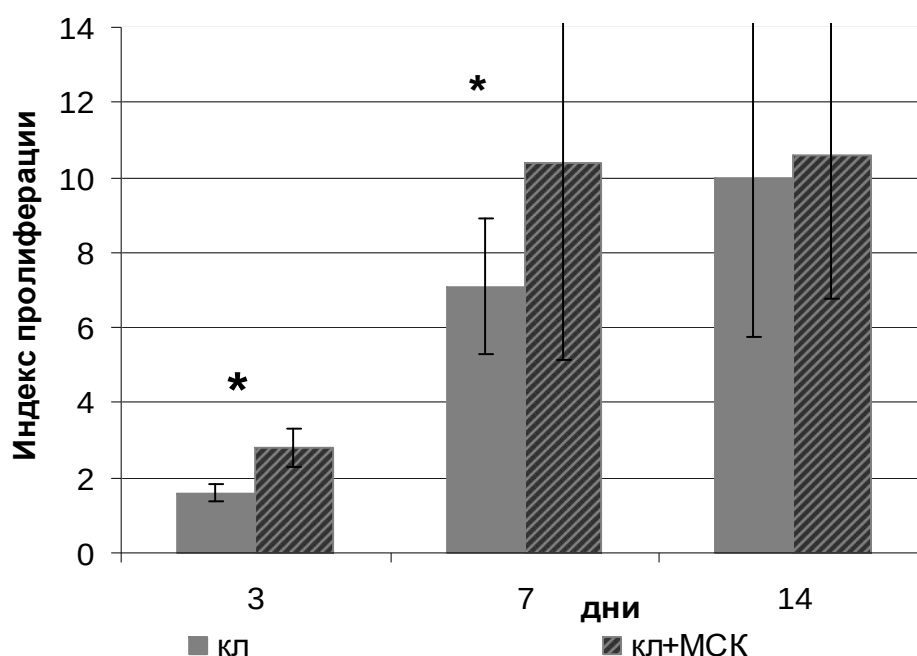


Рисунок 2 – Индекс пролиферации ГСК при культивировании клеток в среде без ростовых факторов с МСК и без МСК на 0, 3, 7 и 14 сутки, ( $n=10$ ),  $*p < 0,05$

Результаты эксперимента показали положительное влияние МСК на жизнеспособность клеток. Оценка ЖСП свидетельствовала, что в присутствии МСК уровень жизнеспособности на 3 сутки достигал  $57,7\% \pm 16,7\%$ , а на 7-е –  $59,7\% \pm 11,7\%$ , что выше, чем при культивировании клеток в тех же условиях без МСК, когда ЖСП было  $19,5\% \pm 2,9\%$  и  $28,2\% \pm 9,3\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ).

Для установления субпопуляционного состава гемопоэтических клеток, полученных в результате экспансии CD34+ клеток *in vitro* при различных условиях культивирования, мы проводили иммунофенотипирование популяции гемопоэтических клеток из 12 проб до и после 21-го дня культивирования. Установлено, что до начала культивирования в среднем  $87,71 \pm 1,04\%$  клеток экспрессировали на своей поверхности антиген CD34. После трехнедельного культивирования субпопуляционный состав клеток изменился (рисунок 3).

Согласно представленным результатам, очевидно, что происходит дифференцировка клеток в направлении миелопоэза с потерей экспрессии CD34 маркера. Наблюдали достоверное увеличение клеток, экспрессирующих CD14 антиген как при культивировании без МСК (с 0,9% до 30,3%), так и в присутствии МСК (с 0,9% до 30,1%) ( $p < 0,05$ ).

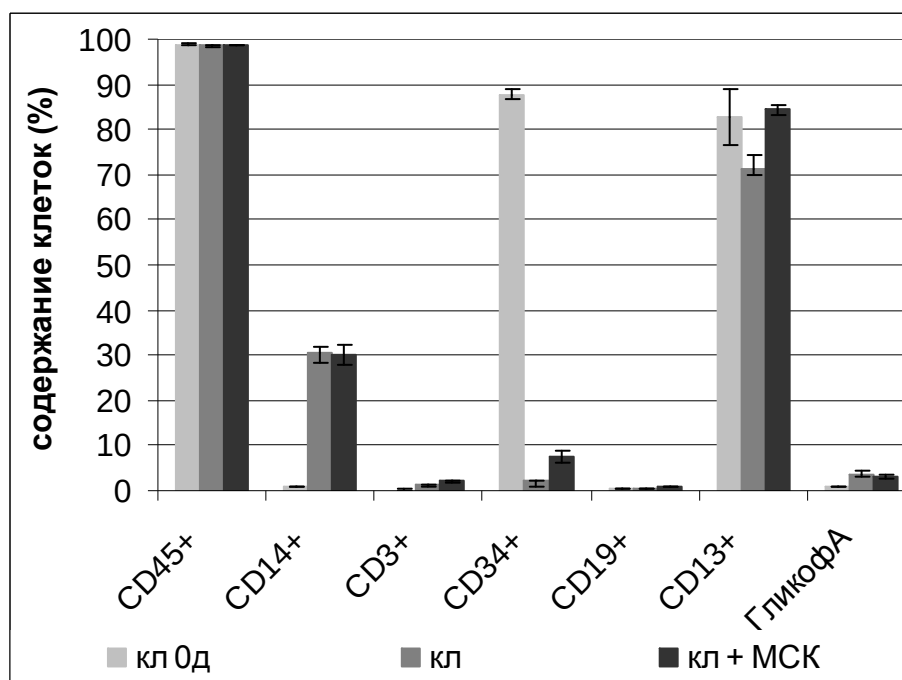


Рисунок 3 – Иммунофенотипическая характеристика гемопоэтических клеток после культивирования с факторами роста и МСК (n=12)

После культивирования CD34+ клеток на слое МСК содержание клеток, экспрессирующих CD34, составляло 7,6% по сравнению с культивированием без подложки МСК - 2,2% ( $p=0.07$ ).

*Заключение.* Установлена функциональная активность клеток трансплантата МСК, полученного из костного мозга донора методом культивирования, в поддержке гемопоэза и наличие слоя МСК усиливает экспансию гемопоэтических клеток. Показано положительное влияние присутствия в культуре МСК на пролиферацию гемопоэтических CD34+ клеток-предшественников, о чем свидетельствуют достоверно более высокие показатели по сравнению с контролем индекса пролиферации, определенного иммунофлуоресцентным методом, и популяционного удвоения,

характеризующего активность пролиферативного процесса в популяции клеток. Клетки трансплантата МСК поддерживают пролиферацию более ранних предшественников гемопоэза *in vitro* в отличие от ростовых факторов, Результаты эксперимента доказали положительное влияние МСК на жизнеспособность гемопоэтических клеток в культуре, так уровень жизнеспособных клеток был в 2 раза выше в присутствии МСК.

## Литература

1. Verfaillie, C.M. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process / C.M. Verfaillie // *Blood*. – 1998. – V. 92. – P. 2609-2612;
2. Seshi, B. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages / B. Seshi, S. Kumar, D. Sellers // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2000. – V. 26. – P. 234-246;
3. Miller, J.S. Ex vivo culture of CD34<sup>+</sup>/Lin<sup>–</sup>/DR<sup>–</sup> cells in stroma-derived soluble factors, interleukin-3, and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  maintains not only myeloid but also lymphoid progenitors in a novel switch culture assay / J.S. Miller, V. McCullar, C.M. Verfaillie // *Blood*. – 1998. – V. 91. – P. 4516-4522;
4. Koller M.R. Donor-to-donor variability in the expansion potential of human bone marrow cells is reduced by accessory cells but not by soluble growth factors / M.R. Koller, I. Manchel, D.A. Brott // *Exp. Hematol.* – 1996. – V. 24. – P. 1484-1493;
5. Breems D.A. Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells / D.A. Breems, E.A. Blokland, R.E. Ploemacher // *Leukemia*. – 1997. – V. 11. – P. 142-150;
6. Wagner W. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction // *Exp. Hematol.* – 2007. – Vv. 35. – P. 314-325;
7. Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells with human mesenchymal stem cells // *Tissue Eng.* – 2006. – V.12. – P.2161-2170.
8. Lyons A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – V. 21. – P.147-154;
9. Matera G, Lupi M, Ubezio P. Heterogeneous cell response to topotecan in a CFSE-based proliferation test // *Cytometry A.* – 2004. – V.62. – P.118-128.

## НЕОНАТАЛЬНАЯ АЛЛОИММУННАЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

**Качан Г.Л., Качан С.Э., Адасько В.И., Волкова Л.И.**

Белорусская медицинская академия последипломного образования

Родильный дом Минской области

Неонатальная тромбоцитопения (уровень тромбоцитов менее 150x10<sup>9</sup>/л) является частой клинической проблемой, которая регистрируется в момент рождения у 1-5% всех новорожденных детей, при этом тяжелая

тромбоцитопения (менее  $50 \times 10^9/\text{л}$ ) отмечается у 0,1-0,5% младенцев [1, 2]. Ранняя манифестация тромбоцитопении (в первые 72 часа жизни) чаще всего обусловлена фето-плацентарной недостаточностью, в большинстве случаев тромбоцитопения умеренная, нормализация уровня тромбоцитов происходит спонтанно. Поздняя манифестация тромбоцитопении (позднее 72 часов жизни) обычно обусловлена сепсисом, выражена в большей степени, часто требуется заместительная терапия (переливание тромбоконцентрата). При выявлении тромбоцитопении у новорожденного ребенка необходимо проводить дифференциальный диагноз с целым рядом патологических состояний, как со стороны матери, так и плода:

- иммунная тромбоцитопеническая пурпура/системная красная волчанка у матери;
- врожденные инфекции (цитомегаловирусная, токсоплазмоз, краснуха, ВИЧ);
- тяжелая форма гемолитической болезни новорожденного по Rh-фактору;
- наследственные заболевания с тромбоцитопенией (синдром Вискотт-Олдрича, врожденная амегакариоцитарная тромбоцитопения, TAR-синдром – тромбоцитопения с отсутствием лучевой кости);
- ДВС-синдром;
- гемангиома больших размеров;
- тромбоз крупных сосудов;
- неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения.

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (neonatal alloimmune thrombocytopenia – NAIT) – самая частая причина изолированной тяжелой тромбоцитопении у новорожденного ребенка. По механизму развития NAIT представляет собой аналог гемолитической болезни новорожденного и обусловлена трансплацентарным переносом материнских аллоантител, направленных против антигенов тромбоцитов плода (human platelet antigen – HPA), которые ребенок унаследовал от отца, но которые отсутствуют у матери. 80% всех случаев NAIT развивается вследствие образования

материнских антител против HPA-1a плода, 10-15% NAIT – результат образования антител против HPA-5b [3, 6, 8]. Частота развития неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении составляет 1 случай на 800-1000 живорожденных детей [4]. Учитывая диагностические сложности, можно предположить, что истинная встречаемость NAIT выше. Тяжесть заболевания значительно варьирует: от минимальных клинических проявлений со спонтанным разрешением процесса на первой неделе жизни до развития тяжелого геморрагического синдрома с внутримозговым кровоизлиянием, приводящим к гибели пациента или инвалидизации. Петехиальная геморрагическая сыпь отмечается уже при рождении или появляется вскоре после родов. Гематурия и желудочно-кишечное кровотечение встречаются реже. Самое тяжелое осложнение NAIT – внутримозговое кровоизлияние, которое может произойти внутриутробно или постнатально в течение всего периода тромбоцитопении. У части пациентов неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения может протекать бессимптомно со спонтанным излечением. Длительность периода тромбоцитопении составляет 1-2 недели, редко тромбоцитопения может сохраняться дольше. Ретроспективные исследования показали, что при NAIT, обусловленной несовместимостью по HPA-1a, летальность составила 10%, а частота отдаленных неврологических последствий – 20% [5, 7, 9].

Тактика лечения NAIT зависит от наличия геморрагического синдрома и уровня тромбоцитов. При уровне тромбоцитов менее  $30 \times 10^9/\text{л}$  или наличии выраженного геморрагического синдрома в первые сутки жизни методом выбора является трансфузия совместимых по тромбоцитарным антигенам (HPA) тромбоцитов. Поскольку на поверхности материнских тромбоцитов отсутствуют антигены, к которым образовались антитела, то мать является лучшим донором. Материнские тромбоциты перед трансфузией должны быть отмыты и облучены для профилактики реакции трансплантат-против-хозяина. Если трансфузия материнских тромбоцитов невозможна, то необходимо переливать донорские тромбоциты 1b/1b, т.к. чаще всего NAIT

развивается вследствие несовместимости по НРА-1a. Альтернативой заместительной трансфузионной терапии является введение внутривенного иммуноглобулина в суммарной дозе 2 г/кг. Длительность курса лечения может составлять 2 или 4 дня (суточная доза 1 г/кг или 0,5 г/кг соответственно). Терапевтический эффект отсрочен во времени на 12-18-24 часа.

В группе пациентов с уровнем тромбоцитов выше  $30 \times 10^9/\text{л}$  используется выжидательная тактика, но при этом необходим тщательный клинический и лабораторный мониторинг с обязательным ультразвуковым исследованием головного мозга и органов брюшной полости. Трансфузионная терапия не проводится, т.к. уровень тромбоцитов в большинстве случаев спонтанно повышается в течение короткого промежутка времени. Если в процессе наблюдения за пациентом уровень тромбоцитов быстро падает, то используется терапевтическая тактика, описанная выше.

Таким образом, во всех случаях необъяснимой изолированной тяжелой неонатальной тромбоцитопении с ранней манифестацией должна исключаться NAIT.

Под нашим наблюдением находилось двое детей с неонатальной аллоиммунной тромбоцитопенией. В обоих случаях дети родились от повторной беременности вторых срочных родов. У одной матери в анамнезе отмечалось рождение ребенка с неонатальной транзиторной тромбоцитопенией (минимальный уровень тромбоцитов  $16 \times 10^9/\text{л}$ ), проводилась трансфузионная терапия, настоящее время ребенку 4 года, здоров. Уровень тромбоцитов у матерей на протяжении всей беременности и в родах был нормальный. В одном случае группа крови матери и ребенка совпадали как по системе АВО, так и по резус-фактору, в другом случае при совместимости по АВО-системе отмечалось различие по резус-фактору (мама резус-положительная, ребенок резус-отрицательный). Состояние при рождении обоих детей удовлетворительное. Манифестация геморрагического

синдрома ранняя: в родзале и через 3 часа после рождения. Клинические проявления повышенной кровоточивости в виде геморрагической петехиальной сыпи по всему телу (у обоих детей), у одного ребенка отмечалось желудочно-кишечное кровотечение. В анализах крови у обоих детей выявлена тяжелая изолированная тромбоцитопения ( $12 \times 10^9/\text{л}$  и  $17 \times 10^9/\text{л}$ ), уровень гемоглобина, лейкоцитов и лейкоцитарная формула – в пределах возрастной нормы. УЗИ-мониторинг головного мозга и органов брюшной полости показал отсутствие признаков внутреннего кровотечения. Обоим детям был назначен внутривенный иммуноглобулин в дозе 0,5 г/кг в сутки в течение 4 дней (суммарная доза 2 г/кг), у ребенка с желудочно-кишечным кровотечением дополнительно назначен солумедрол в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 3 дней. Трансфузия тромбоцитарной массы не проводилась в обоих случаях. Динамика уровня тромбоцитов показана в таблице.

Уровень тромбоцитов свыше  $30 \times 10^9/\text{л}$  достигнут у одного ребенка через сутки, у второго – через 2 суток от начала терапии. Полное восстановление уровня тромбоцитов произошло к 4-5 суткам жизни.

Таблица - Динамика уровня тромбоцитов у пациентов с NAIT на фоне лечения

| Сутки жизни  | Уровень тромбоцитов ( $10^9/\text{л}$ ) |           |
|--------------|-----------------------------------------|-----------|
|              | пациент 1                               | пациент 2 |
| При рождении | 12                                      | 17        |
| 2            | 23                                      | 84        |
| 3            | 53                                      | 118       |
| 4            | 103                                     | 162       |
| 5            | 317                                     | 355       |

Таким образом, неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения имеет раннюю клиническую манифестацию (в течение первых 72 часов жизни). Геморрагический синдром проявляется в виде петехиальной сыпи на коже и слизистых, а также в виде кровотечений различной локализации (внутричерепное, внутрибрюшное, желудочно-кишечное). Изменения в общем анализе крови характеризуются изолированной тромбоцитопенией. В случае тяжелой тромбоцитопении (менее  $30 \times 10^9/\text{л}$ ) имеется риск внутричерепного кровоизлияния с высоким уровнем летальности и

инвалидизации. Принципы терапии НАИТ заключаются в переливании совместимых по HPA тромбоцитов (в случае жизнеугрожающих кровотечений) и введении внутривенного иммуноглобулина. В большинстве случаев (при своевременной диагностике и лечении) течение НАИТ благоприятное. Необходимо помнить, что при наличии НАИТ у одного ребенка в семье, имеется высокий риск развития неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении у последующих детей.

## Литература

1. Sainio S, Jarvenpaa A-S, Renlund M, et al. Thrombocytopenia in term infants: a population-based study // *Obstet Gynecol.* – 2000. – V. 95. – P. 441–446.
2. Murray NA, Howarth LJ, McCloy MP, et al. Platelet transfusion in the management of severe thrombocytopenia in neonatal intensive care unit (NICU) patients// *Transfus. Med.* - 2002. – V. 12. – P. 35–41
3. Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PLA1, Zwa) as determined by antenatal screening // *Blood.* – 1998. – V. 92. – P. 2280–2287.
4. Davoren A, McParland P, Barnes CA, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: a discrepancy between observed and expected cases// *J. Clin. Pathol.* - 2002.- V. 55. – P. 289–292.
5. Sharif U, Kuban K. Prenatal intracranial hemorrhage and neurologic complications in alloimmune thrombocytopenia// *J. Child. Neurol.* - 2001. – V. 16. – P. 838–842.
6. Ahlen M.T, Husebekk A, Killie M.K et al. The Development of Severe Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia due to Anti-HPA-1a Antibodies Is Correlated to Maternal ABO Genotypes // *Clinical and Developmental Immunology.* - 2012.- Article ID 156867, 5 p.
7. Kjeldsen-Kragh J, Killie M.K, Tomter G et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia // *Blood.* – 2007. - V. 110. -P. 833–839.
8. Bertrand G, Martageix C, Jallu V, Vitry F, Kaplan C. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2006. - V. . -, P. 628–637.
9. J?gtvik S, Husebekk A, Aune B, Oian P, Dahl LB. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn // *Haematologica.* – 2008. -V. 93. - P. 870–877.
10. Bertrand G, Drame M, Martageix C, Kaplan C. Prediction of the fetal status in noninvasive management of alloimmune thrombocytopenia // *Blood.* – 2011. - V. 117. - P. 3209–3213.



# **ОСТРАЯ РЕАКЦИЯ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА У РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: ФАКТОРЫ РИСКА**

*Качан Г.Л., Шман Т.В., Минаковская Н.В., Марейко Ю.Е., Гуцина Л.М.,  
Алексейчик А.В., Шарапова С.О., Невмержицкая А.С., Волкова Л.И.*

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Республиканский  
научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии  
Минск, Беларусь

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является современным методом терапии различных заболеваний (как онкологических, так и не онкологических): острые и хронические лейкозы, миелодиспластические синдромы, наследственные и приобретенные апластические анемии, врожденные иммунодефициты и др. На современном этапе успешная трансплантация подразумевает не только излеченность основного заболевания, но также полное гематологическое и иммунологическое восстановление, отсутствие ранних и отдаленных посттрансплантационных осложнений (реакция трансплантат-против-хозяина, иммунные цитопении, хронические органые поражения), адекватное качество последующей жизни. Основной причиной летальности в раннем посттрансплантационном периоде (первые 100 дней после ТГСК) являются инфекции и острая реакция трансплантат против хозяина (оРТПХ). Частота развития оРТПХ колеблется от 30 до 80%, летальность составляет от 20 до 50%. Кроме того, острая реакция трансплантат против хозяина негативно влияет на сроки и качество иммунологической реконституции, что в конечном итоге также влияет на исход трансплантации. Вероятность развития оРТПХ связана с целым рядом факторов, зависящих как от донора, так и реципиента: степень гистосовместимости донора и реципиента, пол донора и реципиента, характеристика трансплантата, источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), интенсивность режима кондиционирования. Ранняя диагностика и прогнозирование оРТПХ необходимы для выбора адекватной

иммуносупрессивной терапии, нацеленной на снижение повреждающего действия РТПХ на ткани реципиента при одновременном сохранении эффекта трансплантат против лейкемии/опухоли (РТПЛ/О).

С целью определения факторов риска развития острой РТПХ нами проанализированы результаты 149 аллотГСК, проведенных в центре детской онкологии, гематологии и иммунологии пациентам в возрасте от полугода до 18 лет в период с июня 1998 по сентябрь 2011 года. Распределение пациентов по нозологическим группам представлено в таблице 1.

Таблица 1-Распределение пациентов по нозологическим группам

| Диагноз                           | Количество ТГСК (%) |
|-----------------------------------|---------------------|
| Острый лимфобластный лейкоз       | 48 (32,2 )          |
| Острый миелоидный лейкоз          | 30 (20,1)           |
| Хронический миелолейкоз           | 17 (11,4)           |
| Миелодиспластический синдром      | 11 (7,4)            |
| Острый бифенотипический лейкоз    | 3 (2,0)             |
| Неходжкинские лимфомы             | 3 (2,0)             |
| Апластические анемии              | 28 (18,8)           |
| Первичные иммунодефициты и другие | 9 (6,0)             |
| Всего                             | 149 (100)           |

Острая форма РТПХ (до дня +100) развилась у 79 пациентов, что составило 53%: I степень диагностирована у 17,4% пациентов, II степень – у 24,2%, III степень – у 9,4%, IV степень – у 1,3%. Клинические проявления острой РТПХ были представлены поражением кожи у 68,4% пациентов, желудочно–кишечного тракта – 38,3% пациентов и печени – 37,6% пациентов. Медиана начала проявлений оРТПХ составила +20 день (5-98).

При анализе частоты развития оРТПХ в зависимости от источника стволовых клеток установлено, что частота острой РТПХ III-IV степени значительно выше в случае использования в качестве трансплантата периферических стволовых клеток (ПСК) – 16,7% по сравнению с костным мозгом – 6,6 % (таблица 2).

Таблица 2 - Частота острой РТПХ в зависимости от источника стволовых клеток

| Степень оРТПХ | Костный мозг<br>N (%) | ПСК<br>N (%) |
|---------------|-----------------------|--------------|
| 1             | 13 (17,3)             | 14 (21,2)    |
| 2             | 18 (24,0)             | 17 (25,7)    |
| 3             | 4 (5,3)               | 10 (15,2)    |
| 4             | 1 (1,3)               | 1 (1,5)      |
| нет           | 39 (52,0)             | 24 (36,4)    |
| Всего         | 75 (100)              | 66 (100)     |

Частота оРТПХ в группе пациентов с родственной трансплантацией составила 45,7%, тогда как в группе с неродственной – 63,5 % ( $p=0,03$ ). При этом оРТПХ IV степени наблюдалась только у пациентов после неродственной ТГСК.

Мы проанализировали влияние несовпадения по полу пары донор/реципиент на развитие оРТПХ. Установлено, что в случаях любого несовпадения по полу донора и реципиента (независимо от того, кто донор – мужчина или женщина) достоверных различий частоты оРТПХ не было выявлено (по сравнению со случаями совпадения донора и реципиента по полу) – таблица 3. Однако в случае использования донора женского пола для реципиента мужского пола достоверно увеличивается частота оРТПХ II степени за счет снижения частоты оРТПХ I степени ( $p=0,02$ ).

Таблица 3 - Частота оРТПХ в зависимости от совпадений по полу пары донор/реципиент

| Степень оРТПХ | Совпадение<br>N (%) | Несовпадение<br>N (%) |
|---------------|---------------------|-----------------------|
| 1             | 15 (17,9)           | 12 (20,0)             |
| 2             | 17 (20,2)           | 18 (31,7)             |
| 3             | 9 (10,7)            | 5 (8,3)               |
| 4             | 2 (2,4)             | 0 (0)                 |
| нет           | 41 (48,8)           | 24 (40,0)             |
| Всего         | 84 (100)            | 60 (100)              |

При анализе влияния дозы ядросодержащих клеток (ЯСК) и CD34+ клеток в трансплантате на частоту развития оРТПХ достоверных межгрупповых различий выявлено не было.

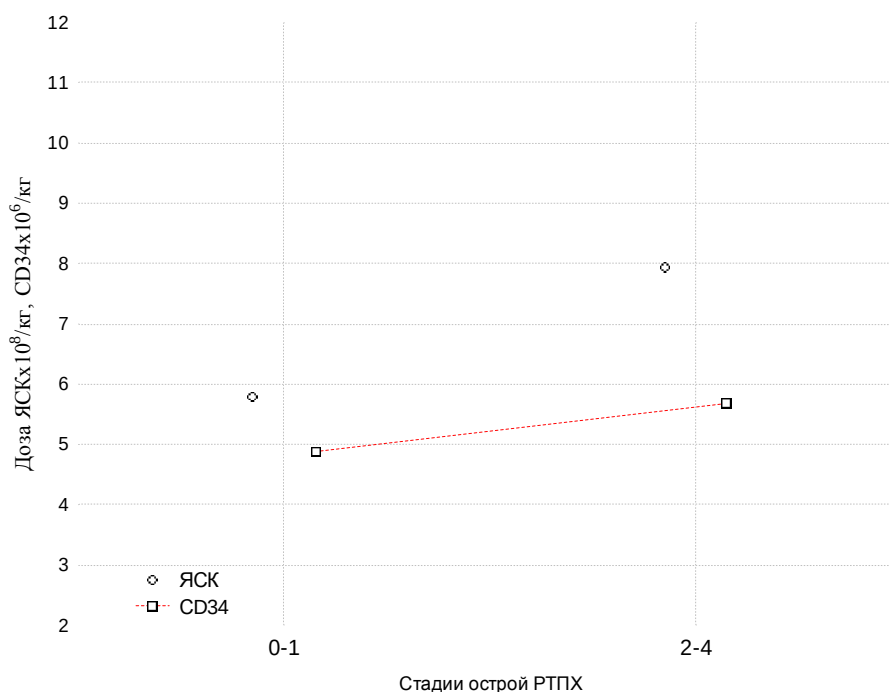


Рисунок 1 – Доза ЯСК и CD34 клеток у реципиентов неродственной ТГСК с различными стадиями острой РТПХ

Однако при неродственной ТГСК выявлено негативное влияние большего количества трансплантированных ЯСК и дозы CD34 клеток на развитие оРТПХ (рисунок 1). Среднее количество трансплантированных ЯСК и CD34+ клеток в группе пациентов с оРТПХ 2-4 степени составило  $7,3 \pm 0,98 \times 10^8/\text{кг}$  и  $11,3 \pm 2,4 \times 10^6/\text{кг}$  соответственно, тогда как в группе пациентов без оРТПХ (0-I степени) –  $5,4 \pm 0,5 \times 10^8/\text{кг}$  и  $8,2 \pm 0,65 \times 10^6/\text{кг}$  ( $p=0,037$  и  $p=0,002$ ).

Таким образом, проведенный нами анализ позволяет установить, что к факторам риска развития острой формы реакции трансплантат против хозяина относятся:

- неродственная трансплантация;
- использование ПСК в качестве трансплантата (по сравнению с костным мозгом);

- несовпадение по полу пары донор-реципиент (донор женского пола, реципиент мужского пола);
- в случае неродственной трансплантации дополнительным фактором риска является большая доза ЯСК и CD34+ клеток в трансплантате.

## Литература

- 1 Ball .LM, Egeler R.M. EBMT Paediatric Working Party. Acute GvHD: pathogenesis and classification // *Bone Marrow Transplant.*- 2008. –V.41 Suppl 2. - P.58-64.
- 2 Baron C, Somogyi R, Greller LD, et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene-expression profiling // *PLoS Med.*-2007.- V..4(1). – P.23.
- 3 Finke J, Bethge WA, Schmoor C, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial// *Lancet Oncol.*- 2009. –V.10). – P. 855–864.
- 4 Hahn T, McCarthy P.L, Jr., Zhang M.J, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia // *J Clin Oncol.*- 2008. – V. 26(35). – P.5728–5734.
- 5 Mary E. D. Flowers, Yoshihiro Inamoto, Paul A. Carpenter, Stephanie J. Lee et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria // *Blood.*- 2011. – V. 117(11). – P. 3214–3219
- 6 Wolf D, Wolf A.M, Fong D, Rumpold H, Strasak A, Clausen J, Nachbaur D. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation // *Transplantation.* -2007. – V. 83(8). – P. 1107-1113.

## **ПРОБЛЕМА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ СЛУЧАЕВ НЕЙРОБЛАСТОМЫ У ДЕТЕЙ МЛАДШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗА ПЕРИОД 2001-2010 ГОДЫ**

**Кугейко Т.Б., Зборовская А.А., Пролесковская И.В., Алейникова О.В.**

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», детский канцер субрегистр Республики Беларусь

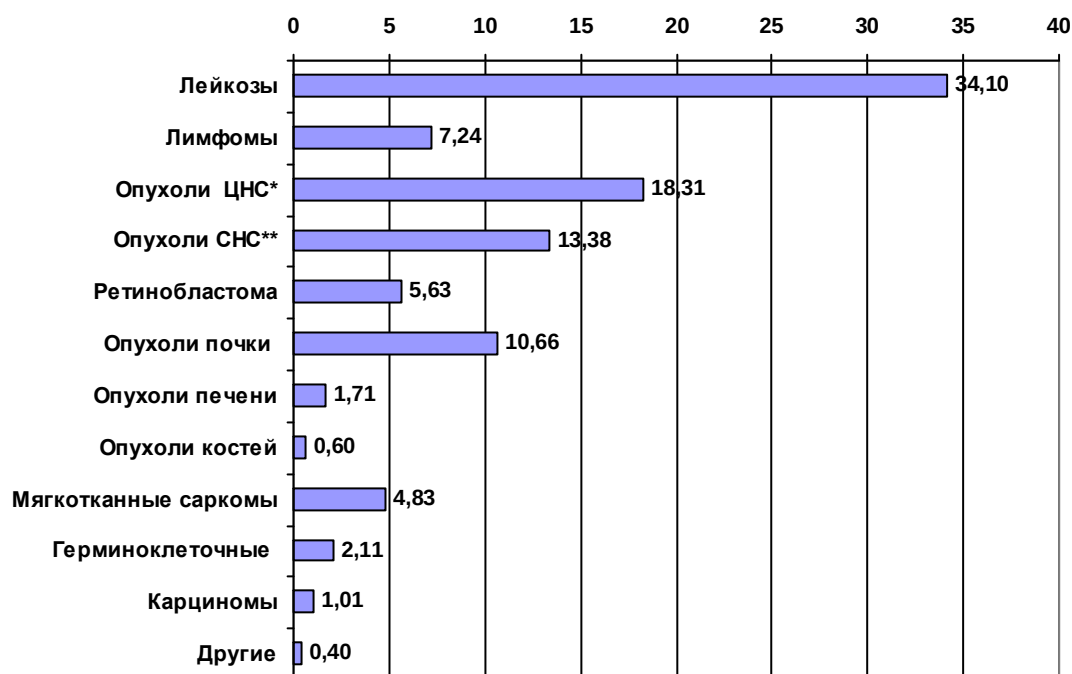
Минск, Беларусь

Одной из наиболее частых опухолей у детей младшей возрастной группы является нейробластома, составляющая приблизительно 7-11% от всех впервые выявленных злокачественных опухолей [1, 2, 6, 14-18]. Эта опухоль возникает в надпочечниках и/или периферических симпатических

нервных ганглиях и имеет трудную для ранней диагностики анатомическую локализацию [18]. В 90% случаев нейробластома диагностируется в возрастной группе до 5 лет, т.е. до времени окончательного формирования симпатических ганглиев. И приблизительно в 80% случаев нейробластомы уже при первичной диагностики имеется поражение регионарных лимфатических узлов или метастазы в кости и костный мозг [18].

Вопросы ранней диагностики нейробластомы обсуждаются уже достаточно давно [6, 10, 14-18]. Споры об эффективности и целесообразности внедрения программ, направленных на раннее выявление нейробластомы, продолжаются до сих пор [6, 7, 12, 13]. Тем не менее, различные варианты таких исследований разрабатываются и апробируются в Великобритании, Австрии, Бразилии, Норвегии, Франции, Австралии, США [6]. В России, как и в Республике Беларусь, подобные исследования до настоящего времени не проводились [6].

При этом за период с 2001 по 2010 годы по данным детского канцер-субрегистра в Республики Беларусь зарегистрировано 150 случаев впервые выявленной нейробластомы у детей (0-17 лет), что составило 5% в структуре детской онкологической заболеваемости за этот период. Из выявленных случаев 133 (89%) зарегистрированы у детей в возрасте до 5 лет, что составило 13,4% в структуре онкологической заболеваемости детей этой возрастной группы (рисунок 1).



\*ЦНС – центральная нервная система; \*\*СНС симпатическая нервная система

Рисунок 1 - Структура заболеваемости злокачественными новообразованиями у детей в возрасте от 0 до 5 лет в Республике Беларусь

Динамические данные по заболеваемости нейробластомой в Республике Беларусь за 10-летний период у детей младшей возрастной группы представлены на рисунке 2. За период 2001-2010 гг. показатель заболеваемости нейробластомой у детей в возрастной группе 0-5 лет составил  $2,77 \pm 0,24$  при среднегодовом темпе прироста 1,1%.

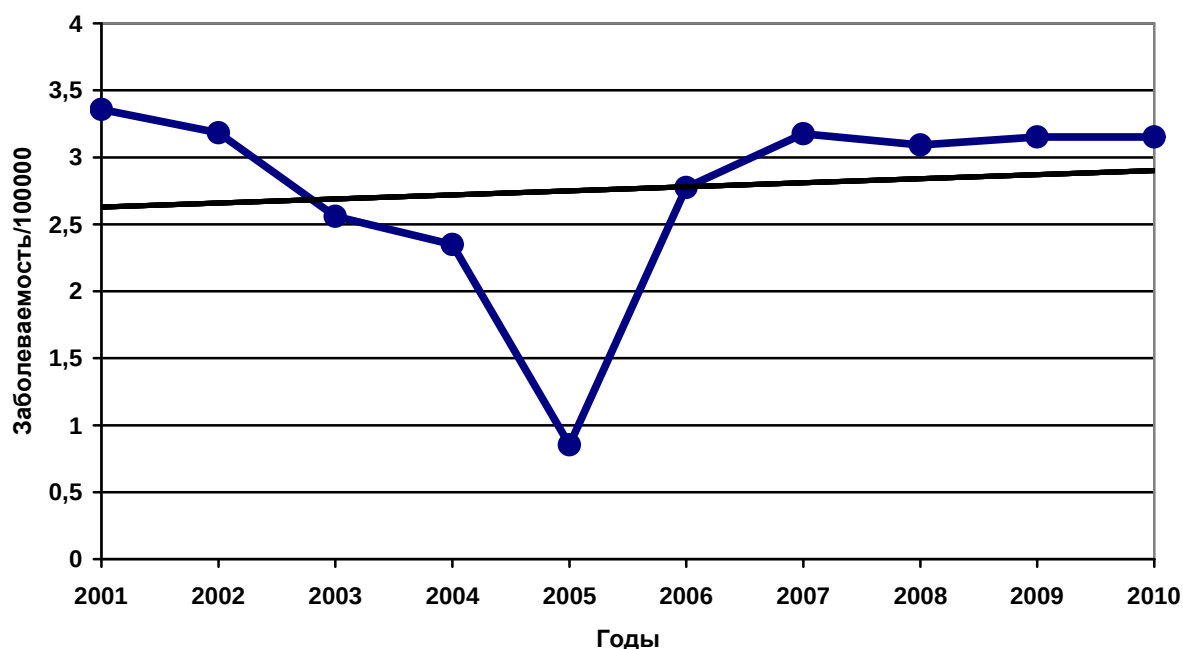
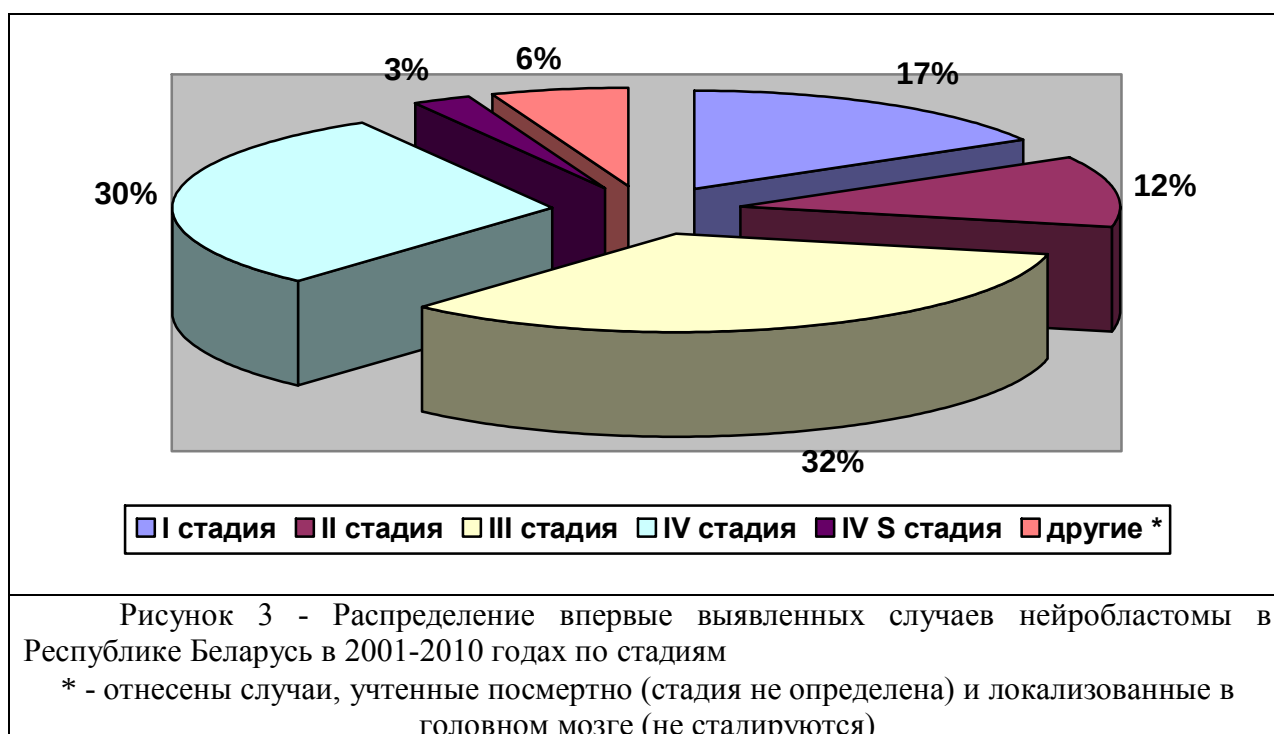


Рисунок 2 – Показатель заболеваемости нейробластомой в возрастной группе 0-5 лет в Республике Беларусь в 2001-2010 годах

К сожалению, анатомическая локализация первичного опухолевого очага и возрастные особенности затрудняют раннюю диагностику нейробластомы [18]. Количество продвинутых стадий впервые выявленной нейробластомы у детей Беларуси в 2001-2010 годах остается высоким (рисунок 3).





Смертность пациентов с нейробластомой до сих пор остается достаточно высокой без тенденции к снижению показателя. Всего за анализируемый период от нейробластомы умерло 36 пациентов в возрасте 0-5 лет, что составило 17,3% в структуре смертности от онкологических заболеваний детей данной возрастной группы. Показатель смертности за 10-летний период составил  $0,75 \pm 0,13$ , отмечается среднегодовой темп прироста 4,15% (рисунок 4). Объяснить сохраняющийся высокий уровень смертности при нейробластоме у детей и тенденцию к росту показателя в динамике за последние 10 лет только ростом заболеваемости невозможно. Несомненно, сказывается высокий удельный вес (более 60%) продвинутых стадий заболевания. Таким образом, из представленных данных видно, что в республике существует проблема поздней диагностики нейробластомы у детей, что приводит к не всегда удовлетворительным результатам лечения.

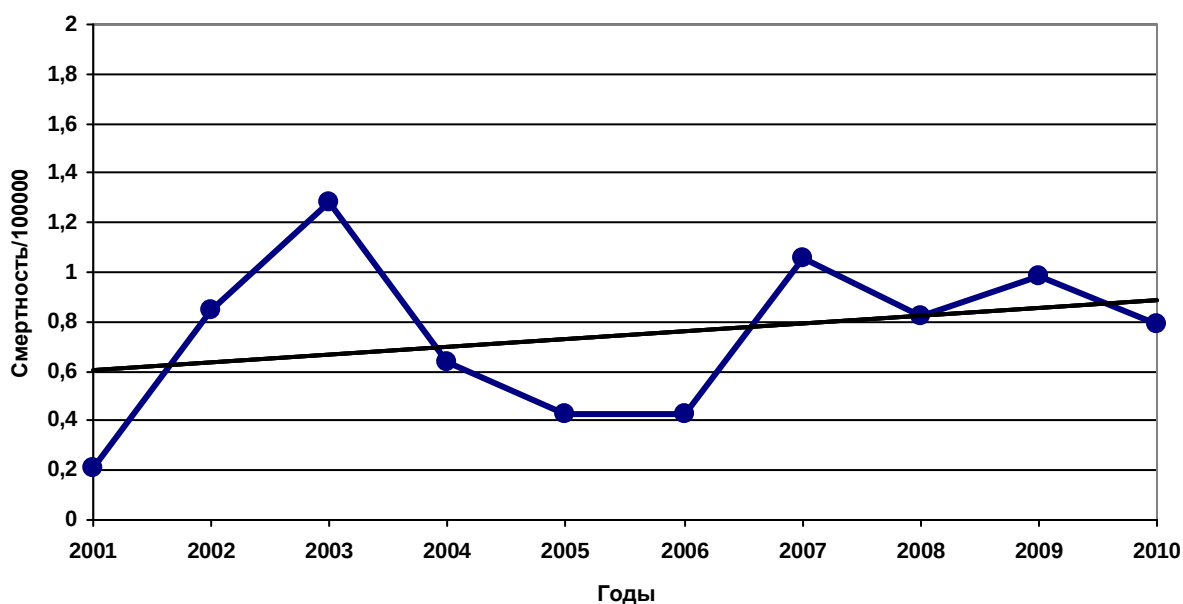
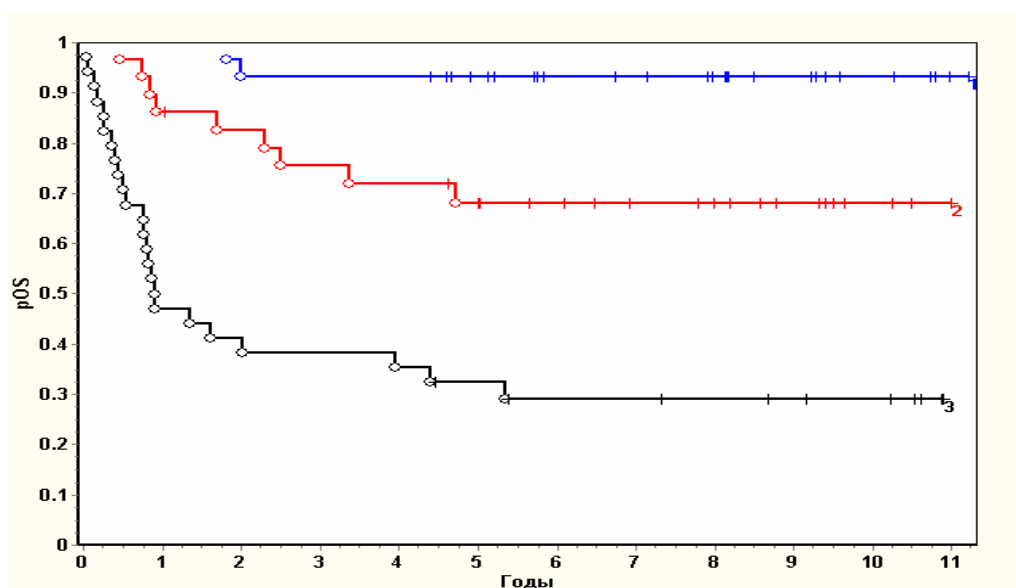


Рисунок 4 - Показатель смертности при нейробластоме в возрастной группе 0-5 лет в Республике Беларусь в 2001-2010 годах.

На рисунке 5 показана общая выживаемость 102 пациентов с впервые диагностированной нейробластомой в 2001-2007 годах в зависимости от стадии болезни. Пациенты с I, II и IVs стадиями имеют благоприятный

прогноз и, поэтому, для анализа объединены в одну группу [4], временной период ограничен 2007 годом, т.к. с 2008 года программа лечения была изменена.

Как видно из представленных данных, результаты лечения нейробластомы в Республике Беларусь сопоставимы с данными ведущих Европейских центров. Так, больные с локализованной стадией нейробластомы имеют показатель выживаемости 93%, при III-IV стадиях заболевания шансы на выживание ухудшаются до 68% и 29%, соответственно.



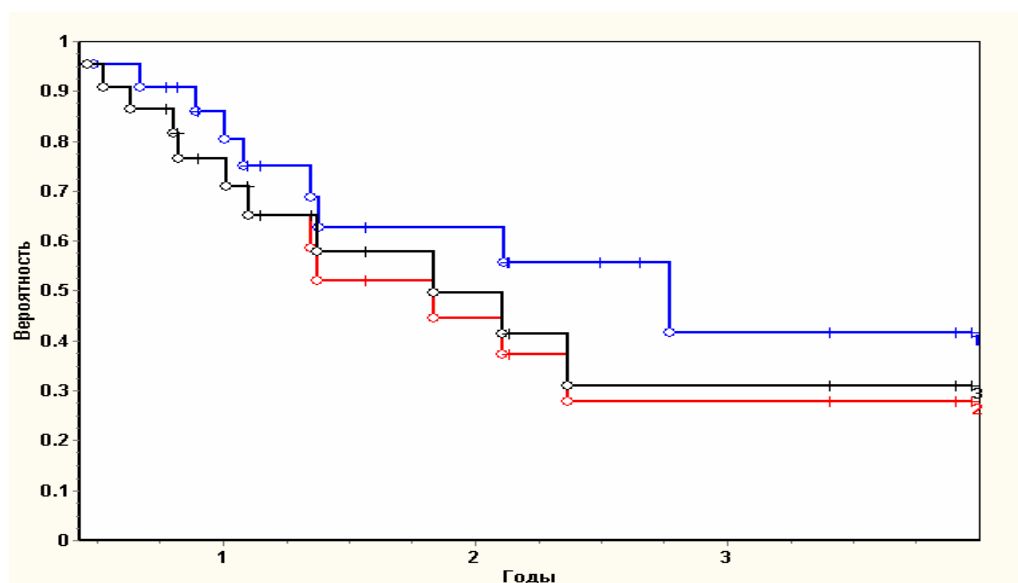
|                     |        |         |             |                    |
|---------------------|--------|---------|-------------|--------------------|
| 1. стадия I,II,IVS; | n = 30 | 28 живы | [0.93±0.05] | Mf = 97.92 месяцев |
| 2. стадия III;      | n = 29 | 19 живы | [0.68±0.09] | Mf = 71.40 месяцев |
| 3. стадия IV;       | n = 34 | 10 живы | [0.29±0.08] | Mf = 11.02 месяцев |

Рисунок 5. Общая выживаемость (overall survival) пациентов с нейробластомой, получавших лечение в 2001-2007 годах в зависимости от стадии болезни

С 2008 г. все пациенты с впервые выявленной нейробластомой в РБ получают лечение по протоколу NB 2004 М. Протокол предусматривает стратификацию по группам риска в зависимости не только от возраста и стадии заболевания, но и от наличия/отсутствия неблагоприятных цитогенетических и молекулярно-биологических маркеров опухоли (N-тус-

амплификация, del 1p). Поэтому дети, которым диагноз был выставлен в 2008-2010 годах, проанализированы отдельно. Согласно протоколу NB 2004 М к группе высокого риска относятся пациенты с 4 стадией заболевания в возрасте старше 1 года, независимо от наличия/отсутствия цитогенетических и молекулярно-биологических маркеров опухоли, а также все пациенты с амплификацией гена N-MYC независимо от стадии [5].

В 2008-2010 годах по данным детского канцер-субрегистра в РБ зарегистрировано 55 случаев впервые выявленной нейробластомы. При этом 22 (40%) пациента изначально были отнесены в группу высокого риска. Результаты лечения этих пациентов по протоколу NB 2004 М представлены на рисунке 6.



|        |        |             |                   |
|--------|--------|-------------|-------------------|
| 1. OS  | n = 22 | S=0.42±0.11 | Mf = 16,62 месяца |
| 2. EFS | n = 22 | S=0.28±0.10 | Mf = 13,68 месяца |
| 3. RFS | n = 22 | S=0.31±0.10 | Mf = 13,68 месяца |

Рисунок 6 – Общая (OS-overall survival), безсобытийная (EFS-event free survival) и безрецидивная (RFS-relapse free survival) выживаемости пациентов с нейробластомой группы высокого риска, получавших лечение в 2008-2010 годах

Приведенные данные согласуются с опубликованными международными результатами, согласно которым безрецидивная выживаемость пациентов с метастатической болезнью даже при применении

высокодозной полихимиотерапии в сочетании с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток составляет не более 30-50%, а общая 9-летняя – всего 11% [6, 7, 8].

Таким образом, проведенный эпидемиологический анализ за 10 лет свидетельствует, что в Республике Беларусь отмечается рост заболеваемости нейробластомой у детей со среднегодовым темпом прироста 1,1% в год, при этом показатель смертности не имеет тенденции к снижению. Более 60% случаев нейробластомы у детей диагностируется в распространенной стадии, что негативно влияет на результаты лечения. Стратификация пациентов по группам риска и интенсификация противоопухолевой терапии для групп с неблагоприятным прогнозом в сочетании с дифференцирующей терапией 13-цис-ретиноевой кислотой не привели к улучшению показателей выживаемости. Следовательно, с учетом современных возможностей противоопухолевой терапии, только раннее выявление злокачественного новообразования симпатической нервной системы дает реальные шансы пациентам на выздоровление. Для этого необходима разработка и внедрение скрининговых программ у детей младшей возрастной группы, нацеленных на визуализацию минимального размера новообразований брюшной полости и забрюшинного пространства.

## Литература

1. Ланцковский Ф. Детская гематология и онкология. Издательство «Лори», Нью-Йорк.
2. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. «Медпрактика-М», Москва 2006.
3. Neuroblastomstudie NB 97, Fassung vom 31.03.1998, s. 6.
4. Пролесковская И.В., Савич Т.В., Марейко Ю.Е., Савва Н.Н., Алейникова О.В.. Результаты лечения нейробластомы у детей в Республике Беларусь. // Вопросы онкологии. – 2009. – Т.55, № 2. – С. 215-220.
5. NB-2004, Trial Protocol, Version: 1.00 from 01-September-2004; Status: final
6. Панферова Т.Р., Алексеева О.А., Валентей Л.В.. Скрининг нейробластомы у детей. НИИ детской онкологии и гематологии ОНЦ РАМН Москва, Россия. Интернет-журнал «Медицинские конференции».
7. Berthold F., Hunneman D.Y., Kaser H., Harms D., Bertram U., Erttmann R., Schilling F.H., Treuner J., Zieschang J. Neuroblastoma screening: arguments from analysis of three German neuroblastoma trials//Amer. J. Pediatr. Hematol. Oncol. - 1991. - V. 13.- P. 8-13.

8. Kamani N.R. Autotransplants for neuroblastoma //Bone marrow transplantation.- 1996.- V.17.- P.301-304.
9. С.В. Петрович, И.А. Левина, Т.В. Тарун, Л.Н. Лукашевич и др. Фармакоэкономический анализ в онкологии. Сообщение 1. Стоимость затрат при лечении острого миелобластного лейкоза у детей. Медицинские новости. – 2004. - № 8. –С. 71-76.
10. Sawada T, Matsumura T., Kawakatsu H., Sugimoto T., Kuroda H., Hosoi H., Michihata T., Saida T., Hino T. Long - term effects of Mass Screening for Neuroblastoma in Infancy. Amer //J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 1991 - V.13 -P. 3-7.
11. Woods W., Lemieux B., Tuchman M. Neuroblastoma represents distinct clinical-biological entities: A review and perspective from Quebec Neuroblastoma Screening Project.// Pediatrics.-1992. - V.89 - P. 114-117.
12. Mauer A.M. Screening for neuroblastoma //J. Pediatrics. – 1988. - V.112. - P. 576-577.
13. Sawada T., Kawakatsu H., Sugimoto T. Screening for neuroblastoma// Lancet. 1987. - V. 2. - P.1204.
14. Claudia Spix, Jorg Michaelis, Frank Berthold, Rudolf Erttmann, Johannes Sander and Freimut H. Schilling. Lead-time and overdiagnosis estimation in neuroblastoma screening //Statist. Med.- 2003.- V. 22. - P.2877-2892.
15. Freimut H. Schilling, Claudia Spix, Frank Berthold, Rudolf Erttmann, Johannes Sander, Joern Treuner, Joerg Michaelis. Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated result of population based controlled trial in Germany //Cancer Letters. - 2003. – V.197. – P. 19-28.
16. Freimut H. Schilling, Claudia Spix, Frank Berthold, Rudolf Erttmann and all. Neuroblastoma screening at one year of age //N Engl J Med. - 2002. - v. 346.
17. Freimut H. Schilling, Frank Berthold, Rudolf Erttmann, Jorg Michaelis, Claudia Spix and all. Population-Based and Controlled Study to Evaluate Neuroblastoma Screening at One Year of Age in Germany: Interim Results //Medical and Pediatric Oncology.- 2000. - V.35. – P. 701-704.
18. Freimut H. Schilling, Claudia Spix, Frank Berthold, Rudolf Erttmann, Jorg Michaelis, and all. German Neuroblastoma Mass Screening Study at 12 Months of Age: Statistical Aspects and Preliminary Results// Medical and Pediatric Oncology.- 1998. –V.31. – P.435-441.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

**Кустанович А.М, Романцова А.С., Чернецкая М.А,  
Юцкевич Р.И., Алейникова О.В.**

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

Лейкоз – наиболее распространенное злокачественное новообразование детского возраста. Лейкоз имеет генетическую природу, то есть возникает и развивается в результате мутаций, происходящих в клетках

предшественниках. Выявление наиболее распространенных генетических изменений, таких как реципрокные транслокации, делеции, инверсии с участием генов *BCR*, *ABL*, *TEL*, *AML1*, *MLL* и др., а также мутаций ряда генов - *NPM1*, *FLT3*, *CEBPa* имеет практическое значение, так как они определяют биологические свойства опухолевых клеток, ассоциированы с ответом на терапию, могут использоваться для оценки прогноза результата терапии, для разделения пациентов по группам риска, являются объектами мониторинга минимальной остаточной болезни, мишенями направленной терапии. Количество таких клинически значимых генов постоянно растет в результате скрининга с использованием методов секвенирования следующего поколения, микрочипов. Анализ генетических изменений с использованием стандартных методов (ПЦР, секвенирования, определения конформационного полиморфизма однокитевых фрагментов) требует значительных трудо- и материальных затрат и большого количества опухолевых клеток. Поэтому требуется разработка и использование простого, быстрого и надежного метода одновременного определения заданного числа генов. При этом метод должен быть воспроизводим различными исследователями/сотрудниками лабораторий, быть нетрудоемким и недорогостоящим. Разработка такого метода поможет рутинной диагностике лейкозов, облегчит стандартизацию исследований и оптимизацию выбора терапевтических решений.

Целью являлась разработка метода комплексной диагностики клинически значимых генетических изменений при лейкозах у детей.

*Методы.* РНК выделяли с использованием набора Tri-Reagent в соответствии с инструкциями производителя. 1 мкг тотальной РНК в 10 мкл  $H_2O$  инкубировали 10 минут при 70°C. Охлаждали на льду и добавляли остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 100 единиц обратной транскриптазы, буфер для обратной транскрипции, дНТФ (1 мМ), DTT (10 мМ), рэндом гексамеры (25 мМ), ингибитор РНКаз (20 единиц). Инкубировали последовательно при комнатной температуре 10 минут, 42°C в

течение 45 минут, 99<sup>0</sup>С в течение 3 минут. Помещали образец на 4<sup>0</sup>С. В полученную ДНК добавляли 30 мкл H<sub>2</sub>O. Для отработки и оптимизации ПЦР использовался буфер и GoTaq полимераза фирмы Promega (США). 10 мкл продуктов ПЦР смешивали с 2 мкл бромфенолового синего и вносили в лунки 1,5% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Электрофорез проходил в течение 45 минут при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза.

*Результаты.* Мультиплексная ПЦР – это одновременная амплификация в одной реакции нескольких пар праймеров. Мультиплексный подход позволяет объединить в одной реакции определение нескольких мишеней, что приводит к экономии времени, реактивов и актуально при недостатке материала от пациентов. В то же время использование мультиплексной ПЦР, как отмечается практически во всех руководствах, рассматривающих данный подход, требует тщательной оптимизации, как концентраций всех компонентов, так и условий проведения реакции.

В ходе отработки мультиплексной ПЦР нами были протестированы различные условия проведения ПЦР и компоненты раствора для проведения реакции. Дизайн метода рассчитан на коамплификацию 4-5 химерных генов (причем, в различных вариациях праймеров для определения большинства известных транскриптов) и внутреннего контроля – гена домашнего хозяйства. Реакцию предполагается проводить в два этапа для увеличения чувствительности и специфичности амплификации. В качестве контроля использованы образцы пациентов с экспрессией соответствующих химерных генов в бластных клетках, образцы кДНК без экспрессии анализируемого химерного гена и вода в качестве нематричного контроля.

Изначально за стандартные принимались следующие условия проведения ПЦР: 1х ПЦР буфер, 0,75 единиц полимеразы, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 пмоль праймеров на реакцию (25 мкл), 2 мкл ДНК. Амплификация для первого и второго шага выполнялась в течение 30 циклов с температурным режимом 95<sup>0</sup>С, 58<sup>0</sup>С, 72<sup>0</sup>С по 30 секунд каждого этапа, затем аликвоту

реакции первого шага вносили в реакционную смесь второго шага. 5 мкл реакции второго шага анализировали на электрофореze в 1,5-2% агарозном геле.

При разработке метода оптимизировались такие параметры, как

1. Состав реакционной смеси (сочетание праймеров, их концентрация в первом и втором шаге амплификации, содержание ионов магния, хлорида калия, полимеразы, использование различных добавок, коммерческих буферов и наборов для ПЦР, количество матрицы, объем реакционной смеси),

2. Режим амплификации (количество циклов, температура отжига, температура и длительность элонгации, использование touchdownПЦР).

Ионы магния являются необходимым кофактором термостабильной ДНК полимеразы, связываются с ДНК и влияют на специфичность реакции. Недостаток магния увеличивает специфичность, но может привести к снижению количества ПЦР продукта. Дополнительное количество магния увеличивает выход реакции, но может неблагоприятно сказаться на специфичности реакции, приводя к появлению дополнительных неспецифичных полос. Поэтому нами были проанализированы различные концентрации  $MgCl_2$ , включая стандартную отправную концентрацию в 1,5 мМ, 1,7 мМ, 2,0 мМ, 2,5 мМ. Кроме того, учитывалось (как при остальных пунктах оптимизации ПЦР) то, что для первого и второго шага могут понадобиться различные концентрации реагентов, а также анализировался опыт успешных публикаций на эту тему. Для описываемого метода оптимальным было использование концентрации  $MgCl_2$  1,7 мМ в первом и 1,5 мМ во втором шаге.

Существенное влияние на результаты ПЦР оказывает кратность буфера. Обычно в ПЦР вносится 1х ПЦР буфер, однако существуют данные, что для амплификации нескольких локусов (и коротких продуктов) эффективным может быть увеличение содержания буфера до 1,5-2,0х, а для увеличения специфичности и/или для более эффективной амплификации длинных ПЦР



фрагментов имеет смысл использовать 0,7-0,9х ПЦР буфера. Причем, этот эффект приписывают содержанию KCL. Мы проанализировали комбинации 0,9-1,7х ПЦР буфера с различными концентрациями  $MgCl_2$  и в текущем варианте ПЦР остановились на 1х ПЦР буфере как в первом, так и во втором шаге ПЦР. При этом содержание полимеразы в реакции объемом 25 мкл составило 0,75-1 единицы, то есть 0,75 единицы было достаточно для специфичной амплификации мишеней.

В качестве референсных для мультиплексной ПЦР были использованы коммерческие наборы Multiplex PCR 5X MasterMix (NEB, США) и QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Германия). Эти наборы содержат специально разработанный состав буфера и концентрации солей, HotStart полимеразу (Qiagen) и оптимизированы для проведения мультиплексной ПЦР.

Несмотря на заявления производителей, в нашем случае коммерческие наборы амплифицировали не все мишени либо амплифицировали их избирательно. В результате этого было решено использовать реакционную смесь, собранную из отдельных вышеуказанных компонентов.

Предварительные эксперименты, проведенные нами, с различными добавками и их сочетаниями (ДМСО, бетаин, глицерол, ПЭГ, твин, БСА, фикол), влияющими на различные аспекты ПЦР, такие как специфичность амплификации, температура отжига, наличие ингибирования, макромолекулярные процессы в реакционном растворе, показали, что эти вещества могут быть полезны для усиления амплификации различных ПЦР продуктов. ДМСО и БСА по-разному влияли на амплификацию. Так, добавление ДМСО привело к появлению трех полос в образце с экспрессией *TEL-AML1*, а полосы в образце с экспрессией *SIL-TAL* оказались на разной высоте при сравнении этих двух добавок. Наиболее сильный сигнал наблюдался при отсутствии добавок, в то время как добавление бетаина несколько увеличивало специфичность реакции и снижало содержание димеров праймеров по сравнению с ПЭГ.

Учитывая то, что различные добавки по-разному влияют на амплификацию исследуемых локусов, в текущем варианте ПЦР решено было обходиться без вспомогательных веществ, однако наиболее перспективным

для ПЦР в данной работе можно считать использование ДМСО и бетаина, а также их сочетания.

Стандартная концентрация праймеров в типичной ПЦР составляет 0,5 мкмоль, но может варьировать в широком диапазоне. При оптимизации ПЦР мы исходили из того, что первый шаг следует сделать более специфичным, а на втором шаге увеличить чувствительность реакции путем повышения концентрации праймеров. Общее снижение концентрации праймеров объяснялось необходимостью уменьшить возможность неспецифического взаимодействия праймеров друг с другом. Увеличение специфичности реакции и появление существенных по интенсивности специфических продуктов в результате увеличения концентрации праймеров во втором шаге реакции привело к появлению слабых, но очевидных неспецифичных дополнительных продуктов ПЦР. Нами были проанализированы различные концентрации праймеров, вносимых в реакцию (3, 5, 7,5 и 10 пмоль/мкл), в различных сочетаниях для первого и второго шага. В случае более высокой концентрации праймеров, появлялись те же либо дополнительные неспецифические полосы. Поэтому снижения неспецифических взаимодействий праймеров как на первой, так и на второй стадии ПЦР использовали 5 пмоль праймеров. В ряде случаев для более эффективной амплификации отдельных мишеней снижали концентрацию праймеров для контрольного и увеличивали – для исследуемых генов.

Для амплификации отдельных генов-мишеней были разработаны праймеры и отработаны условия их амплификации, отобраны наиболее эффективные пары праймеров для первого и второго шага. После проверки праймеров в синглплексной ПЦР (от 2 до 4 праймеров для определения одной мишени), праймеры тестировались в различных сочетаниях для оценки совместной амплификации разных мишеней. Объединение в мультиплексную ПЦР праймеров является технически более сложной задачей в силу необходимости оптимизировать состав буферной системы, различной эффективности амплификации длинных и коротких продуктов и

снижения амплификации ряда продуктов в результате взаимодействия между праймерами. При объединении праймеров в мультиплексной реакции возможно неспецифическое взаимодействие между ними и в ряде случаев приходилось подбирать иные сочетания праймеров.

В состав реакции для определения молекулярно-генетических изменений при ОЛЛ входила комбинация из 9 праймеров для каждого шага. При ОМЛ в состав реакции для амплификации использовалась комбинация из 18 праймеров для каждого шага. При этом праймеры были разделены на две реакции для амплификации на каждой стадии (1 и 2 шага), учитывая гетерогенность точек разрыва в генах RARa и MYH11. В состав реакции для определения перестроек гена MLL входила комбинация из 24 праймеров для каждого шага. В данном случае с учетом гетерогенности точек разрыва в гене MLL праймеры также были разделены на две реакции для каждого шага ПЦР.

Важным параметром, влияющим на результаты амплификации, является режим амплификации. Одним из параметров, использовавшимся при разработке праймеров была универсальная температура отжига – 58<sup>0</sup>С. Для выбора режима ПЦР было протестировано несколько вариантов: 1) Денатурация при 95<sup>0</sup>С в течение 3 минут, 33 цикла амплификации 95<sup>0</sup>С – 30 секунд, 58<sup>0</sup>С – 30 секунд, 72<sup>0</sup>С – 30 секунд, и завершающий шаг - 72<sup>0</sup>С – 5 минут; 2) Touchdown ПЦР до 58<sup>0</sup>С; 3) Денатурация при 95<sup>0</sup>С в течение 2 минут, 97<sup>0</sup>С в течение 1 минуты и 25 циклов амплификации (95<sup>0</sup>С – 20 секунд, 58<sup>0</sup>С – 25 секунд, 72<sup>0</sup>С – 30 секунд) и завершающий шаг - 72<sup>0</sup>С – 5 минут.

Кроме этого, рассматривались варианты снижения температуры элонгации до 68<sup>0</sup>С и изменения температуры отжига с 58 до 56<sup>0</sup>С и 59-60<sup>0</sup>С. В текущем варианте ПЦР используется обычная гнездная мультиплексная ПЦР с температурой элонгации 72<sup>0</sup>С (вариант амплификации №3 указанный выше).

*Заключение.* На данном этапе выполнения работы нами проводилась оптимизация состава буферной системы, концентрации MgCl<sub>2</sub>, KCl,

подбирались концентрации праймеров в одностадийной ПЦР и их комбинации в гнездовой мультиплексной ПЦР, анализировался температурный профиль ПЦР. В результате выполнения этапа была разработана мультиплексная ПЦР для определения экспрессии химерных генов экспрессии *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *SIL-TAL1*, *E2A-HLF*, *NUP-ABL1* при ОЛЛ, *PML-RAR $\alpha$* , *NPM1-RAR $\alpha$* , *PLZF-RAR $\alpha$* , *CBFB-MYH11*, *AML1-ETO*, *DEC-CAN* при ОМЛ, *BCR-ABL*, *CALM-AF10* и *MLL-AF4*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-AF10*, *MLL-ENL*, *MLL-ELL* при острых лейкозах. В ходе отработки мультиплексной ПЦР нами были протестированы различные компоненты реакционной смеси и температурные режимы проведения ПЦР. Дизайн метода рассчитан на двухшаговую коамплификацию 4-5 химерных генов и внутреннего контроля – гена домашнего хозяйства. Всего данная система позволяет определять экспрессию 19 химерных генов и около 80 их сплайс-вариантов.

## **МУТАЦИИ ГЕНОВ НУКЛЕОФОСМИНА И СЕВРА ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ: ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО – ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

*Кустанович А.М., Волочник Е.В., Чернецкая М.А., Кирсанова Н.П.,  
Алейникова О.В.*

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

Всемирная организация здравоохранения выделяет группу ОМЛ с нормальным кариотипом (НК), в которых хромосомные aberrации не определяются цитогенетическими методами [1]. Больные с нормальным кариотипом традиционно относятся к группе с промежуточным прогнозом. Различный ответ внутри этой группы на проводимую терапию

свидетельствует о том, что патогенетические мутации и особенности биологии опухолевых клеток таких пациентов еще недостаточно изучены. Именно для этой группы актуальным является определение дополнительных молекулярно-биологических маркеров, определяющих прогноз заболевания [2, 3]. В последние годы выявлены некоторые типы нарушений генома, которые не обусловлены видимыми хромосомными aberrациями, но вовлекают гены, играющие важную роль в гемопоэзе и в патогенезе лейкозов. Среди таких изменений можно отметить мутации генов *NPM1* и *CEBPa*.

Ген *NPM1* расположен на хромосоме 5q35 и содержит 12 экзонов. Являясь ядерным нуклеопротеином, *NPM1* мигрирует между ядром и цитоплазмой, перенося прерибосомальные комплексы в цитоплазму. В цитоплазме он участвует в дупликации центросом и взаимодействует с компонентами p53/MDM2 сигнал-проводящего пути. Мутации гена *NPM1* характерны для лейкозов (ОМЛ) и пока не выявлены при других новообразованиях. Мутации *NPM1* преимущественно встречаются в 12 экзоне и приводят к утрате сигнала ядерной локализации. В результате этого белок остается локализован преимущественно в цитоплазме [4]. Частота мутаций у детей с ОМЛ составляет 2-6,5%. У взрослых встречаемость мутаций варьирует от 25 до 35%, что свидетельствует о различии в биологии ОМЛ детей и взрослых. Мутации *NPM1* являются первичными событиями по отношению к *FLT3-ITD* или другим мутациям, ассоциированы с нормальным кариотипом, по крайней мере, у взрослых и практически исключают появление случайных хромосомных перестроек.

Ген *CEBPa* (19q13.1) принадлежит к семейству ССААТ/энхансер-связывающих белков, регулирующих баланс процессов пролиферации и терминальной дифференцировки. Описано три механизма инактивации *CEBPA*: 1) снижение экспрессии *CEBPA*, вызванное AML1-ETO [5]; 2) ингибирование трансляции мРНК, индуцированное BCR-ABL [6]. 3) инактивирующие мутации, обнаруженные при гематологических

новообразованиях, в частности при ОМЛ [7]. Мутации *CEBPA* выявляются в 5-14% ОМЛ, при этом частота мутаций снижается по мере увеличения уровня дифференцировки бластных клеток. При ОМЛ утрата функций *CEBPA* происходит не полностью (например, не было описано би-аллельных нуль мутантов), а также частично компенсируется функционированием других членов белкового семейства, что приводит к неполной миелоидной дифференцировке бластных клеток [8, 9].

Материалы и методы: Анализ мутаций генов *NPM1*, *WT1*, *CEBPA* в образцах костного мозга *de novo* пациентов с острыми лейкозами проводился определяли с использованием фрагментного анализа и/или секвенирования.

Результаты: Мутации *NPM1* определялись в 8,2% (7/85) случаев ОМЛ. У 5/7 пациентов (71%) присутствовала мутация А типа (ТСТГ) – наиболее распространенного у взрослых пациентов с ОМЛ (в встречается в 60-70% случаев с мутантным геном), у двоих пациентов (29%) вставка имела последовательность TGCA. Во всех случаях это были тетрануклеотидные вставки в 12 экзоне.

Среди детей с мутацией *NPM1* преобладали девочки - 71% (5/7). Все дети были старше 4 лет – в то время как в группе без мутации *NPM1* насчитывается 25% детей до 4 лет. Хотя различия по возрасту не достоверны, эти данные соответствуют литературным, согласно которым мутация *NPM1* ассоциирована со старшим возрастом и женским полом.

Бластные клетки всех пациентов с мутацией имели нормальный кариотип согласно данным стандартной цитогенетики ( $p < 0,05$ ), характеризовались преимущественно (83%) М2 подтипом миелобластов по FAB классификации ( $p < 0,05$ ) и низкой частотой экспрессии CD34 ( $p < 0,05$ ). Эти различия в целом сохранялись и при сопоставлении пациентов с мутацией и без нее в группе с нормальным кариотипом. У пациентов с мутацией был относительно низкий инициальный лейкоцитоз ( $p = 0,08$ ) и процент бластных клеток.

Мутации гена *CEBPA* были обнаружены у 11,5% (7/62) детей с ОМЛ (не включая М3). Лейкозный клон, несущий мутацию *CEBPA* преимущественно

характеризовался М2 морфологией клеток по FAB классификации ( $p < 0,05$ ) и высоким уровнем экспрессии CD34 (у 4 из 5,  $p > 0,05$ ). Не было выявлено корреляции мутаций гена *CEBPA* с такими параметрами, как пол, возраст, лейкоцитоз и процент бластных клеток.

У 4 человек определялась одна мутация в гене, тогда как у троих обнаружено несколько мутаций (рисунок 1). Множественные мутации *CEBPA* могут происходить как на одном, так и на разных аллелях гена. Обнаруженные мутации располагались в двух регионах - R1 – расположенном перед первым ТАД доменом и 2 – на границе ТАД2 (R2). Показано, что мутации в этих регионах приводят к уменьшению экспрессии 42 кДа белка CEBPA и увеличивают экспрессию 30 кДа изоформы, доминантно-негативно ингибирующей функционирование основного белка, блокируя его ДНК связывание [10]. При этом блокируется дифференцировка миелоидных клеток (однако не полностью) и антипролиферативный эффект основного белка. То же самое происходит и при *AML1-ETO*-позитивных ОМЛ, при которых *AML1-ETO* ингибирует экспрессию *CEBPA*.

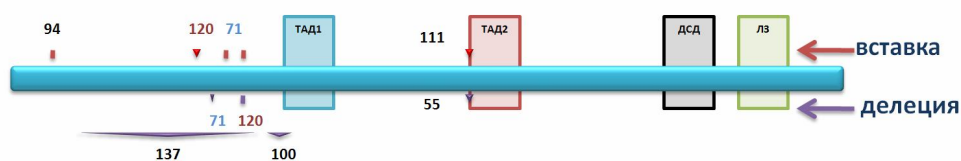


Рисунок 1 – Схема расположения мутаций у обследованных детей с ОМЛ. Голубой прямоугольник представляет собой схематичное изображение гена. Числа – номера пациентов. Над геном изображены вставки, под геном – делеции. Их размер отражает длину мутантной части гена. Вертикальные прямоугольники отражают области, кодирующие соответствующие белковые домены – ТАД – трансактивирующий, ДСД – ДНК-связывающий, ЛЗ – область лейциновых застёжек.

Наличие мутаций в генах *NPM1* и *CEBPA* было сопоставлено с цитогенетическими характеристиками лейкозных клонов пациентов, со статусом гена *FLT3* – наличием или отсутствием внутренней tandemной дупликации (ITD), с наличием прогностически значимых химерных онкогенов (таблица 1).

Мутации *NPM1* встречались в ОМЛ с нормальным кариотипом. У одного пациента к преобладающему клону с нормальным кариотипом добавляется

минорный клон с делецией участка девятой хромосомы. Внутренняя tandemная дупликация *FLT3 (FLT3-ITD)* была обнаружена у 2 пациентов с мутацией *NPM1* (28% случаев с *NPM1<sup>mut</sup>*). Оба этих пациента умерли.

Для мутаций *CEBPA* ситуация сходная - лейкозные клоны 3 пациентов имеют нормальный кариотип, еще у одного пациента к доминантному клону с нормальным кариотипом добавляется клон с делецией участка на 6 хромосоме. У одного из пациентов (№11 в таблице 1) определяется химерный ген *AML1-ETO*, делеция Y хромосомы и участка 9 хромосомы. Ни в одном случае с мутацией *CEBPA FLT3-ITD* не определялась.

Как видно из таблицы 1, 72% (8/11) детей с мутациями в описываемых генах имели нормальный кариотип. Мутации *CEBPA* и *NPM1* одновременно не определялись, однако *NPM1* в двух случаях с нормальным кариотипом определялись совместно с мутацией *FLT3-ITD*.

Таблица 1 – Цитогенетическая характеристика ОМЛ с мутациями в генах *NPM1* и *CEBPA*.

| №  | Ген          | Прогностическая группа | Кариотип                               | Особенности кариотипа | FLT3-ITD | Событие           |
|----|--------------|------------------------|----------------------------------------|-----------------------|----------|-------------------|
| 1  | <i>NPM1</i>  | Неблагоприятная        | 46XY[13]/46XY, del(9)(p13p22)[4]       |                       | +        | Рецидив /смерть   |
| 2  | <i>NPM1</i>  | Неблагоприятная        | 46,XX[20]                              | НК*                   | —        | ремиссия          |
| 3  | <i>NPM1</i>  | Промежуточная          | 46,XX                                  | НК                    | +        | смерть            |
| 4  | <i>NPM1</i>  | Промежуточная          | 46,XY[18]                              | НК                    | —        | ремиссия          |
| 5  | <i>NPM1</i>  | Промежуточная          | 46,XX[20]                              | НК                    | —        | ремиссия          |
| 6  | <i>NPM1</i>  | Промежуточная          | 46 XX[20]                              | НК                    | —        | ремиссия          |
| 7  | <i>CEBPA</i> | Промежуточная          | 46, XY [17] 46, XY, del(6)(q15q21) [3] |                       | —        | смерть            |
| 8  | <i>CEBPA</i> | Промежуточная          | 46, XY [14]                            | НК                    | —        | ремиссия          |
| 9  | <i>CEBPA</i> | Промежуточная          | 46,XY[20]                              | НК                    | —        | Рецидив /ремиссия |
| 10 | <i>CEBPA</i> | Промежуточная          | 46,XX[20]                              | НК                    | —        | ремиссия          |



Продолжение таблицы 1

|    |              |               |                                                                     |         |   |          |
|----|--------------|---------------|---------------------------------------------------------------------|---------|---|----------|
| 11 | <i>CEBPA</i> | Благоприятная | 45 X, -Y, t(8;21)(q22;q22), del(9)(q12;q32)-6 метаф. 46 XY-5 метаф. | T(8;21) | – | ремиссия |
|----|--------------|---------------|---------------------------------------------------------------------|---------|---|----------|

\*-НК – нормальный кариотип, КК – комплексный кариотип, 11q23 – перестройки с участием гена MLL, t(8;21) – транслокация, приводящая к формированию химерного гена AML1-ETO.

Пациенты с мутацией *NPM1* характеризуются более высокими показателями выживаемости по сравнению с группой без мутации (таблица 2). Это различие недостоверно при анализе всей группы пациентов с ОМЛ. Достоверно более благоприятным прогнозом обладают пациенты с НК и мутацией в *NPM1*. Если же учитывать неблагоприятное влияние *FLT3-ITD* на прогноз и анализировать группу пациентов с *NPM1*-мутацией, но без мутации *FLT3-ITD* в лейкозном клоне, то такие дети имеют 100%-ную выживаемость как в группе ОМЛ пациентов, так и при анализе только группы НК. Дети с мутантным *CEBPA* имеют в 1,5-2 раза более высокие показатели выживаемости по сравнению с пациентами без мутации, однако эти различия были недостоверны.

Выживаемость детей с нормальным кариотипом в целом составила около 20%. Учитывая высокую встречаемость мутаций исследуемых генов в группе пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом, выживаемость в этой цитогенетической группе была проанализирована в зависимости от наличия прогностически благоприятных – *NPM1*<sup>mut</sup>/*CEBPA*<sup>mut</sup> и неблагоприятных мутаций – *WT1*<sup>mut</sup>/*FLT3-ITD*. Как и в случае со всей группой пациентов с ОМЛ, такое подразделение позволяет вычленить в группе с нормальным кариотипом (без прогностически значимых цитогенетических перестроек) прогностически благоприятную группу пациентов с мутациями *NPM1*<sup>mut</sup>/*CEBPA*<sup>mut</sup>.

Таблица 2 – Выживаемость пациентов с ОМЛ с учетом мутаций генов *NPM1* и *CEBPA*

| Ген                                 | ОМЛ |          |             |    |       |              |       |             | ОМЛ с нормальным кариотипом |           |             |    |      |       |    |     |              |  |
|-------------------------------------|-----|----------|-------------|----|-------|--------------|-------|-------------|-----------------------------|-----------|-------------|----|------|-------|----|-----|--------------|--|
|                                     | п   | БРВ, **% | Р           | п  | БСВ   | Р            | ОВ    | Р           | п                           | БРВ, %    | Р           | п  | БСВ  | Р     | п  | ОВ  | Р            |  |
| <i>NPM1<sup>mut*</sup></i>          | 5   | 78(7)    | >0.05       | 6  | 61(7) | >0.05        | 67    | >0.05       | 4                           | 100 (4,5) | <b>0,04</b> | 5  | 78   | 0,02  | 5  | 28  | <b>0,06</b>  |  |
| <i>NPM1<sup>wt</sup></i>            | 55  | 15(7)    |             | 71 | 28(7) |              | 33    |             | 13                          | 10,5      |             | 15 | 10,7 |       | 15 | 80  |              |  |
| <i>NPM1<sup>mut</sup>/FLT3-ITD-</i> | 4   | 100      | <b>0.04</b> | 4  | 100   | <b>0.016</b> | 100   | <b>0.02</b> | 4                           | 100 (4,5) | <b>0,04</b> | 4  | 10   | 0,002 | 4  | 26  | <b>0,006</b> |  |
| <i>NPM1<sup>wt</sup></i>            | 56  | 34       |             | 73 | 27    |              | 32    |             | 13                          | 10,5      |             | 16 | 100  |       | 16 | 100 |              |  |
| <i>CEBPA<sup>mut</sup></i>          | 4   | 75(5)    | >0.05       | 5  | 60(5) | >0.05        | 80(6) | >0.05       |                             |           |             |    |      |       |    |     |              |  |
| <i>CEBPA<sup>wt</sup></i>           | 34  | 44       |             | 45 | 37    |              | 38    |             |                             |           |             |    |      |       |    |     |              |  |

Mut – мутантный вариант гена, WT – Ген дикого типа, БРВ – безрецидивная выживаемость, БСВ – безсобытийная выживаемость, ОВ – общая выживаемость, В скобках указано число лет, для которых анализировались данные.

Сходная картина наблюдается и при анализе группы с промежуточным прогнозом. Выживаемость пациентов в этой группе (многие из которых имеют нормальный кариотип лейкозных бластов) составляет около 33%. В пределах этой группы пациенты с *NPM1*<sup>mut</sup>/*CEBPA*<sup>mut</sup> имеют 100% общую выживаемость, тогда как 4 детей с *WT1*<sup>mut</sup>/*FLT3-ITD* умерли. Следует, однако, учитывать малые размеры проанализированных выборок, а также то, что неблагоприятное прогностическое значение в группе *WT1*<sup>mut</sup>/*FLT3-ITD* в первую очередь определяется наличием *FLT3-ITD*, тогда как различия по выживаемости между пациентами с *NPM1*<sup>mut</sup> или *CEBPA*<sup>mut</sup> и *WT1*<sup>mut</sup> недостоверно, хотя и различается в 2 раза ( $p > 0,1$  для пары *NPM1*<sup>mut</sup>/*WT1*<sup>mut</sup> и  $p = 0,08$  для *CEBPA*<sup>mut</sup>/*WT1*<sup>mut</sup>).

Пациенты с *NPM1*<sup>mut</sup>, но без *FLT3-ITD* в лейкозном клоне характеризуются достоверно более высокими показателями общей, безсобытийной и безрецидивной выживаемости при анализе как всей группы пациентов с ОМЛ, так и детей с нормальным кариотипом опухолевых бластов. Выделение *NPM1*<sup>mut</sup>/*CEBPA*<sup>mut</sup> позволяет выделить прогностически благоприятную группу детей как среди всей когорты пациентов с ОМЛ, так и в группах с нормальным кариотипом или промежуточным прогнозом.

## Литература

1. Gaidzik V, Dohner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. // *Semin Oncol.* – 2008. – V. 35(4). – P. 346-355.
2. Falini B et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. // *N Engl J Med.* – 2005. – V. 352. – P. 254-266.
3. Frohling S et al. CEBPA Mutations in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: Prognostic Relevance and Analysis of Cooperating Mutations. // *J Clin Oncology.* – 2004. – V. 22. – P. 624-633.
4. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. // *Arch Pathol Lab Med.* – 2006. – V. 130. – P. 1687-1692.
5. Pabst T et al. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. // *Br J Cancer.* – 2009. – V.100(8). – P.1343-1346.
6. Perrotti D et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. // *Nat Genet.* – 2002. – V.30(1). – P.48-58.
7. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias // *Nat Rev Cancer.* – 2004. – V.4(5). – P. 394-400.
8. Radomska HS et al. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. // *J Exp Med.* — 2006. – V. 203(2). – P.371-381.
9. Green CL et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. // *J Clin Oncol.* – 2010. – V. 28. – P. 2739-2747.
10. Leroy H et al. CEBPA point mutations in hematological malignancies. // *Leukemia.* – 2005. – V. 19. – P. 329-334.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ MLL-ПОЗИТИВНОМ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

**Кустанович А.М., Романцова А.С., Стеганцева М.В., Волочник Е.В., Курсанова  
Н.П., Белевцев М.В., Алейникова О.В.**

Республиканский Научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии  
Минск, Беларусь.

При лейкозах, как остром лимфобластном (ОЛЛ), так и остром миелобластном (ОМЛ) выделяют группу хромосомных перестроек с участием гена *MLL* (от mixed lineage leukemia), расположенного в локусе 11q23 [1].

Дети с перестройками гена *MLL* характеризуются неблагоприятным прогнозом, хотя появляются данные о том, что прогноз может определяться

конкретным типом химерного гена [2], а интенсификация терапии позволяет относить этот подтип лейкозов к группе с промежуточным прогнозом.

Анализ перестроек гена *MLL* имеет существенное клиническое значение для распределения пациентов с лейкозами по группам риска с целью оптимизации проводимой терапии с учетом неблагоприятного прогноза транслокаций *MLL*, а также для мониторинга минимальной остаточной болезни. Поэтому определение типа перестройки гена *MLL* является необходимым условием успешной терапии [3].

Перестройки с участием гена *MLL* относят к наиболее распространенным абберациям при гематологических злокачественных новообразованиях. Они выявляются в 5-10% ОЛЛ детей и взрослых, ОМЛ, при МДС и бифенотипическом лейкозе. 80% лейкозов у детей до года и 25% вторичных/вызванных терапией лейкозов также характеризуются наличием перестроек с вовлечением *MLL*.

Целью работы был анализ молекулярно-биологических особенностей перестроек *MLL* гена и оценка их прогностического значения при острых лейкозах у детей.

Методы: Анализ перестроек гена *MLL* (в первую очередь, *MLL-AF4*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-AF10*, *MLL-ENL*, *MLL-ELL*) в образцах костного мозга *de novo* пациентов с острыми лейкозами проводился с использованием мультиплексной ПЦР и цитогенетических методов [4]. Мутации генов *NPM1*, *WT1*, *CEBPA* определяли с использованием фрагментного анализа и/или секвенирования.

Результаты: *MLL*-позитивные лейкозы (*MLL*+) определялись в 13,8% ОЛ. При ОЛЛ перестройки *MLL* встречались в 8,1% случаев, при ОМЛ (не включая промиелоцитарный лейкоз (М3)) – в 28,5% (по литературным данным – 15-25% ОМЛ, включая М3) (таблица 1). При рецидивах частота встречаемости *MLL*+ ОЛЛ составила 12% (n=14), а *MLL*+ ОМЛ – 34,7% (n=23) (таблица 2).

В 80% *MLL*+ позитивных лейкозов при ОМЛ в нашем исследовании преимущественно определялась экспрессия генов *MLL-AF9* и *MLL-AF10* (что раза в 1,5 превосходит значения, приводимые другими авторами (33% и 23%, соответственно) [5], при ОЛЛ – *MLL-AF4*, *MLL-ENL*. Отмечены также единичные случаи других перестроек с участием гена *MLL* (*MLL-AF1q*, *MLL-AFX*, *MLL-AF6*).

Таблица 1 – Перестройки гена *MLL* у пациентов с ОЛ

| Ген             | ОЛ            |     | ОМЛ           |      | ОЛЛ           |     |
|-----------------|---------------|-----|---------------|------|---------------|-----|
|                 | Встречаемость | %   | Встречаемость | %    | Встречаемость | %   |
| <i>MLL-AF9</i>  | 15/300        | 5,0 | 12/80         | 15,0 | 3/220         | 1,4 |
| <i>MLL-AF10</i> | 9/301         | 3,0 | 7/82          | 8,5  | 2/219         | 0,9 |
| <i>MLL-ENL</i>  | 8/303         | 2,6 | 2/83          | 2,4  | 6/220         | 2,7 |
| <i>MLL-AF1q</i> | 1/206         | 0,5 | 1/74          | 1,4  | 0/132         | 0   |
| <i>MLL-AFX</i>  | 0/203         | 0   | 0/75          | 0    | 0/128         | 0   |
| <i>MLL-ELL</i>  | 1/307         | 0,3 | 1/83          | 1,2  | 0/224         | 0   |
| <i>MLL-AF6</i>  | 0/308         | 0   | 0/84          | 0    | 0/224         | 0   |
| <i>MLL-AF1P</i> | 1/208         | 0,5 | 0/74          | 0    | 1/133         | 0,8 |
| <i>MLL-AF17</i> | 0/206         | 0   | 0/74          | 0    | 0/132         | 0   |
| <i>MLL-AF4</i>  | 8/428         | 1,9 | 0/83          | 0    | 8/345         | 2,3 |

Таблица 2 – Перестройки гена *MLL* у пациентов с рецидивом ОЛ

| Ген             | ОМЛ           |      | ОЛЛ           |     |
|-----------------|---------------|------|---------------|-----|
|                 | Встречаемость | %    | Встречаемость | %   |
| <i>MLL-AF9</i>  | 2/15          | 13,3 | 0/23          | 0   |
| <i>MLL-AF10</i> | 3/14          | 21,4 | 1/23          | 4,3 |
| <i>MLL-ENL</i>  | 0/14          | 0    | 1/23          | 4,3 |
| <i>MLL-AF1q</i> | 0/14          | 0    | 0/22          | 0   |
| <i>MLL-AFX</i>  | 0/14          | 0    | 0/22          | 0   |
| <i>MLL-ELL</i>  | 0/14          | 0    | 0/25          | 0   |
| <i>MLL-AF6</i>  | 0/14          | 0    | 0/26          | 0   |
| <i>MLL-AF1P</i> | 0/14          | 0    | 0/22          | 0   |
| <i>MLL-AF17</i> | 0/14          | 0    | 0/22          | 0   |
| <i>MLL-AF4</i>  | 0/14          | 0    | 1/33          | 3,0 |

Существует определенная линейная специфичность экспрессии химерных онкогенов с вовлечением *MLL* (рисунок 1). *MLL-AF4* и *MLL-ENL* экспрессируются преимущественно при ОЛЛ (в 6,1% и 2,3% В-линейных ОЛЛ), тогда как *MLL-AF9* и *MLL-AF10* встречаются в основном при ОМЛ (в 9,5% и 5,3%), хотя эта линейная специфичность не абсолютна. В то время как

*MLL-AF4* был обнаружен только при ОЛЛ, гены *MLL-AF9*, *MLL-AF10* и *MLL-ENL* определяются как при ОМЛ, так и при ОЛЛ. Это позволяет предположить вклад вторичных (эпи)генетических изменений или микроокружения в формирование линейности лейкоза [6]. Существует предположение, что линейная специфичность может быть связана со сплайс-вариантами химерных транскриптов. Так, ОЛЛ чаще ассоциирован с перестройками *MLL-ENL*, в ходе которых *MLL* сливается с N-концевым участком *ENL* (*bcr1* и *bcr3*), тогда как при ОМЛ чаще выявляются слияния с С-концевой областью (*bcr2* и *bcr4*).

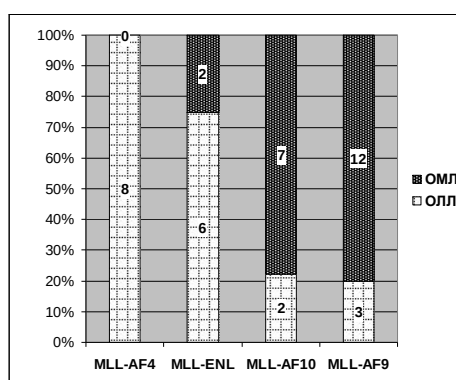


Рисунок 1 – Линейная специфичность экспрессии химерных генов с вовлечением *MLL*.

Распределение перестроек гена *MLL* в пределах различных подтипов острых лейкозов также неравномерно. При ОМЛ в 61% и 71%, соответственно, экспрессия химерных генов *MLL-AF9* и *MLL-AF10* преимущественно определялась при М4/М5 подтипах. При ОЛЛ *MLL-AF4* экспрессировался при про-В подтипе, ген *MLL-ENL* определялся как при В- (на разных стадиях), так и при Т-линейном ОЛЛ (кортикальный Т-ОЛЛ).

20% детей с перестройками *MLL* при ОМЛ были младше 1 года, при ОЛЛ таких детей было 30%. При ОМЛ медиана возраста детей с *MLL*+ лейкозами составила 4,5 лет ( $n=19$ ), без перестроек – 10,5 лет ( $n=55$ ,  $p<0,01$ ), при ОЛЛ эти значения были 2,6 ( $n=18$ ) и 4,9 ( $n=190$ ,  $p>0,05$ ). Около 80% детей с ОМЛ в возрасте до 1 года (как и до 2 лет) лет характеризовались перестройками *MLL*-гена. Среди детей старше 2 лет *MLL*+ лейкозов было 20% ( $p<0,001$ ). При ОЛЛ у 6/9 (67%) детей до года бластные клетки были

*MLL*-позитивными, в возрасте старше года только 5,3% детей (12/223) имели в бластных клетках исследуемые перестройки *MLL*-гена ( $p < 0,0001$ ).

При *MLL*+ ОЛЛ был значительно выше уровень инициального лейкоцитоза, причем как для *MLL-AF4*, так и для *MLL-ENL*. При ОМЛ такого достоверного различия отмечено не было. *MLL*+ пациенты при ОМЛ характеризовались низкой частотой CD34+ случаев (5/18), тогда как 81% (29/36) *MLL*- пациентов экспрессировали этот маркер ( $p < 0,001$ ). Примечательно, что из 5 случаев с высоким содержанием CD34, 4 (80%) были *MLL-AF10*-позитивные, из них 3 – с M5 подтипом ОМЛ, 1 – с M2 ( $p < 0,01$ ). Для ОЛЛ таких выраженных различий по экспрессии CD34 выявлено не было. Сопоставимых литературных данных по этому вопросу пока не найдено.

Анализ сочетания перестроек *MLL* гена с мутациями *NPM1*, *WT1*, *CEBPA*, *FLT3* при ОМЛ показал, что все пациенты характеризовались диким типом *NPM1* ( $n=21$ ), в 6% определялась мутация *CEBPA* (которую, также как и перестройки *MLL*-гена, относят к мутациям II типа), в 9% - мутация *WT1*, *FLT3-ITD* была определена в 4,5% (1/22).

Анализ прогностической значимости показал, что выживаемость пациентов с перестройками гена *MLL* была в 2 раза ниже, чем без них (17% vs. 41% для EFS, 25% vs. 51% для RFS). Выживаемость пациентов с *MLL-AF9* не отличалась от таковой у пациентов без данного химерного гена, в то время как EFS больных с *MLL-AF10* была значительно ниже. Неблагоприятным прогнозом характеризовались пациенты с *MLL-AF4*-позитивным ОЛЛ.

Являясь метилтрансферазой, *MLL* взаимодействует с другими метил- и ацетилтрансферазами, как непосредственно, так и посредством других белков, участвуя в эпигенетической регуляции экспрессии генов, в особенности класса Нох. Существуют данные, что *MLL* может садиться на промоторные участки ряда генов, включая *HOX*, препятствуя их метилированию и обеспечивая экспрессию этих генов. То есть формирование

химерных генов с участием *MLL* может влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, опосредуемую геном *MLL*. Поэтому нами был проведен анализ метилирования промоторных участков панели генов, задействованных в регуляции клеточного цикла (*p15*, *p16*, *APC*), апоптоза (*p14*, *p73*, *DAPK1*), межклеточных взаимодействий (Е-кадгерин, *TIMP3*), детоксикации (*GSTp*, *MGMT*), репарации ДНК (*MLH*, *MGMT*, *BRCA1*).

Индекс метилирования составил в *MLL*+ острых лейкозах около 60%. При перестройках *MLL-AF4* метилировано 56% генов (от 36%, 5/13 до 69% – 9/13), при *MLL-ENL* – метилированы промоторы 60% генов. При незлокачественных состояниях этот индекс зачастую не превышает 20-30%.

Промотор гена *TIMP* преимущественно деметилирован, что более характерно для *MLL*+ лейкозов, в первую очередь миелоидного происхождения [7], неметилирован ген *p14*, что соответствует данным Gutierrez M et al. [8], хотя у взрослых с ОЛЛ в 20% снижена экспрессия этого гена, как считают, вследствие метилирования).

Интересно отметить, что промоторные участки генов, участвующих в регуляции клеточного цикла – *p15* и *p16* преимущественно метилированы, тогда как *APC* не метилирован вовсе. Всего 4 гена полностью неметилированы при *MLL*+ ОЛ, *TIMP* и *p73* метилированы в 20-30%, 3 гена полностью метилированы, остальные метилированы в 70-90%.

Гетерогенность картины метилирования промоторов может указывать на то, что такое заболевание как *MLL*+ лейкозы может быть гетерогенным не только в плане гена-партнера и клеточного микроокружения, но и в отношении более тонких различий, таких как профиль метилирования, что в свою очередь, может сказываться как на прогностическом значении *MLL* перестройки у конкретного пациента, так и выступать в качестве мишени для эпигенетической или направленной терапии.

Заключение: Перестройки гена *MLL* относятся к наиболее распространенным генетическим изменениям при острых лейкозах у детей и выявляются в 10% ОЛЛ и ~30% ОМЛ (не включая М3). Перестройки гена



*MLL* характеризуются линейной специфичностью. При ОЛЛ преимущественно определяются гены *MLL-AF4* и *MLL-ENL*, при ОМЛ – *MLL-AF9* и *MLL-AF10*. Клинические и биологические характеристики опухолевого клона при *MLL*+ лейкозе зависят от типа химерного транскрипта, дополнительных (эпи)генетических изменений, клеточного контекста и различаются при ОЛЛ и ОМЛ.

Пациенты с *MLL*+ ОМЛ значительно младше, чем дети без этих перестроек в опухолевом клоне и характеризуются низкой частотой экспрессии CD34+ лейкозными бластами, преимущественно ассоциированной с *MLL-AF10*.

*MLL*+ образцы характеризуются более высоким индексом метилирования – около 60% генов метилированы в каждом образце. Отдельные гены (TIMP, P14) при практически неметилированы, что может быть характеристикой *MLL*+ лейкозов.

Лейкозы с *MLL*-перестройками в целом характеризуются неблагоприятным прогнозом, хотя прогноз может определяться конкретным типом химерного гена. Анализ перестроек гена *MLL* имеет клиническое значение для распределения пациентов по группам риска с целью оптимизации проводимой терапии с учетом неблагоприятного прогноза транслокаций *MLL*.

## Литература

- 1 Krivtsov A., Armstrong S. *MLL* translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development// *Nature reviews cancer*. – 2007. – V.7. – P. 823-833.
- 2 Zeisig D et al. The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear *MLL* fusion partners with chromatin// *Oncogene*. – 2005. – V. 24. – P. 5525–5532.
- 3 McCormack E. Review: genetic models of acute myeloid leukaemia // *Oncogene*. – 2008. – V. 27. – P. 3765–3779.
- 4 Andersson A. et al. Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of *MLL* fusion genes in hematologic malignancies. // *Leukemia*. – 2001. – V. 15. – P. 1293–1300.
- 5 Meyer C. The *MLL* recombinome of acute leukemias // *Leukemia*. – 2006. – V.20. – P.777–784.
- 6 Balgobind BV et al. The heterogeneity of pediatric *MLL*-rearranged acute myeloid leukemia // *Leukemia*. – 2011. – V. 25. – P. 1239-1248.

- 7 Rohrs S. et al. Hypomethylation and expression of BEX2, IGSF4 and TIMP3 indicative of MLL translocations in acute myeloid leukemia // *Mol Cancer*. – 2009. – V. 16.-P.86.
- 8 Gutierrez MI et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup // *Leukemia* – 2003. – V. 17. –P. 1845-1850.

## **ДИНАМИКА ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РУТИННЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЕЕ ОЦЕНКИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ**

*Марейко Ю.Е., Савицкая Т.В., Акинфеева Э.Л., Лавриненко В.А.,  
Ступникова Т.В., Савва Н.Н.*

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

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является стандартной процедурой при многих злокачественных и доброкачественных заболеваниях костного мозга. После проведения аллогенных ТГСК от HLA-совместимых, несовместимых родственных и неродственных доноров важным является контроль приживления и экспансии донорских клеток, диагностика отторжения трансплантата и рецидива заболевания (1). Это возможно путем оценки химеризма после аллоТГСК: эритроцитарного (по группе крови и/или резус-фактору) и лейкоцитарного (по полу, HLA-системе, PCR, RT-PCR) (2). Динамическое наблюдение за химеризмом позволяет оценить течение посттрансплантационного периода и определить тактику терапии. Значение гематопоэтического химеризма остается до конца невыясненным. Наличие смешанного химеризма ранее рассматривалось как предвестник рецидива, однако при использовании чувствительных молекулярно-генетических методов диагностики, на сегодняшний день, данный феномен является нередким явлением с различным процентом присутствия клеток реципиента. На химеризм влияет ряд факторов -

инициальный диагноз, стадия заболевания на момент трансплантации, выбор режима кондиционирования и трансфузионная поддержка. Кроме того, на результат оценки химеризма влияет чувствительность исследования.

Цель исследования: проанализировать динамику химеризма у реципиентов после аллогенной ТГСК, определяемого рутинными методами (серологическими и цитогенетическими) и выделить пациентов, у которых данные методы, не позволяют оценить качество приживления и функционирования трансплантата в посттрансплантационном периоде.

*Материалы и методы.* В исследование вошли 148 пациентов: с острыми миелоидными лейкозами – 29 детей, острыми лимфобластными лейкозами – 53 пациента, острыми бифенотипическими лейкозами – 4 ребенка, хроническими миелоидными лейкозами – 17 пациентов, неходжкинскими лимфомами – 2, миелодиспластическими синдромами – 6, врожденными апластическими анемиями 6 и приобретенными 29 пациентов и первичными иммунодефицитами 2 детей, которым были проведены различные виды аллоТГСК в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск, Беларусь) в период с июня 1998 года по октябрь 2011.

108 (73%) из 148 пациентов получили миелоаблативные режимы кондиционирования (MAC) перед аллоТГСК и 40 (27%) – режимы с редуцированной интенсивностью (RIC).

Маркерами для контроля химеризма у пациентов в период после аллоТГСК были выбраны пол, HLA-система, группа крови, резус-фактор. Пациенты имели доноров, отличных по некоторым показателям в различных их сочетаниях (таблица 1).

Определение эритроцитарного химеризма (ЭрХ) основывалось на методике определения группы крови человека ABO системы с использованием моноклональных анти-А, анти-В антител (цоликлоны анти-А, анти-В ООО «Гематолог») и гелевых технологий «Biorit». Химеризм по

резус-фактору (Rh) определялся полными моноклональными антителами системы-резус

Определение лейкоцитарного химеризма по половой хромосоме проводилось методом флюоресцентной гибридизации in situ (метод FISH).

Лейкоцитарный химеризм по HLA-системе исследовался методом PCR с использованием наборов реагентов AllSet+™ SSP, Invitrogen или с помощью моноклональных HLA-антител.

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде значений медианы и диапазона (25 - 75 персентили). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты.* Из 148 пациентов, включенных в исследование, 82 были мальчики (55,4%) и 66 девочки (44,6%). АллоТГСК от несовместимого по полу донора была проведена у 59 (39,9%) пациентов, HLA-несовместимая ТГСК – у 40 (27%). 100 детей (67,5%) имели донора несовместимого по группе крови и/или по резус-фактору: только по АВ0-системе 62 (41,9%) пациента, только по резус-фактору – 21 (14,2%), и по АВ0+Rh -17 (11,4%) . 63 (42,6%) из 148 реципиентов ТГСК имели различные сочетания маркеров для контроля химеризма в посттрансплантационном периоде (таблица ). 20 пациентов (13,6%) из 148 не имели каких-либо маркеров, определяемых рутинными методами.

Таблица - Совместимость пары донор/реципиент по маркерам, использованным для контроля химеризма в посттрансплантационный период у пациентов после ТГСК

| Пол | HLA | Группа крови | Резус-фактор | Количество Пациентов |
|-----|-----|--------------|--------------|----------------------|
| +   | +   | +            | +            | 20 (13,6%)           |
| +   | +   | +            | -            | 11 (7,4%)            |
| +   | +   | -            | +            | 30 (20%)             |
| +   | +   | -            | -            | 6 (4%)               |

Продолжение таблицы

|   |   |   |   |            |
|---|---|---|---|------------|
| + | - | - | - | 5 (3,4%)   |
| + | - | + | - | 4 (2,7%)   |
| + | - | - | + | 8 (5,4%)   |
| + | - | + | + | 5 (3,4%)   |
| - | + | + | + | 19 (12,9%) |
| - | + | + | - | 1 (0,6%)   |
| - | + | - | - | 6 (4%)     |
| - | + | - | + | 15 (10,1%) |
| - | - | + | + | 4 (2,7%)   |
| - | - | - | + | 9 (6,1%)   |
| - | - | + | - | 5 (3,4%)   |
| - | - | - | - | 0 (0%)     |

«+» совместимы ; «-» несовместимы

Лейкоцитарный химеризм было возможно определить только у 81 (54,7%) пациентов: у 41 ребенка (27,7%) - по разнице половых хромосом, у 22 (14,9%) – по HLA несовместимым генам, у 18 (12,2%) – обоими методами.

Эритроцитарный химеризм являлся единственным маркером наблюдения за приживлением и функционированием трансплантата у 47 (31,7%) из 148 детей.

Процент и динамика определяемого эритроцитарного химеризма зависел от режима кондиционирования. Так, у 72 пациентов после МАС ЭрХ нарастал активнее, чем у 27 детей после RIC ( $p \leq 0.05$ ), и достигал 25% (10 – 40%), 65% (25 – 80%), 85% (50 – 100%), 95% (75 – 100%) к +30, +60, +100 и +180 дню после ТГСК, против 10% (0 – 25%), 35% (5 – 60%), 65% (10 – 85%) и 90% (50 – 100%) после RIC соответственно. 5 (18,5%) пациентов из 27 с RIC сохраняли 5-10% собственного эритропоэза более 1 года после аллоТГСК.

Динамика полового химеризма также зависела от режима кондиционирования, особенно в ранний посттрансплантационный период ( $p=0,02$ ). При использовании МАС 41(69,5%) из 59 детей имели донорский половой химеризм 90% (80 – 99%) ко дню+30 и 100% ко дню +100; у 18

(30,5%) пациентов после RIC донорский химеризм достигал лишь 60% (45 – 80%), 80% (70 – 95%) соответственно и 95% (85 -100%) ко дню + 180. У 3 пациентов (16,7%) из 18, получивших RIC 100%, донорский химеризм не был достигнут и к 360 дню после трансплантации.

В группе 30 пациентов, у которых химеризм был определен двумя методами (по ABO и по полу), выявлено статистически значимое ( $p \leq 0,001$ ) запаздывание становления ЭрХ по сравнению с лейкоцитарным после аллоТГСК. В то время, как половой химеризм ко дню +30/+60/+100 после аллоТГСК достигал 90% (80 – 99%)/95% (85 – 100%)/100%, эритроцитарный составлял лишь 10% (0 – 25%)/35% (5 - 60)/70% (20 – 85%) соответственно. И только ко дню +180 после ТГСК на фоне 100% полового химеризма эритроцитарный достиг 90% (55 – 100%). Таким образом, адекватная оценка ЭрХ была возможна не ранее дня +180 после аллоТГСК при отсутствии трансфузий эритроцитов.

Обсуждение. Таким образом, у 47% детей контроль химеризма возможно было осуществить по ABO/Rh и/или HLA-системе, а примерно каждый десятый не имел маркера для рутинного исследования. В целом, у 60% пациентов невозможно было адекватно оценить приживление и функционирование трансплантата, контролировать течение раннего посттрансплантационного периода, что осложняло принятие решения по тактике лечения. Половой химеризм являлся единственной возможностью количественной оценки и контроля динамики химеризма как в раннем, так и позднем периоде после аллоТГСК у 40% пациентов.

Согласно данным нашего исследования, ЭрХ является наиболее доступным, но, к сожалению, низкочувствительным (в раннем периоде) и субъективным маркером оценки приживления и функционирования трансплантата. Кроме того, в литературе указывается, что он малоэффективен в случае рецидива заболеваний системы кроветворения с изолированным ростом патологического клона без отторжения трансплантата и восстановления собственного кроветворения реципиента (3). ЭрХ трудно

определить из-за особенностей трансфузионной терапии после ТГСК, особенно с малой и смешанной несовместимостью по ABO системе пары донор/реципиент (4). В раннем посттрансплантационном периоде и в случае рецидива ЭрХ не коррелирует с лейкоцитарным, и имеет выраженную зависимость от трансфузионной активности, требующейся для лечения пациента, формы рецидива (5). HLA-химеризм пригоден в качестве маркера только при несовместимости пары донор/реципиент по HLA-системе и недостаточен для динамического контроля в клинической практике, но может использоваться для диагностики отторжения/неприживания трансплантата, достижения 100% химеризма, при рецидиве заболевания. Половой химеризм является эффективным маркером мониторинга приживания и функционирования трансплантата, однако его определение ограничено трансплантацией несовместимой по полу пары донор/реципиент (1).

Решением данной проблемы может являться использование молекулярно-генетических мишеней и методов (количественных высокочувствительных) для исследования лейкоцитарного химеризма у всех пациентов после аллоТГСК вне зависимости от сочетания пары донор/реципиента (6). Полиморфизм участков ДНК используется в качестве мишеней, а именно – вариабельные нуклеотидные повторы различной длины (VNTR/STR) (7). Использование метода оценки химеризма на основе STR позволяет выявлять информативные аллели практически у 100% пар реципиент/донор (8). Однако недостаточная чувствительность этой методологии (1-5%) не позволяет диагностировать ранние изменения трансплантата и предвидеть рецидив болезни. В связи с этим, количественная РТ-ПЦР с использованием в качестве мишеней одонуклеотидных замен ДНК (SNP) может быть более эффективным (чувствительность 0,1-0,01%) методом контроля химеризма, особенно в случаях, когда крайне важно достижение 100% химеризма и при

прогнозировании и диагностике рецидива заболевания, что делает эту методику перспективной для клинического использования (9).

*Заключение.* Динамика химеризма после аллотГСК зависит от интенсивности режима кондиционирования, миелоабляция способствует более быстрому становлению донорского химеризма. Оценка химеризма по ABO/Rh и HLA-системе является эффективной в позднем посттрансплантационном периоде. Высокочувствительный метод контроля по полу может использоваться в любые сроки, но менее чем у половины пациентов. Поэтому молекулярно-генетические методы исследования STR и SNP могут быть перспективными независимо от сочетания пары донор/реципиент и времени после аллотГСК.

## Литература

1. Frederick R. Appelbaum, Stephen J Forman, Robert S. Negrin, Karl G. Blume. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation Stem Cell Transplantation*. 4 edition. Wiley-Blackwell, 2009, chapter 25.
2. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? // *Bone Marrow Transplantation*. - 2005. - V. 35. - P. 107-119.
3. Shaun R., McCann, Mireille Crampe, Karen Molloy, Mark Lawler. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation // *Transfusion and Apheresis Science*. - 2005. - V. 32. - P. 3255-3261.
4. Charles D., Bolan, Susan F., Leitman, Linda M. Griffith, Robert A. Wesley, Jo L. Procter, David F. Stroncek, A. John Barrett, Richard W. Childs. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation // *Blood*. - 2001. - V. 98. - P. 1687-1694.
5. Canals C., Muniz-Diaz E., Martinez C., Martino R., Moreno I., Ramos A., Arilla M., Boto N., Pastoret C., Remacha A., Sierra J., Madoz P. Impact of ABO incompatibility on allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation after reduced intensity conditioning. // *Transfusion*. - 2004. - V. 44. - P. 1603-1611.
6. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility // *Bone Marrow Transplantation*. - 2007. - V. 39. - P. 255-268.
7. Желнова И., Демидова И.А., Гальцева И.В. и др. Количественный анализ гемопоэтического химеризма у больных после аллогенной трансплантации стволовых клеток крови методом иммуномагнитной селекции и ПЦР амплификации гипервариабельных участков ДНК // *Молекулярная медицина*. - 2009. - т. 3. - С.32-37.
8. Kristt D., Israeli M., Narinski R., Or H., Yaniv I., Stein J., Klein T. Hematopoietic Chimerism Monitoring Based on STRs: Quantitative Platform Performance on Sequential Samples // *J. Biomolecular Techniques*. - 2005. - V. 16. - P. 378-389.
9. Koldehoff M., Steckel N. K., Hlinka M., Beelen D. W. Elmaagacli A. H. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-



## **ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИМФОМ**

*Мелешко А.Н.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

В настоящее время классические подходы лечения онко-гематологических заболеваний – химиотерапия, лучевая терапия, хирургия – приближаются к пределу своей эффективности. Все большее значение в терапии этих тяжелых заболеваний приобретают новые биологические, биотехнологические, био-медицинские подходы, открывающие новые горизонты или, по крайней мере, расширяют терапевтические возможности современной медицины. Одним из широко известных и распространенных подходов, успешно используемых для лечения и профилактики многих инфекционных болезней, является активная (искусственная) иммунизация – вакцинация. Сам подход далеко не новый, именно с первых экспериментов по вакцинации Эдварда Дженнера и Луи Пастера началась наука иммунология. За два века, прошедших с тех пор, пользу от вакцинации против инфекций для человечества трудно переоценить. Совершенно иным подходом является вакцинация человека против опухоли. В отличие от инфекционных агентов, имеющих специфические и чужеродные для человека молекулярные паттерны, опухолевые клетки являются аутологичными, а, следовательно, не иммуногенными. Так называемые опухоль-ассоциированные антигены (ОАА), мутантные белки, или белки, имеющие аномально повышенную, тканеспецифическую экспрессию в опухолевых клетках, тем не менее, обычно не могут вызвать выраженный

иммунный ответ. Проблемой является также выявление самих ОАА. Для некоторых раков известных специфические антигены (меланома, рак простаты), но во многих остальных случаях антиген встречается только у некоторой части пациентов с данной нозологией, или его биологическая роль и распространение в организме недостаточно полно изучены.

Весьма привлекательным кандидатом на роль опухоль-специфического антигена для лимфопролиферативных заболеваний выступают лимфоцитарные иммунорецепторы – иммуноглобулин для В-клеток и Т-клеточный рецептор для Т-клеток. Эти маркеры встречаются на всех лимфоцитах, нормальных и опухолевых, так как являются тканеспецифическим и функциональным маркером лимфоцитов. В тоже время это крайне вариабельные молекулы, имеющие свою неповторимую структуру у каждой клетки (клона) – идиотип. Идиотип опухолевых клеток, таким образом, может использоваться в качестве специфического опухолевого антигена. Недостатком этого антигена является низкая иммуногенность, несмотря на выраженную специфичность мишени.

Клинические испытания анти-идиотипической вакцинации начались после 1992 г., когда в стэндфордском университете в США были впервые вакцинированы пациенты с фолликулярной лимфомой иммуноглобулином, полученным из опухоли [1]. За последние два десятилетия были выполнены многочисленные клинические испытания с использованием иммуноглобулина, полученного методом гибридной технологии, которые показали иммунологический ответ и клинический эффект у вакцинированных пациентов [2, 3].

Поскольку получение индивидуального иммуноглобулина гибридным методом долго и дорого, последующие исследования были направлены на получение рекомбинантной вакцины путем клонирования вариабельных доменов иммуноглобулина из опухолевых клеток [4]. Использовали разные методы экспрессии Id-белков, включая культура насекомых [5], растения [6, 7, 8], бактерии *E.coli* [9-10] или внеклеточную систему экспрессии [11,12].

Эти методы требуют специальных мер для очистки белка. Id-белок затем может быть конъюгирован с иммуногенным белком-костимулятором, таким как KLH, и введены пациенту подкожно вместе с адъювантом, таким как GM-CSF [13]. Альтернативной являются идиотип-нагруженные дендритные клетки, которые используются для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа [14, 2]. Наконец, простейшей технологией является технология ДНК вакцин, когда идиотип клонируется в векторе для эукариотической экспрессии и ДНК плазмиды используется для вакцинации [15, 16, 7].

Все методы экспрессии рекомбинантного идиотипического белка и все методы получения ДНК-вакцин подразумевают клонирование переменных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, соединенных в «линейный переменный фрагмент» (scFv), соединенный коротким пептидным линкером [18]. Наибольшей проблемой этого клонирования является ПЦР амплификация, из-за большого количества  $V_H$ ,  $V_K$  и  $V_L$  генных сегментов. Метод клонирования, используемый для клинического применения должен быть адаптирован для всех возможных реаранжировок генов иммуноглобулина.

В исследование включены четыре В-линейные клеточные линии – IM-9, Daudi, RPMI1788 и Namalva экспрессируют высокий уровень иммуноглобулина вместе с легкой цепью, а также три пациента с лимфомами. Целью исследования было клонирование последовательности идиотипа, сборка генетической конструкции вакцины, экспрессия и очистка идиотипического белка, пригодного для вакцинации против лимфом.

*Подбор праймеров для амплификации переменных регионов иммуноглобулинов.*

Большинство В-клеточных лимфом экспрессируют IgM изотип иммуноглобулина, с каппа либо лямбда легкой цепью. Однако, некоторые лимфомы экспрессируют IgG иммуноглобулин [19]. Для покрытия наибольшего числа лимфом мы поставили задачу клонировать область

вариабельного региона целиком, тяжелой цепи для IgM и IgG, а также легкой цепи IgK и IgL. Для этого была собрана база данных все генных сегментов трех генов иммуноглобулинов человека, включая аллельные варианты, выполнено сопоставление нуклеотидной последовательности в группах повышенной гомологии (семейства V-генов) и подобраны вырожденные праймеры, позволяющие получить полноразмерные фрагменты ДНК с +1 нуклеотида трансляции без потери или добавления аминокислот.

Последовательности вариабельных генных сегментов были собраны в базу данных с сайта <http://www.imgt.org>. Вариабельные сегменты IgH были объединены по гомологии в VH1-6 семейства и «выровнены» с помощью программ AlignX Vector NTI 9.0 program package (Invitrogen) и MEGA-4. «Прямой» праймер был подобран к первым 7-8 кодомам VH генов с избеганием вариабельных или полиморфных нуклеотидов вблизи 3'-конца праймера. Дизайн праймеров допускал не более двух несовпадений. Такой же принцип подбора «прямых» праймеров для вариабельных доменов 3 семейств Vk и семейств 5 VL генных сегментов.

Обратные праймеры были подобраны для первого (C1) константного региона IgM, IgG, IgK генов для двухстадийной полу-гнездной ПЦР амплификации вариабельных доменов. Использовались два обратных праймера для константного региона каждого гена, один, дистальный, в середину региона, и второй, проксимальный, к 5'-концу C1 сегмента.

Следующим методическим решением является сборка линейной последовательности идиотипа. Для этого, оба фрагмента ДНК были реамплифицированы с праймерами, включающими рестрикционные сайты для клонирования, старт- и стоп-кодона и 6His-tag. Рестрикционные сайты были выбраны согласно их встречаемости в векторе для экспрессии pET24b и их отсутствию в консенсусных регионах используемых частей иммуноглобулина. В начале конструкции добавлялся сайт NdeI рестриктазы, содержащий старт-кодон (CATATG). Конец конструкции был

сконструирован двумя способами. В первом идиотип завершался с SalI или HindIII сайтом в открытой рамке считывания, что позволяло добавлять дополнительный ген в слиянии с идиотипом как SalI/HindIII – NotI фрагмент. Если химерный ген не вводился, транскрипция завершалась на внутреннем стоп-кодоне вектора pET24b с добавлением еще одного 6His-tag. Во втором случае scFv заканчивалась введением стоп-кодона и NotI сайтом. Соединение двух фрагментов было решено выполнить с помощью т.н. «перекрывающейся ПЦР» (overlapping PCR), путем добавления к праймерам последовательности, названной tag. Кроме того, за счет последовательности tag вводится 6-His линкер. Гистидин кодируется двумя кодонами – CAC и CAT. Шесть кодонов – 18 нуклеотидов, вполне достаточно для прайминга синтеза новой цепи. 6-His-tag был добавлен к обратным праймерам для клонирования (последнего шага амплификации), соответственно к IgH-Cg и IgH-C?, и получили названия Cg-tag и C?-tag, соответственно. Перед соединяющей «перекрывающейся» ПЦР каждый из амплифицированных фрагментов ДНК был реамплифицирован с праймерами, содержащими рестрикционные сайты и 6-His-tag. После этого, ПЦР продукты очищались, и смешивались друг с другом при добавлении концевых праймеров и амплифицировались 20 циклов при температуре отжига 55°C с использованием «точно-читающих» полимераз (Pfu-polymerase). Полученные ПЦР продукты разделялись в электрофорезе и из геля выделялся продукт нужной длины. Общая схема конструкции представлена на рисунке 1.

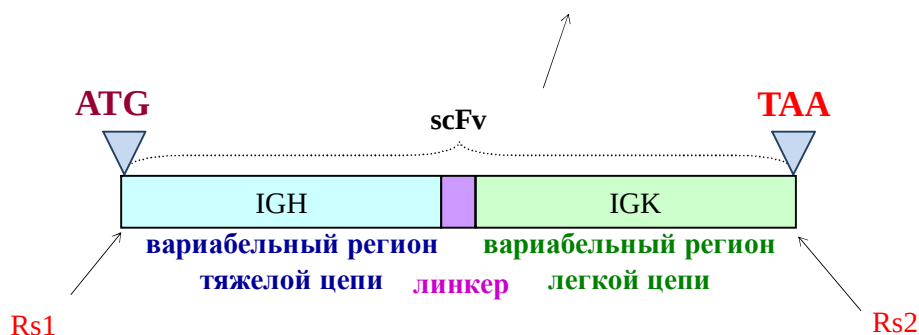


Рисунок 1 – Схема генетической конструкции рекомбинантного идиотипического белка. Сайты рестрикции: Rs1 – NdeI, Rs2 – SalI или HindIII, Rs3 – NotI.

### *Экспрессия и очистка идиотипического белка*

Для экспрессии рекомбинантного идиотипического белка использовался штамм *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, в клетки которого путем кальций-хладовой трансформации была введена плаزمида pET24b с клонированной последовательностью scFv. Вектор pET24b обеспечивает экспрессию рекомбинантного белка в бактериях штамма BL21 при индукции с помощью изопропилтиогалактозида (IPTG). Оптимальные условия для индукции синтеза белка были – температура 31°C в течение 3 часов при 0,5 mM IPTG.

Клетки бактерий ресуспендировались в 20 mM Tris-HCl, 0,4mM PMSF, 0,5 M NaCl (pH 8.0) и разрушались ультразвуком или с помощью гомогенизатора в течение 20 минут при 0 температуре. Остатки клеток осаждались высокоскоростным центрифугированием и белок выделялся из супернатанта. Очистка белка выполнялась методом метал-хелатной хроматографией на когонках с Ni-NTA агарозой. Попытки выделить белок в мягких, неденатурирующих условиях не достигли успеха: целевая фракция белка оставалась сильно загрязнённой высокомолекулярными бактериальными белками. Поэтому, связывание белка, промывка колонки и элюция выполнялись в денатурирующих условиях с 6М мочевиной. Колонка промывалась 20mM раствором имидазола, элюция белка проводилась 300mM раствором имидазола. Имидазол, соли и мочевины удаляли с помощью постепенного диализа. Фракции выделения и чистый белок анализировали в 12% SDS-PAGE (метод Лаэмми) и окрашивали красителем Coomassie Brilliant Blue.

Всего было очищено пять идиотипических белков для трех клеточных линий (два варианта одного белка) и для 1 пациента с лимфомой. Все белки имели небольшие различия в уровне экспрессии и условиях очистки (прочностью связывания ан колонке). На рисунке 2 показана очистка двух вариантов белка клеточной линии Namalva.

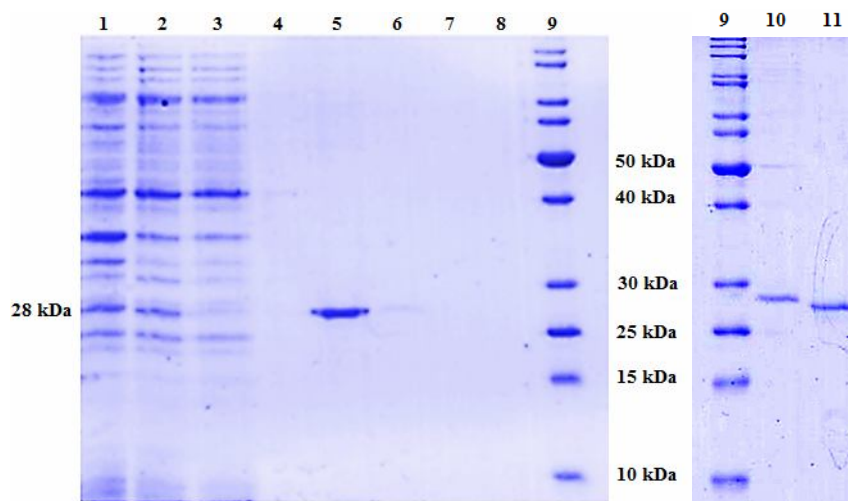


Рисунок 2 – Фракции очистки белка scFv клеток Namalva. 1. Лизат клеток после индукции. 2. Супернатант лизата. 3. Лизат, прошедший через колонку. 4. Промывка колонки с 20mM имидазолом. 5-8. Фракции элюции колонки с 300 300mM имидазолом. 9. Маркер молекулярного веса. 10 Чистый белок (Sall-6-His). 11. Чистый белок (stop-NotI).

Таким образом, приложен метод быстрого получения генно-инженерной, индивидуальной вакцины против лимфомы. Оптимизирован метод экспрессии и очистки белкового препарата. Тем не менее, очистка индивидуального белка идиотипической вакцины становится самым длительным и трудоемким этапом работы. Полученный белковый препарат может быть использован для подкожной вакцинации или нагрузке аутологичных дендритных клеток пациента для усиления иммуностимуляции.

## Литература

1. Coscia M., Mariani S., Battaglio S., Di Bello C., Fiore F., Foglietta M., Pileri A., Boccadoro M., Massaia M. Long-term follow-up of idiotype vaccination in human myeloma as a maintenance therapy after high-dose chemotherapy // *Leukemia*. – 2004. – V. 18. –P. 139–145
2. Timmerman J.M., Czerwinski D.K., Davis T.A., Hsu F.J., Benike C., Hao Z.M., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Okada C.Y., van Beckhoven A., Liles T.M., Engleman E., Levy R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients // *Blood*.- 2002. – V. 99. – P.517-26.
3. Inoges ., Rodriguez-Calvillo M., Zabalegui N. et al. Clinical benefit associated with idiotypic vaccination in patients with follicular lymphoma // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2006. – V. 20. – P.1292-1301.
4. Ruffini P.A., Neelapu S.S., Kwak L.W., Biragyn A. Idiotypic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines: from prototype protein to second generation vaccines // *Haematologica*. - 2002. – V.87. –P. 989-1001.
5. Kretzschmar T., Aoustin L., Zingel O., Marangi M., Vonach B., Towbin H., Geiser M.J. High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies // *Immunol Methods* .- 1996. –V. 9. – P. 93-101.

6. McCormick A.A., Kumagai M.H., Hanley., Turpen T.H., Hakim I., Grill L.K., Tuse D., Levy S., Levy R. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants // *Proc Natl Acad Sci U S A.*-1999.- V.96. –P.703-708.
7. McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R., Tuse D. Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig // *J. Immunol. Methods.*- 2003.- V.278. – P. 95-104.
8. McCormick A.A., Reddy S., Reinl S., Cameron T.I., Czerwinski D.K., Vojdani F., Hanley K.M., Garger S.J., White E., Novak ., Barrett J., Holtz R.B., Tuse D., Levy R. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study // *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 2008. – V.105. – P.10131-10136.
9. Bertinetti C., Simon F., Zirlik K., Heining-Mikesch K., Pfeifer D., Osterroth F., Rosenthal F., Veelken H. Cloning of idiotype immunoglobulin genes in B cell lymphomas by anchored PCR and production of individual recombinant idiotype vaccines in *Escherichia coli* // *Eur. J. Haematol.*- 2006.- V.77. – P.395-402.
10. Patel K.G., Levy S., Levy R., Swartz J. *Escherichia coli*-based production of a tumor idiotype antibody fragment - tetanus toxin fragment C fusion protein vaccine for B cell lymphoma // *Protein. Expr. Purif.* - 2011. – V.75. – P.15-20.
11. Kanter G., Yang J., Voloshin A., Levy S., Swartz J., Levy R. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines // *Blood.*-2007. – V.1 .- P.3393-3399.
12. Yang J., Kanter G., Voloshin A., Michel-Reydellet N., Velken H., Levy R, Swartz J. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system // *Biotechnol Bioeng.* – 2005. - V.89. –P.503-511.
13. Bendandi M, Gocke C., Kobrin C., Benko F., Sternas L., Pennington R., Watson T., Reynolds C., Gause B., Duffey P., Jaffe E., Creekmore S., Longo D., Kwak L.. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma // *Nat Med.* - 1999. – V.5. - P.1171-1177.
14. Osterroth F., Garbe A., Fisch P., Veelken H. Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells // *Blood.* -2000. – V.95. –P. 1342-1349.
15. Spellerberg Myfanwy B DNA vaccines against lymphoma: promotion of anti-idiotypic antibody responses induced by single chain Fv genes by fusion to tetanus toxin fragment C // *The Journal of Immunology.* – 1997. - V. 159. – P. 1885-1 892.
16. Rinaldi M., Ria F., Parrella P., Signori E., Serra A., Ciafre S., Vespignani I., Lazzari M., Farace M., Saglio G., Fazio V.. Antibodies elicited by naked DNA vaccination against the complementary-determining region 3 hypervariable region of immunoglobulin heavy chain idiotypic determinants of B-lymphoproliferative disorders specifically react with patients' tumor cells // *Cancer Res.* – 2001. – V.61. – P.1555-1562.
17. Stevenson F.K., Rice J., Ottensmeier C., Thirdborough S., Zhu D. DNA fusion gene vaccines against cancer: from the laboratory to the clinic // *Immunological Reviews.* – 2004. - V. 199. – P. 156–180
18. Sahota S., Townsend M., Stevenson F. Identification and assembly of V genes as idiotype-specific DNA fusion vaccines in multiple myeloma // *Methods Mol. Med.* – 2005 - V.113. – P. 105-119.
19. Schuurman H., van Baarlen J., Hupperts W., Lam B., Verdonck L., van Unnik J. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Lack of correlation between immunophenotype and cell morphology // *Am. J. Pathol.* – 1987. – V.129. – P. 140-151.



# ИЗМЕРЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ ГЕНА IKAROS МЕТОДОМ RQ-PCR

*Мелешко А.Н., Прохореня И.В.*

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

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ) относятся к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям у детей, и включают более 95% всех лимфопролиферативных заболеваний детского возраста. Хотя общая выживаемость достигает уровня 70-75%, рецидивы этих заболевания остаются существенной и распространенной проблемой. Классическая диагностика лейкозов как в Республике Беларусь, так и в мировой практике опирается на традиционные методы, такие как цитоморфологическое исследование, иммунофенотипирование с помощью проточной цитометрии, цитогенетический анализ (G-banding) и ПЦР-анализ экспрессии основных химерных онкогенов. В последние годы в крупных мировых онкологических центрах наблюдается все более возрастающая ориентация на более глубокий уровень диагностических и прогностических исследований, в первую очередь выявление молекулярно-генетических изменений (мутаций) и отслеживанием минимальной остаточной болезни. Именно эти анализы позволяют наиболее приблизиться к пониманию этиологии и патогенеза заболевания, стратификации по группам риска, поиска новых мишеней для терапии и адекватной оценки эффективности терапии. Массивный прорыв исследований в этой сфере происходит в последнее десятилетие в связи с появлением технологии DNA-arrays, в первую очередь EST-array (expressed sequence tags) для анализа экспрессии, CGH- (comparative genomic hybridization) и SNP- (single nucleotide polymorphism) arrays для выявления делеций/вставок и однонуклеотидных замен, соответственно, тысяч генов

одновременно. Помимо давно известных перестроек при ОЛЛ, таких как BCR/ABL, E2A/PBX, TEL/AML1 и MLL, обнаружено огромное количество несбалансированных криптических транслокаций, микроскопических делеций и точечных мутаций других генов. Однако значительный интерес представляют гены транскрипционных факторов (ТФ), специфически контролирующие лимфоидную дифференцировку, такие как *rah5*, *EBF-1*, *IKZF1 (Ikaros)*, *IKZF2 (Helios)*, *IKZF3 (Aiolos)* [1]. Структурные изменения в этих генах обнаружены у 40% больных В-линейным ОЛЛ, особенно для *rah5* гена (31,7%) и *Ikaros* (28,6%) [2].

*Ikaros*, кодируемый геном *IKZF1*, наряду с другими генами *IKZF2 (Helios)*, *IKZF3 (Aiolos)*, *Eos* и *Pegasus* относятся к ДНК-связывающим белкам семейства Круппела с «цинковыми пальцами». *Ikaros* является ключевым транскрипционным фактором, регулирующим ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и дендритных клеток. Частичный или полный knock-out гена *Ikaros* у мышей ведет к высокой частоте спонтанных лейкозов и лимфом, а также аутоиммунным заболеваниям. Кроме регуляции транскрипции, белки семейства *Ikaros* участвуют в регуляции структуры хроматина. *Ikaros* может активировать или репрессировать экспрессию ряда генов, переводя молчащие участки ДНК в эухроматин и наоборот. В целом, для этого белка характерно скорее репрессивное действие, состоящее в подавлении экспрессии многих генов, либо сохраняет линейную идентичность дифференцировки клеток, удерживая участок ДНК в гетерохроматине в G0 фазе клеточного цикла.

Основная масса работ выполняется на уровне структурных изменений геномной ДНК. При этом, до недавнего времени не уделялось должного внимания альтернативному и аберрантному сплайсингу РНК. Лучший метод количественной оценки экспрессии РНК – ПЦР «в реальном времени» не позволяет оценить экспрессию всех изоформ, если их наличие не учитывалось при дизайне праймеров и зондов. Показано, что для генов транскрипционных факторов регуляция сплайсинга имеет большое значение.

Лучше всего исследован сплайсинг гена *Ikaros*. Ряд исследователей, в том числе автор данного проекта [3] описали экспрессию как минимум 11 альтернативных изоформ у человека, выявлены многочисленные нефункциональные, мутантные изоформы *Ikaros* при ОЛЛ без крупных генетических поломок этого гена. Известны несколько нормальных и aberrантных изоформ гена *rax5*, однако по нашим предварительным исследованиям, не все из них вообще открыты.

Белок *Ikaros*, как и другие члены семейства *Ikaros*, включают два отдельных домена с цинковыми пальцами: 4 ДНК-связывающих цинковых пальца N-конца и 2 цинковых пальца для белок-белковых взаимодействий около C-конца. Ген *Ikaros* включает семь экзонов и транскрибируется в виде по меньшей мере 8 различных изоформ по средствам альтернативного сплайсинга с использованием альтернативных экзонов (рисунок 1). Так, Ik-1, Ikx, Ik-2, и Ik-3, которые содержат, по меньшей мере, три NH2-terminal «цинковых пальцев», сохраняют высокоаффинное ДНК-связывание и локализуются в ядре. Изоформы Ik-4 – Ik-8, которые имеют менее трех «цинковых пальцев», теряют свою ДНК-связывающую активность и локализуются в цитоплазме [4, 5]. Такие изоформы сохраняют способности образовывать гетеродимеры с полными изоформами, что приводит к потере транскрипционной активности, поэтому они получили название доминантно-негативных изоформ (DN-Ik).

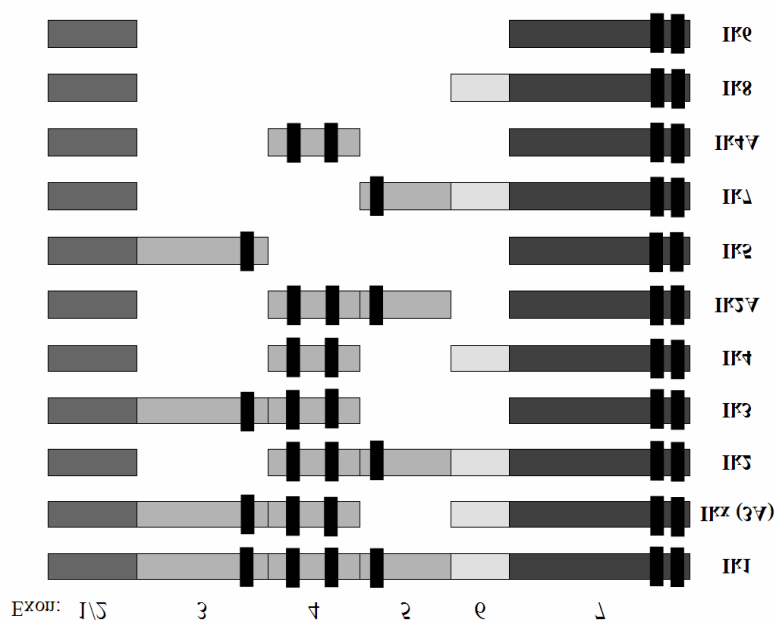


Рисунок 1 – Схематическое представление генов Ikaros. Цинковые пальцы обозначены черными полосами.

В предыдущих исследованиях мы использовали ПЦР-амплификацию кДНК гена *Ikaros* и идентификацию всех возможных изоформ электрофорезом в полиакриламидном геле и секвенированием. На этом этапе поставлена задача количественного измерения уровня экспрессии разных изоформ этого гена методом RQ-PCR [3]. Сложность такого подхода состоит в том, что требуется подбор праймеров и зондов для каждого транскрипта, и унификация этой панели до минимального количества праймеров и зондов в целях экономии реагентов, материала и минимизации технической ошибки, связанной с особенностями каждого праймера и зонда в отношении эффективности амплификации.

#### *Подбор праймеров и зондов для длинных изоформ гена Ikaros*

В нормальных лимфоцитах и лимфоидных опухолях экспрессируются три длинные изоформы *Ikaros* 1,х,2. Поскольку они являются достаточно крупными и близкими по размеру транскрипта, чтобы их надежно различать в полиакриламидном геле, было решено использовать RQ-PCR для оценки экспрессии каждого из них. Общим для них всех является наличие экзона 4 с двумя «цинковыми пальцами» внутри ДНК-связывающего домена белка

Ikaros. Учитывая небольшой размер экзона 4 – 168 п.н., он оказывается подходящим для размещения TaqMan-зонда, общего для всех трех изоформ. При этом «прямые» и «обратные» праймеры для различения изоформ подбирались вблизи соединения 3,4,5 экзонов (рисунок 2).

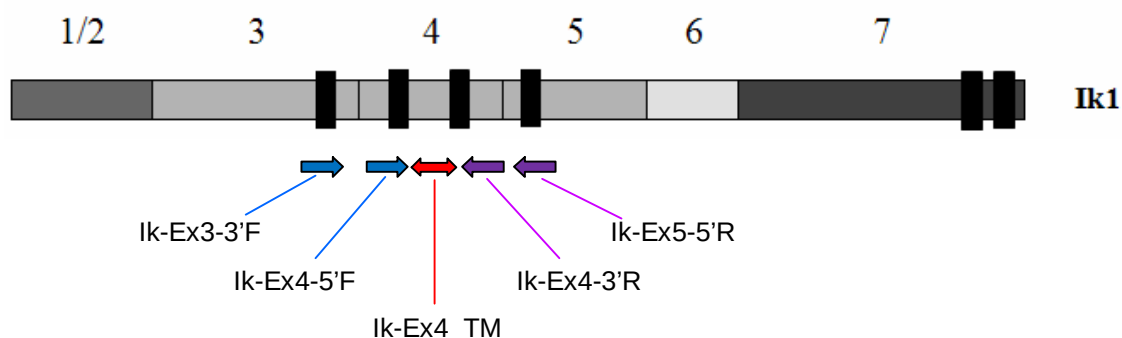


Рисунок 2 – Схематическое расположение праймеров и зонда для RQ-PCR амплификации длинных изоформ гена *Ikaros*

#### *Подбор праймеров и зондов для коротких изоформ гена Ikaros*

Дизайн RQ-PCR анализа для коротких изоформ гена *Ikaros* еще более, чем для длинных изоформ отягощен наличием большого количества транскриптов и разной комбинаторикой экзонов, что затрудняет стандартизацию панели праймеров. Общим для этих изоформ является только наличие экзона 7 вблизи вариабельного региона 3-6 экзонов. В связи с этим, короткие изоформы, кроме *Ik4*, амплифицировались при участии консенсусного «обратного» праймера и зонда к 7 экзону, и специфических «прямых» праймеров. Для *Ikaros4* из-за отсутствия у него двух экзонов – 3 и 5, была подобрана специальная пара праймеров к местам соединения экзонов. Схема расположения праймеров и зондов показана на рисунке 3.

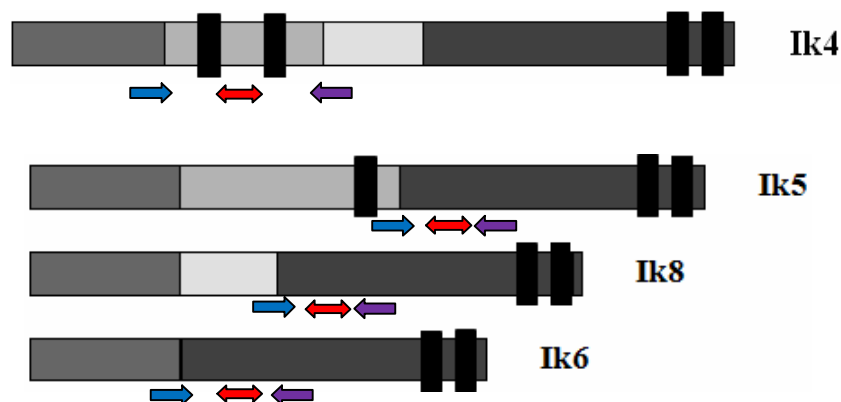


Рисунок 3 – Схема расположения праймеров и зондов для RQ-PCR амплификации коротких изоформ гена Ikaros.

### *Способ расчета уровня экспрессии гена, измеренной методом RQ-PCR.*

Существует несколько методов математической обработки результатов RQ-PCR анализа. Метод расчета абсолютного значения количества копий транскрипта гена подразумевает использование серийные разведения ДНК-стандарта и построение калибровочной кривой для гена-мишени и контрольного гена. В данном исследовании мы остановились на так называемом методе  $\Delta C_t$ , оценивающим относительную экспрессию измеряемого гена в сравнении с контрольным геном «домашнего хозяйства». Разница в значении  $C_t$  контрольного гена (ABL) и  $C_t$  измеряемой мишени есть  $\Delta C_t$ , а относительная разница в уровне экспрессии определялась как  $2^{\Delta C_t}$ . Хотя данный метод менее точный, он обладает важными для данного исследования преимуществами: 1. Уменьшает количество измерений и обеспечивает экономию реагентов; 2. Снижает риск контаминации образцов стандартами; 3. Количественная оценка достаточно надежна и воспроизводима. Измеряемая таким методом экспрессия Ikaros выражалась в единицах, относительно уровня экспрессии контрольного гена ABL, приятного за 1.

Амплификация проводилась на аппарате Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Для увеличения специфичности и возможности мультиплексования, разработанный метод анализа проводился в трех каналах для разных флуоресцентных красителей. Первый канал, зеленый,

соответствующий красителю FAM был оставлен для контрольного гена *ABL*. Второй канал, желтый, использовался для детекции флуоресцентной метки JOE, которой был помечен зонд Ex4\_TM (отжигается на 4 экзоне), применяемый для определения изоформ Ik1, Ikx, Ik2, Ik4. Третий канал, оранжевый, для детекции флуоресцентной метки ROX, которой был помечен зонд Ex7-5'TM (отжигается на 7 экзоне), применяемый для определения коротких изоформ Ik5, Ik8, Ik6.

#### *Сравнительный уровень экспрессии изоформ гена Ikaros*

Разработанная схема анализа экспрессии изоформ гена *Ikaros* была успешна апробирована в предварительных испытаниях. Анализ был выполнен для 5 образцов нормальных (донорских) лимфоцитов, и 31 образцов лимфоидных опухолей, из них 21 первичный ОЛЛ, 10 рецидивов ОЛЛ (включая 8 парных случая) и 2 лимфомы.

Первое, что обращает внимание, это то, что все изоформы гена *Ikaros* экспрессируются во всех образцах как нормальных, так и опухолевых клеток. Однако, относительный уровень экспрессии разных изоформ варьирует в широких пределах. Измерение уровня экспрессии выражено в относительных единицах, относительно экспрессии контрольного гена *ABL*, взятого за единицу. В целом, длинные изоформы гена *Ikaros* (Ik1, Ikx, Ik2) экспрессируются на более высоком уровне, чем короткие изоформы (Ik5, Ik8, Ik6). Экспрессия Ik1, Ikx в большинстве образцов колеблется в среднем диапазоне 0,5 – 2,5. Сильнее всего экспрессируется Ik2, от 0,5 до 10, причем экспрессия Ik2 выше у здоровых доноров.

Короткие изоформы в общей группе экспрессируются на гораздо более низком уровне, от 0,1 до  $10^{-6}$ , как в нормальных, так и в опухолевых клетках. Можно говорить о существовании «нормального профиля» экспрессии изоформ гена *Ikaros*, характерным для большинства случаев лейкоза (это предварительное заключение, пока не изучена экспрессия изоформы Ik4). Однако обращает внимание несколько случаев лейкозов с ярко выраженной сверхэкспрессией Ik6 – на уровне 4-11 о.е. Это превышает средний обычный

уровень экспрессии этой изоформы на 4 порядка. Первый пациент с сверхэкспрессией Iκ6 развил рецидив и умер без ответа на терапию. К сожалению, материал РНК не был доступен для рецидива этого пациента. Во втором случае сверхэкспрессия Iκ6 наблюдалась у пациента и при первичном диагнозе, и при рецидиве, т.е. это устойчивое генетическое нарушение. Этот пациент умер через год после рецидива после ТКМ. В последнем случае сверхэкспрессия Iκ6 обнаружена у пациента с первичным ОЛЛ, находящимся в ремиссии.

## Литература

1. Kuiper R., Schoenmakers E., van Reijmersdal S., Hehir-Kwa J., van Kessel A., van Leeuwen F., Hoogerbrugge P.. *High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression* // *Leukemia*. – 2007. – V. 6. – P.1258-66.
2. Mullighan C., Downing J. *Global genomic characterization of acute lymphoblastic leukemia* // *Semin Hematol*. – 2009. – V.46. – P .3-15.
3. Meleshko A., Movchan L., Belevtsev M., Savitskaja T.. *Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia* // *Blood Cells Mol Dis*. – 2008. – V. 41. – P. 278-83.
4. Sun L., Crotty M.L., Sensel M. et al *Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia* // *Clin Cancer Res*. – 1999. – V.5. – P.2112-2120.
5. Sun L., Goodman P.A., Wood C.M. *Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia* // *J Clin Oncol*. – 1999. – V.17. – P. 3753-3766.

## **ВЫЯВЛЕНИЕ ХИМЕРИЗМА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ КОТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

***Мелешко А.Н., Прохореня И.В., Исайкина Я.И.***

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Трансплантация аллогенной гематopoэтической стволовой клетки (ГСК) – эффективный способ лечения тяжелых форм онко-гематологических заболеваний. Однако, этот метод терапии отягощен серьезными



осложнениями, такими как токсичность кондиционирования, не приживления трансплантата и острой или хронической реакцией трансплантат-против-хозяина (РТПХ) [1]. Вероятность развития одной из форм РТПХ составляет 35-50% [2].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – стромальные негематологические клетки костного мозга мезенхимального происхождения, обладающие большим дифференцированным потенциалом [3]. Котрансплантация МСК после ТГСК способствует приживлению трансплантата, ускоренному восстановлению гемопоэза и снижает риск развития и тяжесть РТПХ [2]. В данной работе была поставлена задача выявить попытку выявить приживление пересаженных реципиенту в процессе котрансплантации МСК, т.е. определить химеризм МСК после трансплантации молекулярно-генетическими методами.

Выращивание культуры МСК после трансплантации и использования именно культивированных стромальных клеток для анализа химеризма увеличивает потенциальную чувствительность метода, так как определяется химеризм только среди клеток стромы. Интерпретация результатов анализа химеризма МСК осложнена тем обстоятельством, что пациенты получают аллогенный материал гематопозитической стволовой клетки при самой трансплантации, а также материал МСК при котрансплантации. Таким образом, в костном мозге пациента этих двух процедур может сформироваться двойной химеризм – от обоих доноров и собственного остаточного гемопоэза. Выделение культуры стромальных клеток для анализа не устраняет эту проблему, так как в строме также могут сдержаться клетки, полученные от донора гематопозитической стволовой клетки (ГСК). Часто материал донора ГСК был недоступен. Проблема усугублялась тем, что в качестве донора МСК, как правило, выступал близкий родственник (родитель или сиблинг) пациента, поэтому использование высокоспецифических мишеней индивидуальной идентификации, отличающих реципиента от донора МСК был очень ограничен. Еще одним

ограничением оказывается очень низкий уровень донорских клеток в культуре МСК. Учитывая ограниченный пролиферативный потенциал МСК, которые быстро созревают и перестают делиться, подтверждение химеризма МСК становится очень сложной задачей.

Анализа химеризма МСК или ГСК начинался в генотипирования реципиента и обоих доноров на полиморфные маркеры, позволяющие отличить геном одного человека от другого, и таким образом выступать в качестве мишеней для анализа химеризма. Пригодная мишень для анализа МСК должна отсутствовать у реципиента и донора ГСК, но присутствовать у донора МСК. Количество этой мишени в анализируемом образце культуры МСК после трансплантации и будет характеризовать количественно уровень химеризма МСК.

*Методы.* Применялись три метода генотипирования и анализа химеризма.

1. Амплификация полиморфных локусов STR с помощью ПЦР и их последующего разделения методом фрагментного анализа. Для амплификации STR локусов использовался AmpFiSTR® SGM Plus™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Фрагментный анализ выполнялся на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130. Данный метод обладает наибольшей специфичностью, т.е. различает несколько аллелей каждого из 10 полиморфных локусов STR, но сильно ограничен низкой чувствительностью – 5-10%. Учитывая низкий ожидаемый уровень химеризма МСК, данный метод годился лишь для качественной оценки наличия высокого уровня химеризма.

2. Амплификация полиморфных локусов STR методом RQ-PCR с набором праймеров и ТМ-зондов, опубликованных ранее [4]. Метод RQ-PCR обладает гораздо более высокой чувствительностью (до  $5 \cdot 10^{-6}$ ), однако предложенная панель праймеров позволяет выявления всего 23 вариантов мишеней. Этот метод использовался в качестве основного.

3. Учитывая ограничения предыдущих двух методов, мы разработали дополнительную мишень определения химеризма методом ПЦР в «реальном времени», по наличию гена SRY, находящегося на Y-хромосоме, а следовательно, присутствующий только у донора мужского пола. Этот анализ и предпочтителен, когда только донор МСК мужского пола, а пациент и донор ГСК – женского. В этом случае ген SRY является специфическим маркером присутствующим только в клетках, полученных в ходе котрансплантации от донора МСК. Ген SRY является ключевым локусом для развития мужского пола и всегда сохраняется у всех мужчин. Ген содержит один экзон, и транскрибируется в виде РНК длиной 845 н. Для подбора праймеров и ТМ-зонда использовался 5'-концевой фрагмент гена, не содержащий полиморфизмов (вариаций нуклеотидов), которые затрудняли бы ПЦР. Схема праймеров и зондов показана на рисунке 1.

GGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTTACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACCAGCTAGGCCACTTACCGC  
CCATCAACGCGAGCCAGCTCACCAGCAACGGGACCGCTACAGCCACTGGACAAAGCTGTAG

|                                                              | len | tm    | gc%   | any  | 3'   | seq                   |
|--------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|------|------|-----------------------|
| LEFT PRIMER                                                  | 21  | 60.16 | 47.62 | 4.00 | 2.00 | AAGCCACACACTCAAGAATGG |
| RIGHT PRIMER                                                 | 21  | 59.55 | 52.38 | 5.00 | 2.00 | AGCTTTGTCCAGTGGCTGTAG |
| HYB OLIGO                                                    | 20  | 59.76 | 60.00 | 4.00 | 1.00 | CACCAGCTAGGCCACTTACC  |
| PRODUCT SIZE: 103, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00 |     |       |       |      |      |                       |

Рисунок 1- Подбор праймеров и зонда для RQ-PCR амплификации SRY гена

Гибридизационный зонд (ТМ-probe) был помечен флуоресцентным зондом FAM и гасителем BHQ. Способ проведения ПЦР не отличался от такового для STR. Предварительный тест показал хорошую амплификацию на образцах ДНК от мальчиков и полное отсутствие амплификации в образцах от девочек. Новая мишень была использована для оценки МСК-химеризма.

*Результаты.* Исследование химеризма МСК и ГСК было выполнено для 6 трансплантированных пациентов.

Первый пациент, Г-н. По результатам фрагментного анализа четко видно, что после трансплантации у пациента Г-на произошло приживание

трансплантата, 100% костно-мозговой химеризм. Однако генотип костного мозга не соответствует таковому донора МСК. Таким образом, приживание мезенхимальной стволовой клетке не подтвердилось.

Метод RQ-PCR по STR обнаружил 4 мишени, которые присутствовали у доноров, но отсутствовали у реципиента до трансплантации. Таких маркеров четыре: 6 и 10a присутствуют только у донора ГСК и 8a и ACE-1721 – у обоих доноров (отобраны маркеры без сомнительной амплификации). Такое распределение маркеров не дает ни одного специфического маркера для выявления химеризма именно МСК. Все четыре мишени присутствовали на среднем уровне  $1-3 \cdot 10^{-5}$  в культуре МСК после трансплантации.

Второй пациент, Б-к. Анализ выполнялся методом RQ-PCR по STR. Для этого пациента не было материала донора ГСК, но несмотря на это, было доказано отсутствие химеризма МСК по двум мишеням – 11a и 7b, которые присутствовали у донора МСК, но отсутствовали у реципиента и в культуре МСК после трансплантации. Выявлена мишень GST, предположительно происходящая от донора ГСК.

Третий пациент, Д-ц, для которого проводилась трансплантация ГСК, но не было котрансплантации МСК. Анализ выполнялся методом RQ-PCR по STR. Культура МСК после трансплантации, взятая по ошибке, использовалась как контрольный случай. В ней обнаружено 6 химерных мишеней, из которых три характерны только для донора ГСК, а еще три для обоих доноров.

Четвертый пациент, И-ч. Для этого пациента не было материала ГСК. Анализ выполнялся методами RQ-PCR по STR и SRY. Из панели STR маркеров была одна пригодная мишень, присутствующая у донора МСК и отсутствующая у реципиента. В культуре МСК ее уровень составлял около  $1,5 \cdot 10^{-4}$ . Женский пол реципиента и мужской пол донора МСК (но не ГСК) позволил выполнить также анализ по SRY гену. Анализ выполнялся дважды, и показал сходные результаты: выявлено присутствие мишени в культуре МСК после трансплантации на уровне  $5,7 \cdot 10^{-4}$ . Таким образом, доказано

наличие химеризма именно МСК в костном мозге пациентки (И-ч), с очень низким содержанием донорских МСК – 1 клетка на 57300 МСК пациента (рисунок 2).

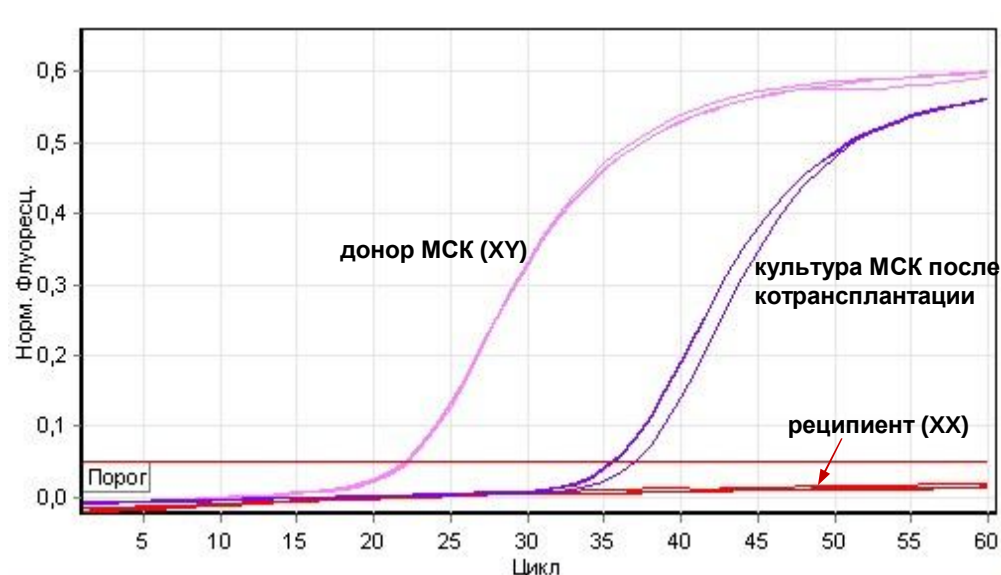


Рисунок 2- RQ-PCR амплификация гена SRY в образцах донора, реципиента и культуры МСК после котрансплантации

Пятый пациент, К-в. RQ-PCR анализ по STR локусам выявил двойной химеризм (ГСК и/или МСК) по двум мишеням, GST и 7a. Был выполнен развернутый фрагментный анализ всех образцов. При этом, наибольшие пики, характеризующие частоты аллелей в образце, соответствовали генотипу самого реципиента. Эта закономерность выявлена для всех 11 маркеров. Таким образом, основная часть клеток в культуре МСК, полученных после трансплантации, происходят из организма реципиента. Из 4 мишеней, позволяющих оценить химеризм МСК, 3 (75%) выявлялись в культуре МСК после трансплантации, но в очень малом количестве, сопоставимым с фоном неспецифической амплификации. Учитывая низкую чувствительность фрагментного анализа (около 10% клеток) и наличие неспецифической амплификации (лишних пиков), анализировались все, даже малые пики. Обнаружено 10 мишеней, специфичных для донора ГСК. 6 из них (60%) выявлялись на очень низком уровне в культуре МСК после трансплантации. При оценке химеризма ГСК в костном мозге после

трансплантации обнаружено полное соответствие донору ГСК, что означает 100% гематопозитический химеризм в костном мозге.

Шестой пациент, Я-о. Анализ выполнялся методом RQ-PCR по STR. Для этого пациента не было материала донора ГСК. Из панели STR маркеров была одна пригодная мишень, присутствующая у донора МСК и отсутствующая у реципиента. В культуре МСК ее уровень составлял около  $3,9 \cdot 10^{-3}$ , но это не доказывает происхождение химеризма от донора МСК.

Сложность поставленной задачи, ограничения методов и неполнота материала не позволили выполнить все анализы в полном объеме для всех пациентов. Однако полученные результаты позволяют сделать довольно уверенные выводы.

У всех 6 обследованных пациентов генотип клеток в культуре МСК после котрансплантации почти полностью соответствовал генотипу реципиента до трансплантации. Это говорит о том, что строма костного мозга пациента при трансплантации ГСК и котрансплантации МСК у реципиента сохраняется. При этом, у всех шести пациентов, в культуре МСК после трансплантации обнаружено небольшое количество клеток происходящих от донора ГСК. В рамках данного исследования не понятно, это гематопозитические клетки донора, растущие в культуре МСК, или при трансплантации ГСК происходит небольшое приживание мезенхимальных клеток стромы донора ГСК. Уровень их содержания в культуре МСК составляет  $10^{-4} \dots 10^{-5}$ , т.е. на нижнем пороге определения.

Собственно химеризм МСК после котрансплантации МСК, доказан и количественно измерен в одном случае по SRY гену. В одном случае по STR локусам доказано отсутствие химеризма МСК. Еще в 4 случаях наличие химеризма МСК не доказано. Наиболее вероятной гипотезой для объяснения полученных результатов является то, что реципиент сохраняет строму и после трансплантации, а введенные от донора МСК функционируют в КМ некоторое время, выполняя иммуносупрессирующие функции, но не приживаются и не пролиферируют в культуре. Полученные нами результаты

соответствуют литературным данным. По исследованию К. Bartsch et al [5], после трансплантации, даже после достижения 100% химеризма ГСК в костном мозге, у более 96% пациентов остается собственные МСК реципиента. Очевидно, котрансплантированные МСК выполняют иммуномоделирующую роль и не приживаются в костно мозге на длительное время.

## Литература

1. Tabbara I., Zimmerman K., Morgan C., Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results// Arch Intern Med.- 2002.-V.162.- P.1558-1566.
2. Lazarus H., Koc O., Devine S., Curtin P., Maziarz R., Holland H., Shpall E., McCarthy P., Atkinson K., Cooper B., Gerson S., Laughlin M., Loberiza F., Moseley A., Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients// Biol Blood Marrow Transplant.- 2005.-V. 11.- P.389-398.
3. Deans R., Moseley A. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses// Exp Hematol.-2000. –V. 28. - P.875-884.
4. Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C., Lamy T., Le Prise P., Beauplet A., Bories D., Semana G., Quelvennec E. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction // Blood.- 2002.-V. 15. – P.4618-4625.
5. Bartsch K., Al-Ali H., Reinhardt A., Franke C., Hudecek M., Kamprad M., Tschiedel S., Cross M., Niederwieser D., Gentilini C. Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used //Transplantation.- 2009.- V.87.- P. 217-221.

## НАНОТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ: БИОЭТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

*Мишаткина Т.В., Мельнов С.Б., Смольник Н.С.*

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,  
Минск, Республика Беларусь

Формирование принципиального нового научного направления – **нанотехнологии** вызвано миниатюризацией технологических процессов и переходом многих промышленных технологий и конструктивных элементов на микро- и наноуровень. Причем сфера применения и внедрения нанотехнологий сегодня стремительно расширяется. С каждым днем становится возможным проведение все новых манипуляций с отдельными

атомами и молекулами, а также создание из них разнообразных объектов макромира. Это может привести к повсеместному внедрению наноэлементов в окружающую среду, что в свою очередь, повлечет за собой абсолютно непредсказуемые последствия для всего живого в целом [1].

Первоначально возникшие в электронике и материаловедении, нанотехнологии в последние годы завоевывают лидирующие позиции в химии, биологии и медицине. В медицине постепенно формируются следующие основные направления применения нанотехнологий [2]:

- определение биомаркеров (ДНК, белки, метаболиты);
- разработка систем адресной доставки лекарственных средств и генетических конструкций в поврежденные ткани;
- визуализация патологических процессов в организме;
- молекулярная диагностика различных заболеваний;
- высокоселективное уничтожение патологических тканевых образований и отдельных измененных клеток;
- создание нанороботов.

Стремительно внедряющиеся сегодня в медицину нанотехнологии рождают множество этических, юридических и политических проблем, с которыми международное сообщество может столкнуться уже в ближайшем будущем. Нанотехнологии — это технологии, оперирующие величинами, сопоставимыми с размерами атомов, а переход от широко освоенных ныне «микротехнологий» к «нанотехнологиям» — это скачок от операций с веществом к операциям с отдельными молекулами и атомами. Таким образом, распространение нанотехнологий в биомедицине сделает возможным «внедрение» в живой организм на уровне атомов. Последствия могут быть самыми различными — от «восстановления» вымерших видов до создания новых типов живых существ, биороботов. Прогнозируемый срок реализации — середина XXI века.

Ожидается, что полученные новые знания помогут избавить человека от наследственных заболеваний (которых уже известно около четырех тысяч),



найти принципиально новые способы лечения известных заболеваний, их профилактики, продлить жизнь человека и многое другое. Однако возможности, открываемые нанотехнологиями, заставляют с тревогой думать о перспективе изменения самой *природы человека*. При этом нанотехнологии ведут к появлению множества этических проблем и вопросов [3; 4].

До недавнего времени понятие «медицинская этика» означало, в основном, моральный кодекс и профессиональный этикет врача. Теперь же от медицинской этики требуется участие в разрешении различных медико-биологических проблем (условия и возможности аборта, эвтаназия, генетическое консультирование и т.д.). Она приобретает более широкий характер, становясь *биомедицинской этикой*, которая должна решать множество моральных дилемм, возникающих как в клинической практике (получение информированного согласия больного на лечение, сохранение жизни новорожденных, имеющих тяжелые физические дефекты и т.д.), так и в биомедицинских исследованиях. Данная проблемная область и составляет предмет биомедицинской этики, а ее конечная цель – совершенствовать рациональный анализ для прояснения и последующего разрешения таких проблем. При этом вопросы, которые ставит биомедицинская этика, касаются всего общества, а не только медиков. Они связаны с экзистенциальными проблемами сущности и существования человека [5].

С начала развития нанотехнологий не прекращаются дискуссии, касающиеся соответствия научно-технических достижений в этой сфере принципиальным требованиям биоэтики, ибо без решения основополагающих этических задач невозможно разрешить социальные и психологические проблемы, возникшие с появлением этого нового научного направления. Тем более что новая технология носит всеобщий универсальный характер и может осуществлять управление жизненными системами, которые, в свою очередь, управляются молекулярным поведением в нанометрическом масштабе. Поэтому необходимо уже сейчас проанализировать реальное и предполагаемое развитие нанотехнологий в их

целостности и сформулировать жесткие *этические нормы*, регламентирующие развитие этого направления [6]. В противном случае человеческое общество попадает в зону чрезвычайно высокой нестабильности и рисков, когда незначительные на первый взгляд технологические ошибки или допущения могут привести к глобальной катастрофе.

Как и любая область науки и техники, нанотехнологии несут с собой не только надежды, но и некоторые опасения: так, они потенциально чреваты риском неправильного применения, возникновением новых социально-экономических или этических конфликтов и т.п. Поэтому наряду с дальнейшим развитием междисциплинарной научно-естественной и технической основы нанотехнологий, процесс внедрения новой технологии должен сопровождаться критической дискуссией по вопросам этики, которая позволит выработать правильные решения и предотвратить возможные опасности.

Человечество должно развивать нанотехнологии в строгих рамках, определив четкие границы между их разработкой и исследованием, с одной стороны, и их внедрением в практику – с другой. Ведь, несмотря на широкое использование нанотехнологий и неоспоримые плюсы их применения, в настоящее время у нас нет полного представления о возникающих при этом *потенциальных рисках* [7]. Но поскольку в современном мире развитие нанотехнологий – одно из приоритетных направлений, необходимо поднимать вопросы рисков еще до того, как они могут нанести вред здоровью или стать угрозой безопасности человека. Новизна и недостаток знаний в этой области обуславливают необходимость тщательного изучения потенциального использования и рисков как с точки зрения так называемых «оценок риска» — безопасности, токсичности, последствий для здоровья и окружающей среды, так и с точки зрения более общих этических вопросов [8; 9].

Медицина – это область научных исследований и клинической практики, наиболее наглядно демонстрирующая возможности и потенциальные риски нанотехнологий. Предполагается, что использование наночастиц для доставки лекарств в организм должно значительно повысить эффективность лечения. Специальным образом сконструированные и заряженные лекарственным препаратом наночастицы способны проходить сквозь биологические преграды, перенося необходимые молекулы точно к назначенной цели. От таких лекарств нового поколения ожидают значительного снижения побочных эффектов и высокой эффективности, особенно в случае тех болезней, которые в настоящее время не поддаются лечению.

Использование наноустройств для диагностики многих заболеваний, в том числе онкологии, позволит делать заключение еще до появления симптомов болезни и проводить тесты как в лабораторных условиях, так и непосредственно на пациенте (*in vivo*). При этом результаты будут точнее тех, которые получают современными методами [10]. Наноустройству достаточно минимального количества крови – одной капли, чтобы в течение минуты провести сканирование раковых маркеров и выдать результат. Образцы подобных устройств уже созданы, и они способны выполнять работу целой медицинской лаборатории. Разработаны чипы, способные выполнять *in vivo* мониторинг многих жизненно важных параметров организма – пульса, температуры тела, содержания глюкозы в крови и др.

Нанотехнологии могут способствовать пониманию и воспроизведению структурных и биохимических путей, которые приведут к естественному лечению, помогут поддерживать лечение даже в крайних случаях (например, после значительной потери мягких тканей или при необходимости полностью восстанавливать отдельные органы).

Перечисленные направления – лишь малая часть того, как использование наночастиц может улучшить различные направления медицины. Но в применении нанотехнологий существует не только положительная сторона –

наночастицы могут стать *источником рисков*. Для медицины ограничением нанотехнологий служит неизученность влияния на человека наночастиц, которые сами по себе способны проникать в организм человека.

Львиная доля этических вопросов, связанных с применением нанотехнологий в биомедицине возникает из-за того, что на сегодняшний день почти не изучены способы распространения наночастиц в природе и их воздействие на здоровье человека и состояние окружающей среды, особенно в отношении потенциальных и долгосрочных последствий. Так, уже при испытании новых лекарственных препаратов, полученных с помощью нанотехнологий, могут возникнуть *непредвиденные риски как для участников испытаний*, так и для окружающей среды и населяющих ее организмов. Например, можно ли быть уверенными в том, что эффект от воздействия нового «нанолекарства», даже при условии сходства его химической структуры с уже утвержденным препаратом, будет полностью аналогичен последнему?

Этические аспекты применения нанотехнологий в биомедицине особенно ярко проявляются тогда, когда речь заходит о возможных рисках для людей, которым в будущем придется работать с наночастицами, а также о мерах профилактики их воздействия. Этическая проблема, связанная с использованием наночастиц, заключается в оценке потенциалов использования и рисков на основе недостаточного набора данных и точных знаний (что, правда, часто наблюдается при оценке ситуации и в других науках).

Создание и использование *наноразмерных частиц и наноматериалов* – одна из наиболее быстро развивающихся областей современной нанотехнологии [11]. Широкое применение в биомедицине уже сегодня находит такой наноматериал, как наносеребро. Вместе с тем известно, что длительное употребление высокоэффективных препаратов коллоидного серебра имеет высокую степень опасности для здоровья человека, поскольку серебро – тяжелый металл, способный накапливаться в организме и вызывать

серьезные отравления – аргирозы. При этом получаемые искусственным путем наночастицы серебра будут проникать в человеческий организм или окружающую среду (при производстве, использовании изделий или их утилизации), а также преодолевать большие расстояния и распределяться диффузно.

Подобные вопросы могут возникать, когда мы говорим о внедрении и других наноматериалов в биомедицину. Уже сейчас повсеместно встречаются сообщения о невероятных свойствах нанотрубок, благодаря которым мы можем победить рак. Но известно и об обратном их свойстве – канцерогенности, хотя об этом предпочитают говорить гораздо меньше. Возникает вопрос: какое влияние на самом деле оказывают нанотрубки на живые организмы, что происходит с ними при попадании в окружающую среду, а самое важное – как меняется среда и геном живого при непосредственном воздействии нанотрубок?

Нанотехнология открывает новые перспективы *«денатуризации» человеческого организма*, значительно более широкие, чем те, которые уже достигнуты био- и генными технологиями. Грань между лечением и совершенствованием организма, вообще говоря, является весьма условной, хотя бы потому, что мы до сих пор не имеем точных определений терминов «здоровье» и «болезнь».

Сегодня человечество стоит на пороге **наноэры**. Важнейшее отличие нового витка глобальной эволюции человека состоит в том, что в настоящее время наблюдается максимально полное использование знаний о фундаментальных первоосновах неживой, живой и антропной материи. Знания об антропной материи – это знания о геноме человека, его телесности, его нейро-системе, сложнейшем комплексе взаимодействий его сенсорных каналов (зрительного, слухового, тактильного и прочих), разнообразных способов обработки информации. Возникает очередной вопрос: к чему приведет бесконтрольное и повсеместное внедрение нанотехнологий в различные аспекты жизни человека? Что будет, если

многократно увеличивать отдельные показатели его активности, такие как скорость реакции, выносливость и др.? Что будет, если реальностью станут такие последствия нанотехнологического прогресса, как появление человека-солдата, человека-киллера, возможности которых будут выходить далеко за рамки возможностей обычных людей? Ответ очевиден – даже самые на первый взгляд «мирные» изменения подобного рода могут привести к усугублению расслоения и неравенства в обществе, что станет грубым нарушением прав человека и общества в целом.

В связи с развитием нанотехнологий приобретает актуальность *вопрос бессмертия человека*. Хотя некоторые вероисповедания относятся к проблеме бессмертия негативно, она не лишена научных и гуманистических аспектов. Возможно, по мере развития техногенной цивилизации, а также успехов в области нанобиотехнологий проблема бессмертия переместится из системы «религия – природа – естествознание» в систему культуры, в мир технической, искусственной реальности. Среди основных направлений нанотехнологий, с помощью которых можно если не прийти к бессмертию, то хотя бы продлить жизнь человека, сегодня выделяют: *генетическое бессмертие* (клонирование) человека, *информационное бессмертие* (электронное бессмертие, основанное на механизме «перевода» личности на другой материальный носитель), *квазиматериальное бессмертие* (замена тех или иных частей организма человека, в том числе и путем клонирования).

Требует чрезвычайно точного просчета проблема *продления жизни людей* за счет внедрения в организм молекулярных роботов, предотвращающих старение клеток, а также перестройки и «облагораживания» тканей человеческого организма. Если не осуществится другая нанотехнологическая проблема — искусственного синтеза продуктов питания, то удлинение жизни человека может иметь самые тяжкие последствия.

В настоящее время в ожидании успехов нанотехнологий интенсивными темпами исследуются *перспективы крионирования* безнадежно больных

людей. На самом деле, даже при самом высоком развитии нанотехнологий, шанс на оживление таких людей является практически нулевым. При замораживании теплокровного объекта размером больше сперматозоида происходит полный разрыв всех клеток вследствие перехода клеточной воды в лед. Ясно, что никакие «наноремонтные» клетки не смогут вернуть к жизни фактически умерщвленное тело человека, восстановить все клетки, прерванные межклеточные взаимосвязи, нарушенные функции и т.д.

Прогресс в области применения нанотехнологий в медицине может столкнуться с самыми серьезными проблемами и даже привести к фатальным последствиям для человечества и по другим параметрам. Если роботы-ассемблеры, как это предполагается, смогут самовоспроизводиться и к тому же самообучаться, то невозможно гарантировать их выхода из-под контроля. Вместо лечения больных клеток и синтеза пищи они могут «наброситься» на живые и здоровые организмы, а возможно, и на все неживое, разбирая его на атомы для самовоспроизводства. Руководители крупных высокотехнологичных компаний уже заявляют о том, что дальнейшие эксперименты в наноотрасли опасны и нуждаются в жестком правительственном контроле.

Кроме того, исследование нанотехнологий не дает гарантии, что самовоспроизводящиеся искусственные наноорганизмы не будут использованы в военных целях – например, для создания супервируса, способного гарантированно и быстро вывести из строя любую армию. Или что они не выйдут из-под контроля и не сбудутся пророчества фантастов, уже описавших и разного рода «чужих» и «восстание машин». Поэтому неизвестно, скажет ли в будущем человечество создателям нанотехнологий слова благодарности или повторит высказывание одного американского конгрессмена по поводу клонирования: «Все это – наука, которая сошла с ума».

Просматривается и множество других биоэтических проблем в отношении нанотехнологий, которые могут быть внедрены в медицину в

ближайшие десятилетия. Так, сразу возникнет проблема всеобщей их доступности и соблюдения принципа справедливого распределения ресурсов в медицине. Едва ли есть сомнение в том, что при нынешнем состоянии нравов в обществе нанотехнологии будут распределяться избирательно, в соответствии со служебной или финансовой иерархией. Возникнет также проблема регионального эгоизма — технологии окажутся доступными в основном в тех регионах, где они смогут разрабатываться или закупаться.

Жестко могут встать также проблемы работы этических комитетов [12]: их бездействие или пассивность могут привести к бесконтрольному и аморальному распространению и применению опасных нанотехнологий, как это сегодня зачастую имеет место со стволовыми клетками.

Этической проблемой станет также добровольность информированного согласия пациента на применение нанотехнологий. Для доказательства безопасности и эффективности действия того же респироцита нужны будут многолетние исследования доказательного типа. Во внедрение технологий будут вовлекаться очень большие деньги. Будет ли в таких условиях информированное согласие пациента добровольным или оно будет связано с его обманом заинтересованными лицами, в том числе и врачами. В этой ситуации просматривается также проблема коммерциализации нанотехнологий, что также противоречит положениям ВОЗ и ЮНЕСКО, Конвенции Совета Европы и другим этическим документам.

Риски, являющиеся основанием для ограничения быстрого развития биотехнологий, связаны с возможностью нарушения фундаментальных принципов биоэтики — прежде всего это возможность ущемления достоинства человека, его автономии, нарушение принципа справедливости. Риск разрушения окружающей среды и даже «мрачный сценарий» возможной катастрофы также служат источником для поддержания опасений.

В то же время биотехнологии имеют огромный потенциал для изменения человека. Это касается, в частности, расширения автономии человека даже в



такой традиционной сфере как отношение врач/пациент, например, когда пациент получит значительно большие возможности для контроля над своим здоровьем благодаря портативному наноинструментарии проведения анализов. Немедицинское применение генетических технологий позволит людям полнее реализовывать свой физический потенциал.

Сегодня при внедрении в нашу жизнь нанотехнологий, манипулировании наследственным материалом человека, природная основа человеческого существования оказалась под угрозой самоуничтожения. Вследствие этого резко очерчивается граница между естественно вырастающим и искусственно сделанным, между физической целостностью и личной идентичностью, между природной судьбой и судьбой социальной, что представляет реальную опасность для самой природы человека. Антропогенные действия подобного рода, осуществляемые создателями и пользователями технологий третьего тысячелетия, порождают реальность, которая оказывает на нашу жизнь неоднозначное воздействие, порождая не только невиданные прежде блага, но и глобальные негативные угрозы существованию окружающей среды в целом и человека в частности.

*Применение биоэтических принципов* в качестве этических регулятивов, практически осуществляемое в этических рекомендациях по контролю над развитием биотехнологий, является действенным методом гуманизации биотехнологий. Оно позволяет не только дать относительно непредвзятую оценку технологиям, влияние которых на человека не всегда очевидно, но также и создать некую общую систему биоэтической оценки, не привязанную к особенностям отдельных биотехнологий, но, вместе с тем, дающую возможность дать общее *экспертное заключение*.

Очевидно, что круг биоэтических и биомедицинских проблем нанотехнологий чрезвычайно велик. Это делает необходимым уже сегодня рассматривать возможно большее число этих проблем и меры их решения, профилактики и, по-видимому, подготовки к переводу части из них в медицинское право. Актуальность данной проблемы непосредственно

связана с определением критериев этичности научных исследований в области репродуктивных функций, стадий умирания, генома человека, с возрастанием роли морально-нравственной культуры медицинской деятельности, с необходимостью преобразований в области социально-гуманитарного блока медицинского образования, разработкой и принятием новых законов, регулирующих деятельность в области биомедицины и здравоохранения. Собственно поэтому сумма технологий нового тысячелетия, с помощью которых осуществляется глобальное преобразование нашей действительности, оказывается ныне в центре самых острых биомедицинских и социально-философских дискуссий.

## Литература

1. Лысцов В.Н., Мурзин Н.В. Проблемы безопасности нанотехнологий. – М.: МИФИ, 2007.
2. European Technology Platform on NanoMedicine, Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for NanoMedicine. 2005.
3. Petersen A., Andersen A. A question of balance faith: scientists' and science policymakers' representations of the benefits and risks of nanotechnologies // *NanoEthics*.- 2007. -№ 1. –P.243-256.
4. Besley John C., Kramer Victoria L., Priest Susanna H. Expert opinion on nanotechnology: ricks, benefits and regulation.// *Journal of nanoparticle research*. – 2008. - № 10. –P. 549-558.
5. Биомедицинская этика. Учеб. Пособие. / под ред. Т.В. Мишаткиной, С.Д. Денисова, Я.С. Яскевич. – Мн., ТетраСистемс, 2003.
6. Мельнов С.Б., Мишаткина Т.В., Смольник Н.С. Биоэтические проблемы наномедицины в контексте молекулярно-генетических исследований // *Этика нанотехнологий и нанобезопасность: материалы международного семинара (Киев, 13 окт. 2011 г. / НАН Украины)* – Киев, 2011. – С.14.
7. Baird D., Nordmann A.& Schummer J. (eds.). *Perception of Risks and Nanotechnology // Discovering the Nanoscale*, Amsterdam: IOS Press, 2004.
8. Kurath M. *Negotiating nano: from assessing ricks of disciplinary transformations*. 2010.
9. Roco M.C. and Renn O. *Nanotechnology and the need for risk governance // Nanoethics*. – 2010. - № 4. – P. 85-87.
10. Самсонова М.В. *Наномедицина: современные подходы к диагностике и лечению заболеваний, вопросы безопасности*. // *Пульмонология*. 2008.- № 5.
11. Buzea C., Blandino I., Robbie K. *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity // Biointerphases*.- 2007. - V. 2. – P.4.
12. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks /*Risk Assessment of Products of Nanotechnologies*, 19 January 2009.

**ЭЛИМИНАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ЭТАПАХ  
ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО  
ЛЕЙКОЗА ИЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИХ  
ОСОБЕННОСТЕЙ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК,  
СТАНДАРТНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ**

*Мовчан Л.В., Белевцев М.В., Шман Т.В., Мигаль Н.В., Алейникова О.В.*

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и  
иммунологии», Минск, Беларусь

Определение уровня минимальной остаточной болезни (МОБ) с использованием техники многопараметрической проточной цитофлуориметрии является современным способом оценки эффективности лечения и прогнозирования риска развития рецидивов на этапах терапии у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [1]. В результате проведенных различными исследовательскими группами работ установлено, что к факторам, достоверно влияющим на безрецидивную выживаемость (БРВ) пациентов с ОЛЛ, относят лейкоцитоз ( $\geq 30\,000$  кл/мкл); спленомегалия ( $\geq 4$  см); М2 и М3 морфологический статус оценки ремиссии, положительный результат МОБ в костном мозге (КМ) на 36-й день индукции ремиссии; возраст ( $\geq 10$  лет); плохой морфологический ответ на терапию преднизолоном на 8-й день ( $> 1000$  бластов/мкл в периферической крови) [2]. Однако наличие МОБ на 36-й день от начала индукционной терапии, является самым сильным и независимым прогностически неблагоприятным фактором [1, 2, 7]. В некоторых зарубежных лечебных протоколах результат оценки МОБ уже используется как ведущий критерий дополнительной стратификации пациентов с целью определения дальнейшей тактики противоопухолевой терапии [4]. Однако на сегодняшний день недостаточно известно о влиянии клинических факторов риска при ОЛЛ, а также

особенностей иммунофенотипа лейкемических клеток на элиминацию опухолевого клона в ходе ранних этапов полихимиотерапии (ПХТ).

Целью данной работы было оценить динамику элиминации опухолевых клеток у детей с ОЛЛ из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) на этапах индукции ремиссии (протокол МБ-ОЛЛ-2008) в зависимости от иммунофенотипических особенностей лейкемических клеток, прогностических факторов, а также в зависимости от ветви рандомизации индукционной терапии.

*Пациенты и методы.* В исследование включены 142 ребенка (77 мальчика и 65 девочки, возраст от 1 – 17 лет) с первичным ВП ОЛЛ стандартной (SGR) и промежуточной (ImGR) группы риска. Диагноз Про-В-ОЛЛ, Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ был установлен в соответствии с ВОЗ-классификацией (EGIL-95) и на основании оценки иммунофенотипа опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) [5, 6]. Стратификация пациентов на группы риска и противоопухолевая терапия проводилась согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2008. В соответствии с протоколом пациенты SGR (количество лейкоцитов в периферической крови (ПК)  $< 30\,000$  кл/мкл; нет поражения центральной нервной системы (ЦНС); размеры селезенки менее 4 см; нет Т-лимфобластного иммунофенотипа; нет транслокаций t(4;11), t(9;22)) получали индукционную терапию согласно одному из трех рукавов рандомизации в зависимости от применения даунорубицина (DNR) и пегилированной L - аспарагиназы (ПЭГ-аспарагиназа, PEG). Первый рукав - с введением даунорубицина  $45\text{ мг/м}^2$  внутривенно (в/в) на 8-й день терапии без ПЭГ-аспарагиназы (PEG-;DNR+). Второй - с введением ПЭГ-аспарагиназы  $1\,000\text{ ЕД/м}^2$  в/в на 3-й день терапии и даунорубицина  $45\text{ мг/м}^2$  в/в на 8-й день терапии (PEG+;DNR+). Третий – с введением ПЭГ-аспарагиназы  $1\,000\text{ ЕД/м}^2$  в/в на 3-й день терапии без даунорубицина (PEG+;DNR-). Пациенты ImGR (количество лейкоцитов в ПК  $> 30\,000$  кл/мкл, но  $< 100\,000$  кл/мкл, и/или поражение ЦНС, и/или размеры селезенки  $> 4$  см, и/или Т-лимфобластный иммунофенотип; нет транслокаций

t(4;11), t(9;22)) получали индукционную терапию согласно одному из двух рукавов рандомизации в зависимости от применения ПЭГ-аспарагиназы. Первый рукав - с введением даунорубицина  $45 \text{ мг/м}^2$  внутривенно (в/в) на 8-й день терапии без ПЭГ-аспарагиназы (PEG-;DNR+). Второй рукав - с введением ПЭГ-аспарагиназы  $1\,000 \text{ ЕД/м}^2$  в/в на 3-й день терапии и даунорубицина  $45 \text{ мг/м}^2$  в/в на 8-й день терапии (PEG+;DNR+).

Оценку МОБ в образцах цельного КМ пациентов на 15-й и 36-й дни противоопухолевой терапии выполняли методом ПЦФ с использованием следующей панели моноклональных антител: Syto16/CD20 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7, Syto16/CD58 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7, Syto16/CD34 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7, Syto16/CD11a PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7, Syto16/CD38 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7 (Beckman Coulter), согласно методологии, описанной ранее [7, 8, 9]. Учет и анализ результатов проводили на аппарате FC500 (Beckman Coulter) в программе СХР. Положительным (МОБ+) считался результат при наличии лейкемических клеток в КМ в количестве  $\geq 0,01\%$ .

*Статистическая обработка результатов.* Для оценки влияния на МОБ исследуемых факторов использовали приложение Basic Statistics программы Statistica 6.0. Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с использованием непараметрического  $\chi^2$ -теста. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

*Результаты исследования и их обсуждение.* В результате проведенного исследования было установлено, что положительный уровень МОБ на 15-й день от начала ПХТ отмечался у 101 пациента из 142 (71%), тогда как на момент окончания индукционной терапии (36-й день) позитивными оставались все еще 35% детей (50/142). Элиминация опухолевых клеток (ОК) достоверно не отличалась в зависимости от субварианта ВП ОЛЛ. Так,

пациенты с Про-В-ОЛЛ в 67% (4/6) случаев и в 33% (2/6) имели позитивный уровень МОБ на 15-й и 36-й дни терапии соответственно. Среди пациентов с Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ на 15-й день МОБ+ были 72% (90/125) и 64% (7/11), тогда как на 36-й день позитивными оставались 35% (43/124) и 42% (5/7) пациентов. В зависимости от установленной группы риска отличий в уровне МОБ также выявлено не было. На 15-й день терапии 70% (62/89) и 74% (39/53) МОБ-позитивных случаев отмечено для пациентов SGR и ImGR, на 36-й день - 32% (27/84) и 40% (23/58) соответственно.

В результате ранее проведенной работы, было выявлено, что во всех случаях ВП ОЛЛ в той или иной степени выраженности встречаются иммунофенотипические aberrации, не свойственные нормальным гемопоэтическим предшественникам. К таким aberrациям относится асинхронная экспрессия дифференцировочных маркеров; коэкспрессия миелоидных / Т-линейных маркеров; увеличение/снижение интенсивности экспрессии специфичных маркеров [6]. При оценке влияния иммунофенотипических особенностей ОК на уровень МОБ было установлено, что в зависимости от экспрессии маркера CD45 достоверно худший ответ наблюдался на 15-й день терапии в случае отсутствия экспрессии данного антигена 44/53 (83%), тогда как при наличии экспрессии CD45+ ОЛЛ – 55/86 (64%) ( $p=0,01$ ). Однако к 36-му дню достоверного различия уже не наблюдалось. Для пациентов в зависимости от экспрессии антигена CD34 различий в уровне МОБ не выявлено ни на одной из точек исследования. Наличие или отсутствие таких вариантов асинхронной экспрессии дифференцированных маркеров как CD34+/CD20+, CD34+/CD22++, CD10++/CD22++, CD22++/CD20- на ОК также достоверно не влияло на уровень МОБ на анализируемые дни индукционной терапии. Также в результате проведенного исследования установлено, что МОБ-ответ у пациентов с наличием коэкспрессии на ОК миелоидных маркеров (Му+) достоверно не отличается от случаев, когда такой коэкспрессии не наблюдалось. Так доля МОБ+ пациентов с Му+ на 15-й и 36-й дни лечения

составляла 72% (36/50) и 37% (19/51), тогда как с Му- 67% (31/46) и 39% (17/44) ( $p>0,05$ ). Влияние коэкспрессии Т-линейных маркеров не оценивалось в связи с небольшим количеством таких событий.

В ходе нашего исследования был проведен однофакторный анализ зависимости уровня МОБ от стандартных прогностических факторов, а также факторов риска, используемых для стратификации пациентов согласно протоколу МБ-ОЛЛ-2008. Полученные результаты представлены в таблице. Согласно полученным данным, среди таких факторов как возраст ( $<$  или  $\geq 10$  лет), количество лейкоцитов в ПК ( $>$  или  $< 30\ 000$  кл/мкл), наличие или отсутствие поражения ЦНС; размеры селезенки ( $>$  или  $< 4$  см), достоверно лучший МОБ-ответ на 36-й день индукции был ассоциирован с исходным уровнем лейкоцитов в ПК  $< 30\ 000$  кл/мкл.

Таблица - Влияние прогностических факторов риска на уровень МОБ на этапах индукционной терапии ВП ОЛЛ у детей

| Признак                         | 15 день терапии |          | 36 день терапии |          |
|---------------------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
|                                 | МОБ+            | МОБ-     | МОБ+            | МОБ-     |
| Возраст, годы                   |                 |          |                 |          |
| $>1<10(1-9)$                    | 82 (71%)        | 34 (29%) | 38 (33%)        | 76(67%)  |
| $\geq 10$                       | 19 (73%)        | 7 (27%)  | 12 (43%)        | 16 (57%) |
| p                               | 0,81            |          | 0,34            |          |
| Лейкоциты, кл/мкл               |                 |          |                 |          |
| $<30\ 000$                      | 83 (69%)        | 37 (31%) | 36 (31%)        | 80 (69%) |
| $\geq 30\ 000$ , но $<100\ 000$ | 18 (83%)        | 4 (18%)  | 14 (54%)        | 12 (46%) |
| p                               | 0,23            |          | 0,03            |          |
| Поражение ЦНС                   |                 |          |                 |          |
| Есть                            | 2 (50%)         | 2 (50%)  | 1 (20%)         | 4 (80%)  |
| Нет                             | 99 (72%)        | 38 (28%) | 49 (36%)        | 87 (64%) |
| p                               | 0,33            |          | 0,79            |          |
| Спленомегалия, см               |                 |          |                 |          |
| $>4$                            | 73 (70%)        | 31 (30%) | 37 (37%)        | 64(63%)  |
| $\geq 4$                        | 27 (73%)        | 10 (27%) | 13 (33%)        | 27 (67%) |
| p                               | 0,75            |          | 0.64            |          |

Исходя из полученных результатов, очевидно, что большое количество пациентов, не смотря на наличие у них благоприятных прогностических критериев, имели уровень МОБ более 0,01% на момент окончания индукции

ремиссии. Это означает недостаточный ответ на проводимую ПХТ и влечет за собой риск развития рецидива.

Согласно условиям проведения протокола МБ-ОЛЛ-2008, пациенты с ВП ОЛЛ SGR и ImGR подвергались рандомизации индукционной терапии в зависимости от применения даунорубина и пегилированной L-аспарагиназы. В данной работе мы провели оценку влияния линии рандомизации на уровень остаточных опухолевых клеток. У детей SGR, рандомизированных по ветвям индукционной терапии в зависимости от применения ПЭГ-аспарагиназы, а именно PEG-;DNR+ и PEG+;DNR+, достоверно меньшее количество МОБ+ случаев наблюдалось в группе PEG+;DNR+ на всех точках исследования. Так, на 15-й день индукции ремиссии на ветвях PEG-;DNR+ и PEG+;DNR+, позитивными по уровню МОБ были 87% (26/30) и 61% (19/31) пациентов соответственно ( $p=0,02$ ), тогда как на 36-й день – 47% (14/30) и 17% (5/29) ( $p=0,015$ ). У пациентов с ImGR достоверно лучший МОБ-ответ отмечался на точке окончания индукционной терапии также в группе с использованием ПЭГ-аспарагиназы. Так, среди пациентов группы PEG+;DNR+ на 36-й день терапии МОБ+ были 23% (7/30), тогда как в группе PEG-;DNR+ - 57% (16/28) пациентов ( $p=0,01$ ). На 15-й день значимых различий выявлено не было. Также не выявлено различий в уровне МОБ на исследуемых точках у пациентов SGR в зависимости от применения DNR. На 15-й день ПХТ у пациентов групп PEG+;DNR+ и PEG+;DNR- позитивным по уровню МОБ были 61% (19/31) и 61% (17/28) соответственно ( $p>0,05$ ), на 36-й день - 17% (5/29) и 32% (8/25) пациентов ( $p>0,05$ ). Согласно полученным результатам можно сделать вывод, что использование ПЭГ-аспарагиназы на 36-й день индукционной терапии у пациентов (SGR и ImGR) приводит к более эффективной элиминации опухолевого клона.

*Заключение.* В результате проведенной работы установлено, что у детей с ВП ОЛЛ, получавших лечение по протоколу ОЛЛ МБ 2008, уровень



МОБ  $\geq 0,01\%$  на 15-й и 36-й дни индукционной терапии был диагностирован у 71% и 35% пациентов соответственно.

Аберрантные иммунофенотипические признаки опухолевых клеток (потеря экспрессии антигенов, асинхронная экспрессия дифференцировочных маркеров; коэкспрессия миелоидных антигенов), а также стандартные прогностические факторы (возраст, пол, поражение ЦНС, спленомегалия) не влияют на значение МОБ в ходе проведения индукционной терапии. Инициальный уровень лейкоцитов в ПК  $< 30000$  кл/мкл достоверно ассоциирован с лучшим ответом на терапию на 36-й день индукции.

При использовании ПЭГ-L-Аспарагиназы на этапе индукционной терапии, достоверно большее количество пациентов имело уровень МОБ  $< 0,01\%$ .

## Литература

1. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and relationship to other prognostic factors: a Children's Group study // *Blood*. - 2008. – V.111. – P. 5477-5485.
2. Савва Н.Н., Красько О.В., Белевцев М.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ) // *Онкогематология*. – 2009. – №. - 2. – С. 17-21.
3. Мигаль Н.В., Савва Н.Н., Белевцев М.В., Савицкий В.П., Мелешко А.Н., Кустанович А.М., Мовчан Л.В., Спивак Л.В., Алейникова О.В. Клиническая оценка минимальной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом на этапах полихимиотерапии. // *Достижения медицинской науки Беларуси*. - 2008. – №. 13. – С. 68-69.
4. Schultz K.R., Pullen D.J., Sather H.N, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG) // *Blood*. - 2007. – V. 109. - P. - 926-935.
5. Bene M.C, Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) // *Leukemia*. – 1995. – V. 9. – P. 1783- 1786.
6. Мовчан Л.В. Лейкоз – ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов // *Вопросы гематологии онкологии и иммунологии в педиатрии*. - 2012. – №. 1. – С. 22- 28.
7. Dworzak M.N, Froschl G, Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 2002. – V. 99. – P.1952-1958.

8. Dworzak M.N., Fritsch G., Panzer-Grumayer E.R., et al. Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance // *Leukemia & Lymphoma*. – 2000. – V.38 . – P. 295-308.
9. Белевцев М.В., Савицкий В.П., Савва Н. Н., и др. Определение остаточных опухолевых клеток в костном мозге детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом методом проточной цитофлуориметрии // *Клин. Лаб. диагностика*. – 2006. – №.10. – С. 42-46.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**

*Пролесковская И. В., Минаковская Н.В..*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Нейробластома - это наиболее частая экстракраниальная солидная опухоль у детей. Важными клиническими и биологическими прогностическими факторами, влияющими на выбор терапии, являются: возраст на момент диагностики, стадия заболевания, статус опухоли по N-тус амплификации, ДНК-плоидия и гистология [1-7]. Прогноз у пациентов группы низкого и среднего риска при применении современных подходов к лечению хороший [8]. Для высокой группы риска при применении традиционных подходов к лечению прогноз остается неутешительным. Стратегия использования высокодозной полихимиотерапии с трансплантацией аутологичной гемопоэтической стволовой клетки (ТГСК) достоверно увеличивает прогноз для пациентов высокой группы риска. Эта стратегия базируется на гипотезе, что эскалация дозы может улучшить выживаемость для данной группы пациентов. Результаты рандомизированных трайлов, сравнивающих использование высокодозной полихимиотерапии (ПХТ) с трансплантацией аутологичной гемопоэтической периферической стволовой клетки (ТППСК) с использованием одной ПХТ с поддерживающей терапией, показали преимущество подхода с использованием высокодозной ПХТ с

аутологичной ТГСК [9-11]. На данный момент использование высокодозной ПХТ с аутологичной ТГПСК в качестве консолидирующей терапии для пациентов высокой группы риска является стандартом.

*Материалы и методы.* В исследование вошли 51 пациент с нейробластомой, получавший лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии с января 1999 по июнь 2012 года с использованием высокодозной ПХТ с аутологичной ТГСК. Из них 48 получили высокодозную ПХТ с аутологичной ТГСК в первой линии лечения и 6 пациентов при лечении прогрессии и рецидива болезни, 3 пациента из последних получили повторную ТГСК. Медиана возраста больных - 2,74 года (от 0,47 года до 10,37 года). Диагноз нейробластомы устанавливался согласно существующим современным критериям, при помощи клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования. 1 стадия заболевания диагностирована у 3 пациентов, 2 стадия - у 1 пациент, 3 стадия - у 8 пациентов, 4 стадия – у 39 пациентов, 4s стадия – у 1 пациента. Пациенты получали лечение по следующим протоколам: NB 1999.02 (для пациентов старше года с 4-ой стадией заболевания); UK CCSG\ENSG\POG Trial: ENSG 9. NEUROBLASTOMA STAGE 2B\3 (NB 9502); протокол EINS (протокол для детей до 1 года), с 16.04.2008 все пациенты получают лечение по протоколу NB 2004. До 2008 года в качестве режима кондиционирования использовался бусульфан-мелфалан (BU-MEL), с 2008 карбоплатин-этопозид- мелфалан (CEM).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA for Windows XP professional. Для оценки достоверности различий были использованы  $\chi^2$ -тест и тест Манна-Уитни. Построение кривых выживаемости осуществлялась по методу Каплан-Майер, их сравнение – с использованием Log-rank test. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

*Результаты и обсуждение.* В первой линии лечения аутологичную ТГСК в качестве консолидирующей терапии получили 48 пациентов. Из них

24 девочки и 24 мальчика. Медиана возраста 2,74 года (от 0,47 года до 10,37 года). 1 стадия заболевания диагностирована у 3 пациентов, 3 стадия- у 5 пациентов, 4 стадия – у 39 пациентов, 4s стадия -1 у пациента. Результаты выживаемости представлены на рисунке 1.

По данным Европейского регистра трансплатации костного мозга 5-летняя общая выживаемость (ОВ) при проведении аутоТГСК при нейробластоме равна 37%, 5 летняя выживаемость без прогрессии (ВБП) составляет 32% [12]. Таким образом, результаты терапии нейробластомы у детей в Республике Беларусь с использованием аутоТГСК достигнутые сопоставимы с мировыми.

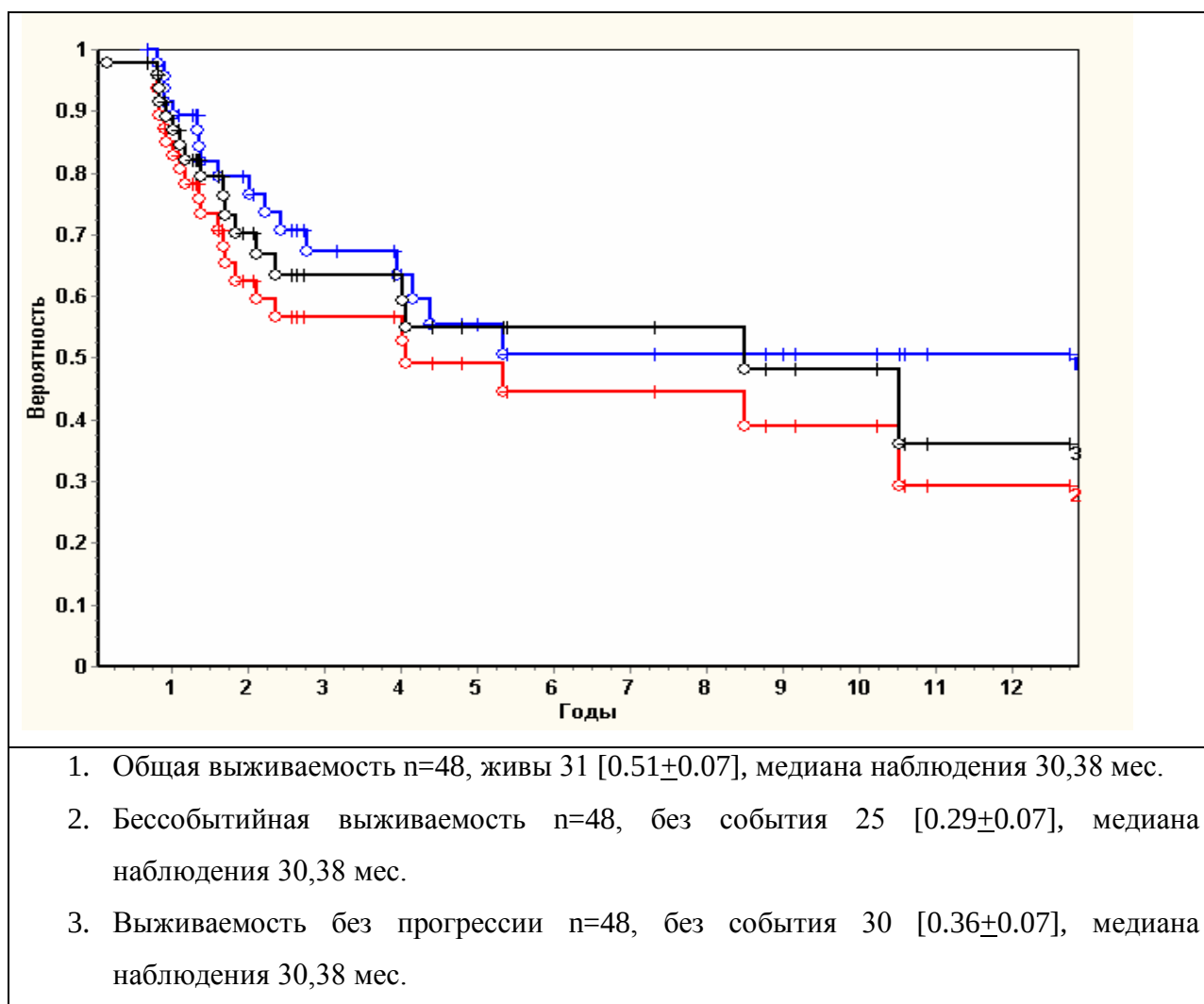


Рисунок 1 - Выживаемость у пациентов с нейробластомой

По данным литературы забор периферической гемопоэтической стволовой клетки (ПГСК) должен осуществляться после очищения костного мозга от атипичных клеток, но не ранее, чем после 2-го блока полихимиотерапии. В анализируемой группе пациентов забор ПСК осуществлялся после 2 -11 курса ПХТ, оптимальный срок забор ПГСК был выполнен у 19 пациентов (39%). Источником стволовых клеток в 6 случаях являлся костный мозг, 42 случая ПСК и в 1 случае (ПГСК +ГСК). Характеристика и сравнение трансплантата в зависимости от источника стволовых клеток представлена в таблице 1и рисунке 2.

Таблица 1 - Характеристика трансплантата

| <i>ПГСК n=43</i>     | минимум                        | максимум                      | медиана                       |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Количество ЯСК       | $1,0 \times 10^8 / \text{кг}$  | $32 \times 10^8 / \text{кг}$  | $5 \times 10^8 / \text{кг}$   |
| Клеточность по CD34+ | $0,5 \times 10^6 / \text{кг}$  | $27 \times 10^6 / \text{кг}$  | $3,6 \times 10^6 / \text{кг}$ |
| <i>ГСК n=6</i>       |                                |                               |                               |
| Количество ЯСК       | $1,25 \times 10^8 / \text{кг}$ | $4,3 \times 10^8 / \text{кг}$ | $2,6 \times 10^8 / \text{кг}$ |
| Клеточность по CD34+ | $0,8 \times 10^6 / \text{кг}$  | $2,5 \times 10^6 / \text{кг}$ | $2,0 \times 10^6 / \text{кг}$ |

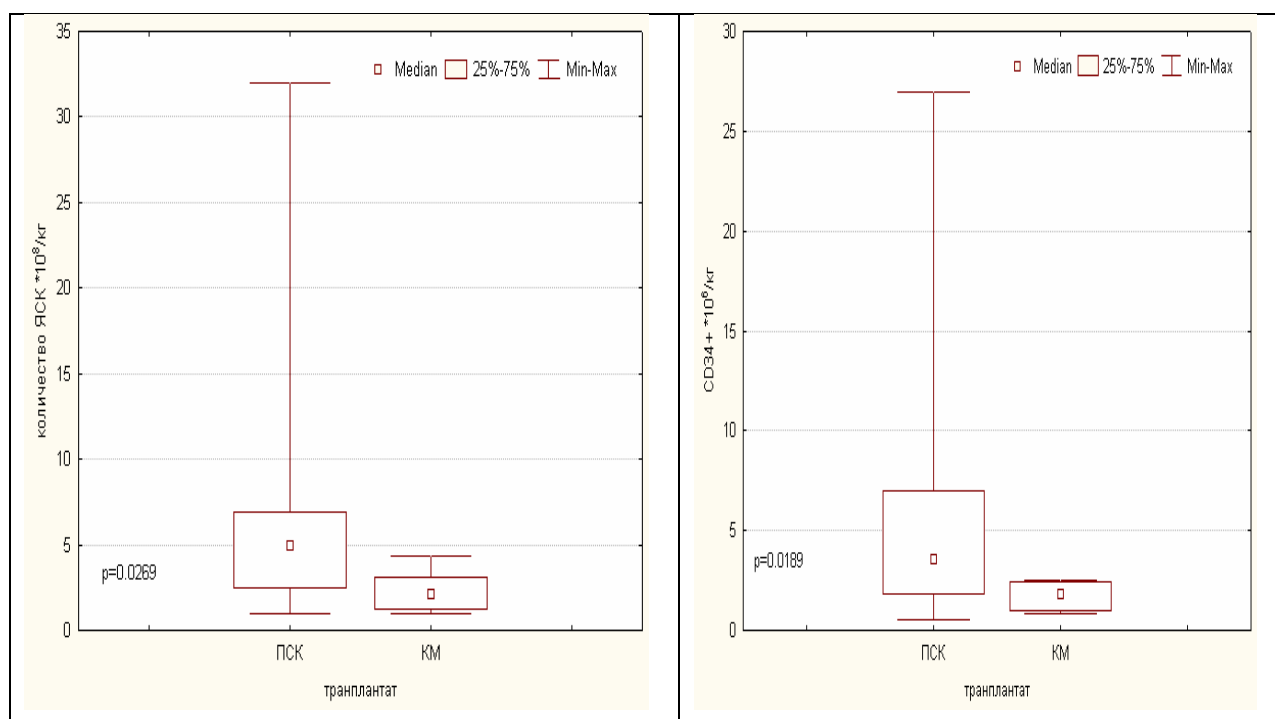


Рисунок 2- Сравнения трансплантатов по количеству ЯСК и CD34+ клеток с использованием критерия Манн-Уитни-U.

Таким образом, ПГСК является достоверно лучшим трансплантатом по количеству ЯСК ( $p=0,03$ ) и количеству CD 34 + клеток ( $p = 0,02$ ) на массу тела пациента. Анализ параметров приживления и сохранения зависимости от гемотрансфузий при использовании в качестве трансплантата ПГСК или клеток костного мозга показал, что при использовании в качестве трансплантата ПГСК наблюдаются более быстрые сроки приживления трансплантата (таблица 2).

Таблица 2- Параметры приживления в зависимости от источника стволовых клеток

| ПГСК                                                         | ГСК КМ                                                                       |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Восстановление лейкоцитов более $1,0 \times 10^9$ л          |                                                                              |
| 8-13 дней, медиана 11 дней                                   | 9-28 дней, медиана 14 дней                                                   |
| *ребенок не восстановился – смерть в нейтропении от инфекции | В одном случае дополнительная инфузия ПСК из-за длительной цитопении 21 день |
| Восстановление тромбоцитов выше 20.000/ л                    |                                                                              |
| 11-75 дней, медиана 15 дней                                  | 15-50, медиана 33 дня                                                        |
| Сохранение зависимости от трансфузий тромбоцитарной массы    |                                                                              |
| 25-120 дней, медиана 30 дней                                 | 25-60 дней, медиана 45 дней                                                  |

Таким образом, в качестве трансплантата при нейробластоме у детей, предпочтительнее использовать ПГСК.

По данным европейского регистра трансплантации за 28 лет было проведено более 4000 трансплантаций детям с нейробластомой. Установлены факторы, влияющие на эффективность трансплантации при нейробластоме у детей [12]:

- возраст пациента: до 2-х лет и старше ( $p<0,0001$ ),
- статус по основному заболеванию перед проведением аутоТГСК: полная ремиссия и очень хороший частичный ответ (ПО+ОХЧО) ( $p<0.0001$ ),
- используемый режим кондиционирования бусульфан- мелфалан ( $p=0,001$ ).

Анализ выживаемости пациентов с нейробластомой в Республике Беларусь показал, что наблюдаются аналогичные тенденции по прогностическим факторам, влияющим на эффективность использования аутоТГСК (таблица 3)

Таблица 3 - Выживаемость без прогрессии в первой линии лечения (прогностические факторы)

| Пациенты с аутоТГСК в первой линии лечения                                                     | Выживаемость без прогрессии                                                                      | p     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| В зависимости от возраста<br>До 2-х лет, n=18<br>Старше 2-х лет, n=30                          | 0,76 $\pm$ 0,10, медиана наблюдения 39,5 мес.<br>0,13 $\pm$ 0,16, медиана наблюдения 20,48 мес.  | 0,084 |
| В зависимости от статуса по основному заболеванию перед ТГСК<br>ПО+ ОХЧО, n=25<br>ЧО+ СБ, n=23 | 0,54 $\pm$ 0,10, медиана наблюдения 20,57 мес.<br>0,34 $\pm$ 0,10, медиана наблюдения 20,48 мес. | 0,502 |
| В зависимости от режима кондиционирования<br>BU-MEL n =21<br>CEM n =27                         | 5-летняя<br><br>0,62 $\pm$ 0,11<br>0,51 $\pm$ 0,10                                               | 0,399 |
| * ЧО - частичный ответ; BU-MEL- бусульфан-мелфалан                                             |                                                                                                  |       |
| * СБ - стабилизация болезни; CEM –карбоплатин, этопозид, мелфалан                              |                                                                                                  |       |

6 пациентам аутоТГПСК выполнена при лечении прогрессии и рецидива заболевания, из них 3 пациента получили повторную ТГСК во второй линии с изменением режима кондиционирования. У 1 пациента диагностирована 2 стадия (N-тис -позитивный), у 3-х - 3 стадия (2 - N-тис позитивные), у 2-х - 4 стадия (N-тис негативные). 2 пациента погибли от прогрессии заболевания (оба N-тис -позитивные 3 стадия), у 1 –го прогрессия заболевания, он получает паллиативную терапию, 2 пациента с 4 стадией находятся во 2-й ремиссии по основному заболеванию. Смертей, связанных с проведением ТГПСК, не было. Общая выживаемость составила 0,67 $\pm$ 0,19, с медианой наблюдения в 19,8 месяца.

### Заключение.

1. При применении в качестве консолидирующей терапии аутоТГСК у пациентов с нейробластомой в Республике Беларусь ОВ составила  $0,51 \pm 0,07$ , ВБП -  $0,36 \pm 0,07$ , что сравнимо с мировыми данными.
2. В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток необходимо использовать ПГСК, ГСК костного мозга могут быть использованы только в исключительных случаях.
3. Основными благоприятными факторами, влияющими на эффективность аутоТГСК, являются возраст пациента на момент постановки диагноза (до 2-х лет), статус по основному заболеванию (ПО+ОХЧО) и используемый режим кондиционирования (BU-MEL).
4. АутоТГСК может быть рекомендована в качестве терапии спасения у пациентов с локальными рецидивами или у пациентов с диссеминированными рецидивами, чувствительных к химиотерапии.

### Литература

1. Coldman A., Fryer C., Elwood J., Sonley M. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis// *Cancer*.- 1980. –V. 46. – P. 1896-1901.
2. Brodeur G., Seeger R., Schwab M., Varmus H., Bishop J. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage//*Science*.- 1984. –V. 224. – P.1121-1124.
3. Seeger R., Brodeur G., Sather H., Dalton A., Siegel S., Wong K. et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas //*N. Engl. J. Med.* - 1985. – V. 313. –P. 1111-6.
4. Look A., Hayes F., Shuster J., Douglass E., Castleberry R., Bowman L. et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study //*J Clin. Oncol.* – 1991. – V. 9. – P.581-591.
5. Shimada H., Chatten J., Newton W., Sachs N., Hamoudi A., Chiba T. et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas //*J. Natl. Cancer. Inst.* - 1984. –V.73. – P. 405-416.
6. Joshi V., Cantor A., Brodeur G., Look A., Shuster J., Altshuler G. et al. Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-myc gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in the Pediatric Oncology Group //*Cancer*. - 1993. –V.71. – P.3173-3181.



7. Look A., Hayes F., Nitschke R., McWilliams N., Green A. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma //N Engl. J. Med. - 1984. – V.311. – P. 231-235.
8. Frappaz D., Michon J., Coze C., Berger C., Plouvier E., Lasset C. et al. LMCE3 treatment strategy: results in 99 consecutively diagnosed stage 4 neuroblastomas in children older than 1 year at diagnosis// J Clin. Oncol. – 2000. - v.18. – p. 468-476.
9. Matthay K., Villablanca J., Seeger R., Stram D., Harris R., Ramsay N., et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group //N Engl. J. Med. - 1999. – V. 341. – P. 1165-1173.
10. Berthold F., Boos J., Burdach S., Erttmann R., Henze G., Hermann J. et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial//Lancet Oncol.- 2005. – V.6. – P. 649-658.
11. Pritchard J., Cotterill S., Germond S., Imeson J., de Kraker J., Jones D. High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group//Pediatr Blood Cancer. - 2005. - V. 44. – P. 348-57.
12. Ladenstein R., Hartman O., Pearson A., Klingebiel T., Castel V., Yaniv I., Demirer T., Dini G. on behalf of the EBMT Paediatric Working Party. 28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures//Bone Marrow Transplantation . – 2008. –V. 41. – P. 118-S127.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ (ММБ) И МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ (МРБ) ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ У ДЕТЕЙ

*Пролесковская И.В., Кустанович А.М.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Цель: Оценить прогностическое значение ММБ и МРБ при нейробластоме у детей.

*Материалы и методы.* В исследование вошли 25 пациентов высокой группы риска с нейробластомой, получавших лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии с 2008 года по протоколу NB2004m и получившие аутологичную трансплантацию

стволовых клеток (ТГСК) в качестве консолидирующей терапии. Из них мальчики -13 (52%), девочки – 12 (48%). Распределение по стадиям получено следующее: 1 стадия -3, 3 стадия -2, 4 стадия -21 пациент. ММБ и МРБ оценивались 2 методами на точку: постановки диагноза, в ПСК и перед проведением аутоТГСК.

1-й метод мультипараметрическая проточная цитометрия. для выявления в костном мозге и ПСК клеток с иммунофенотипом CD45-CD56+CD81+ Чувствительность метода составляет  $10^{-3}$  (позитивным считается результат при содержании более 0,01% клеток среди всех ядросодержащих клеток).

2-й метод – определение экспрессии тирозингидроксилазы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для оценки экспрессии тирозингидроксилазы из образцов КМ и ПСК выделяли РНК с использованием Tri-Reagent (Sigma, США) и синтезировали кДНК (Gabert J.et al., 2003) Аликвоту кДНК вносили в реакцию для количественной ПЦР и определяли экспрессию контрольного гена GUS и тирозин гидроксилазы (ТН). Реакцию проводили в двукратных повторях. Уровень экспрессии оценивали полуколичественно по формуле  $2^{\Delta Ct(GUS-TH)}$ .

*Результаты.* Морфологические поражение костного мозга определялось из 21 пациента с 4 стадией у 18 (72%). Иммунофенотипирование костного мозга на момент постановки диагноза выполнено у 25 пациентов. Позитивность была отмечена у 19/25 (76%) 1-3 стадия, 18 из 21 с 4 стадией. Молекулярно-биологическое (МБ) исследование костного мозга выполнено у 23 пациентов. Позитивность была отмечена 22/23 (95%): 1 – 1 стадия , 1-3 стадия (1 –нет данных), 20 из 21 пациентов с 4 стадией (1- не данных). Коэффициент корреляции Спирмана между двумя методами составил 0.52 ( $p<0.05$ ).

В таблице 1 отражена характеристика ММБ и МРБ в зависимости от точки исследования.

Таблица 1 - Уровень ММБ и МРБ в образцах пациентов с нейробластомой

| Точка исследования | п  | медиана | минимум | максимум | 25%    | 75%      |
|--------------------|----|---------|---------|----------|--------|----------|
| ИФТ диагноз        | 25 | 0,30    | 0,00    | 15,3     | 0,0    | 1,5      |
| ТГ диагноз         | 23 | 0,16    | 0,00    | 16,0     | 0,0004 | 1,46     |
| ИФТ ПСК            | 22 | 0,00    | 0,00    | 0,20     | 0,0    | 0,0      |
| ТГ ПСК             | 20 | 0,00    | 0,00    | 0,0022   | 0,00   | 0,000056 |
| ИФТ ТГСК           | 20 | 0,00    | 0,00    | 0,026    | 0,00   | 0,00     |
| ТГ ТГСК            | 22 | 0,00005 | 0,00    | 0,05     | 0,00   | 0,0006   |

В дальнейшем мы оценили влияние на бессобытийную выживаемость различных уровней ММБ и МРБ

Таблица 2 - Выживаемость бессобытийная в зависимости от уровня ММБ и МРБ при нейробластоме у детей

| Вид исследования                |      | N  | EFS         | p     |
|---------------------------------|------|----|-------------|-------|
| Диагноз                         |      |    |             |       |
| Иммунофенотипирование           | <*   | 12 | 0,73+ 0,13  | 0.17  |
|                                 | >    | 13 | 0,19 + 0,13 |       |
| МБ                              | <*   | 5  | 0.80 + 0.18 | 0,26  |
|                                 | >    | 18 | 0.34+ 0.11  |       |
| Периферическая стволовая клетка |      |    |             |       |
| Иммунофенотипирование           | -**  | 19 | 0.36+ 0.11  | 0,65  |
|                                 | +    | 3  | 0.33 + 0.11 |       |
| МБ                              | -**  | 12 | 0.41+ 0.14  | 0,93  |
|                                 | +    | 8  | 0.38 + 0.17 |       |
| Перед аутоТГСК                  |      |    |             |       |
| Иммунофенотипирование           | -*** | 18 | 0.28+0.11   | 0.56  |
|                                 | +    | 2  | 0.00+0.00   |       |
| МБ                              | +*   | 11 | 0.60+0.15   | 0.065 |
|                                 | -    | 11 | 0.25+0.13   |       |

\*- Медиана для диагноза (0,3%) и перед аутоТГСК (0,00005)

\*\* - Нижний (0,0004)

\*\*\*-позитивный/негативный

*Заключение.* Оба метода проточная цитометрия (выявление клеток со специфическим фенотипом) и ПЦР диагностика (определение экспрессии тирозингидроксилазы) могут быть использованы для выявления ММБ и МРБ у детей с нейробластомой. Пациенты имеющие более высокий уровень ММБ по данным иммунофенотипирования выше 0,3% и выше 0,004 по данным МБ на точку диагноза имеют тенденцию к худшему уровню выживаемости ( $p > 0.05$ ). Наличие МРБ в ПСК определяемое обоими методами не оказывало

влияние на выживаемость пациентов с нейробластомой. Пациенты с нейробластомой, имеющие уровень МРБ в костном мозге по данным МБ выше 0,00005 (медиана) имели худшие показатели бессобытийной выживаемости, данные близки к достоверности ( $p=0,065$ ). Полученные результаты согласуются с данными мировой литературы.

## **ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ**

*Романова О.Н., Коломиец Н.Дю, Минаковская Н.В., Мигаль Н.В., Клецкий С.К.*

Республиканский научно – практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Печень — один из главных пищеварительных органов, который выполняет в организме десятки важнейших функций, направленных на поддержание гомеостаза: пищеварения, обмена веществ (энергообеспечение, метаболизм белков, жиров, углеводов, гормонов, витаминов, ферментов, воды, электролитов, микроэлементов, пигментов), детоксикацию и кровообращение. Для клинической практики важна оценка физиологической роли печени в метаболизме лекарств и влияние болезней печени на превращение медикаментов.

Лекарственные поражения печени (ЛПП) составляют около 10 % от всех побочных реакций, связанных с применением лекарственных препаратов. ЛПП в США в 2,5 – 3 % являются причиной остро развившейся желтухи, в Европе этот показатель составляет 3 – 4 %. ЛПП выступают в качестве причины фульминантной печеночной недостаточности в 25 – 28 % случаев, занимая второе место после вирусных поражений печени. В отличие от легких и почек, одинаково страдающих от токсического действия препаратов, вводимых внутривенно и внутрь, ЛПП чаще возникают при

энтеральном применении, что связано с особенностями кровоснабжения печени и метаболизма в ней лекарственных веществ [1, 2, 4].

Метаболизм большинства цитостатических лекарственных средств (ЛС) происходит в печени. При проведении современных протоколов лечения онкологических и гематологических заболеваний с использованием цитостатических, иммуносупрессивных химиопрепаратов гепатотоксичность возникает в 15 – 20 % случаев, имеет дозозависимый, ожидаемый и, как правило, обратимый характер с легкой или умеренной степенью выраженности. Ферменты, метаболизирующие лекарства, в самом большом количестве содержатся в печени. Среди цитостатиков выделяют группу ЛС, обладающих повышенной повреждающей способностью на печень и желчевыводящие пути, куда относят бусульфан при длительном применении, производные нитрозомочевины (кармустин), доксорубицин, паклитаксел, этопозид. При назначении стандартных доз противоопухолевых ЛС развитие тяжелой печеночной недостаточности отмечается редко и обусловлено индивидуальными особенностями обмена веществ больного.

У алкилирующих препаратов (циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан) развитие гепатотоксичности не относится к типичным осложнениям терапии. Например, непереносимость циклофосфамида с повышением уровня трансаминаз имеет характер идиосинкразии с развитием в тяжелых случаях тотального некроза печени. Для мелфалана в средних дозах гепатотоксичность не характерна, но при назначении высоких доз в момент проведения трансплантации стволовых клеток может наблюдаться транзиторное повышение уровня печеночных ферментов и ЩФ. При длительном использовании бусульфана характерно развитие холестатического гепатита. При использовании винкаалкалоидов и производных платины редко, но может развиваться гипербилирубинемия с повышением ферментов печени. Антиметаболиты (фторурацил, капецитабин, меркаптопурин, метотрексат) вызывают токсические реакции со стороны

печени. Метотрексат обладает токсичностью при назначении высоких доз, в большинстве случаев поражения печени обратимые в течение 1 – 2 месяцев, но может развиваться фиброз печеночной паренхимы. Производные нитрозомочевины (кармустин, ломустин) и таксаны обладают довольно высокой (25 – 60 %) гепатотоксичностью, которая проявляется повышением уровня трансаминаз, ЩФ и билирубина. Антрациклиновые антибиотики (доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин) активно подвергаются метаболизму в печени, экскреция их метаболитов с желчью происходит в течение 7 – 10 дней и проявляется повышением аминотрансаминаз, ЩФ и билирубина.

В настоящее время выделяют следующие основные типы гепатотоксических реакций, осложняющих цитостатическое лечение:

1. повреждение паренхиматозных клеток печени с развитием жировой дистрофии, некроза, фиброза (цитолитический синдром)
2. повреждение желчевыводящих путей (холестатический синдром)
3. повреждение внутripеченочных сосудов с развитием веноокклюзионной болезни
4. развитие вторичных опухолей печени.

У детей ЛПП встречаются редко. Генетическая предрасположенность определяется дефектами структуры или количеством ферментов, участвующих в метаболизме ЛС, что приводит к особой биотрансформации лекарств у лиц с индивидуальной чувствительностью.

Метаболизм лекарств в печени зависит от:

- способности лекарств связываться с белками плазмы;
- скорости печеночного кровотока;
- активности микросомального окисления в печени.

Нарушение способности лекарств связываться с белками плазмы происходит при изменении синтеза белков, которое приводит к ограничению доставки препаратов к гепатоцитам, где происходит их метаболизм. Эти нарушения могут повышать риск развития различных лекарственных осложнений.

Снижение печеночного кровотока, чаще связанное с циррозом печени или сердечной недостаточностью, также изменяет метаболизм лекарств. Это объясняет быстро развивающуюся передозировку сердечными гликозидами у больных циррозом печени, сердечной недостаточностью. Блокаторы  $\beta$ -адренорецепторов (например, пропранолол) снижают печеночный кровоток и оказывают сходное влияние на метаболизм других лекарств в печени.

Ферменты, ответственные за метаболизм лекарств, не вырабатываются самой печенью, но их содержание в ее ткани достаточно высокое. Некоторые ЛС (например, сахароснижающие и противосудорожные препараты, барбитураты, анестезирующие средства, рифампицин) способствуют индукции микросомальных ферментов с образованием токсичных метаболитов, которые вызывают дозозависимое повреждение гепатоцитов [3, 5].

ЛПП необходимо иметь в виду при установлении этиологии любого острого и хронического заболевания печени. ЛП, повреждающие печень, подразделяются на 2 группы: I группа – истинные гепатотоксины, вызывающие облигатные реакции, II группа – гепатотоксины, зависящие от идисинкразии с факультативными реакциями. Лекарственные реакции, вызываемые I группой ЛС, определяются дозой и временем приема, развиваются у значительного числа лиц. Лекарственные реакции, связанные с приемом ЛС II группы, не зависят от дозы и развиваются у незначительного количества лиц с повышенной чувствительностью к данному препарату. Частота гепатотоксических повреждений при использовании лекарств II

группы составляет 0,1 %, но проявления минимальных печеночных нарушений достигает 10 %. В ряде случаев нарушения метаболизма лекарств генетически детерминированы. К гепатотоксическим реакциям, зависящим от дозы лекарств, относятся антиметаболиты, повреждающее действие на печень которых приводит к изменению биохимических показателей – повышение активности трансаминаз и ЩФ, очень редко к повышению уровня билирубина в сыворотке крови. В числе морфологических изменений описаны некрозы, ожирение гепатоцитов, воспалительная инфильтрация с фиброзом портальных трактов после применения метотрексата и 6 – меркаптопурина. Может также повреждаться эпителий сосудов. Поражение печени развивается не только сразу после приема препарат, но и в течение 3 недель после прекращения лечения и в этих случаях действие препарата трудно отличить от естественного течения болезни.

ЛС, ассоциированные с лекарственным поражением по типу фиброза, представлены в основном цитостатиками, и в первую очередь метотрексатом, ретиноидами и соединениями мышьяка. Фиброз развивается в той или иной степени практически при любом типе повреждения печеночной паренхимы, связанной с приемом ЛС. Однако при некоторых вариантах лекарственного повреждения фиброз может быть ведущим признаком. Фиброз образуется преимущественно в перисинусоидальном пространстве, нарушая кровоток в синусоидах и в меньшей степени функцию гепатоцитов. Клиническим проявлением такого типа лекарственного поражения является нецирротическая портальная гипертензия. В некоторых ранних проспективных исследованиях у пациентов, получающих метотрексат для лечения ОЛЛ или псориаза, частота развития фиброза печени была выше при ежедневном его применении внутрь, и он выявлялся в 80 % случаев через 3 – 5 лет [6, 8]. При применении средних доз внутривенного МТХ частота развития фиброза наблюдалась менее, чем в 5 % случаев [7]. В отличие от лучевого воздействия на печень, МТХ – обусловленный фиброз печени



стабилизируется или происходит его регрессия после прекращения приема ЛС.

Помимо фиброза печени, прием метотрексата, аллопуринола у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями могут вызывать воспалительную реакцию в печени по типу гранулематозного гепатита. Морфологически гранулемы по клеточному составу схожи с теми, которые развиваются в результате клеточных иммунных реакций при туберкулезе и саркоидозе, состоят из эпителиоидных клеток, лимфоцитов, иногда многоядерных гигантских клеток.

Поражение сосудов печени представлено несколькими морфологическими вариантами: расширением синусоидов, пелиозом, веноокклюзионной болезнью. Веноокклюзионная болезнь (ВОБ) характеризуется повреждением мелких печеночных вен III зоны, которые особенно чувствительны к токсическим агентам. До 20 % случаев осложняет проведение высокодозной комбинированной химиотерапии с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток как проявление реакции гиперчувствительности замедленного типа «трансплантат против хозяина». Значительно реже ВОБ развивается при назначении дакарбазина, высоких доз циклофосфамида, бусульфана, кармустина, митомицина, гемцитабина, дактиномицина, 6 – тиогуанина, цитозин – арабинозида. Риск ее возникновения возрастает при проведении сопутствующей терапии ацикловиром, ванкомицином, при предшествовавшем облучении брюшной полости, метастатическом поражении печени. Клинически выделяют острую фазу, фазу атрофии и фиброза. ВОБ, обусловленная лучевой терапией или химиопрепаратами (в обычных дозах или миелооблативных дозах) часто имеет фатальное течение, но иногда может характеризоваться транзиторным и описана в нескольких случаях [4].

Острая фаза клинически характеризуется болями в правом подреберье, гепатомегалией, асцитом, персистирующей тромбоцитопенией, центролобулярными кровотечениями и кровоизлияниями. Фаза атрофии и фиброза характеризуется формированием атрофии и прогрессирующим фиброзом паренхимы печени. При неблагоприятном течении в исходе ВОБ может возникать фатальный гепатоцеллюлярный некроз гепатоцитов и летальность достигает 30 – 50 %. Выраженность желтухи и цитолиза в начальной стадии незначительны. Развитие данного типа ЛПП ассоциировано наиболее часто с применением азатиоприна, циклофосфана, производными мочевины. При ВОБ помимо поражения сосудов часто морфологически выявляются признаки острого гепатита.

Острый гепатит как реакция на лекарственные препараты описан при использовании противотуберкулезных препаратов (изониазид), аминогликозидных антибиотиков (амикацин), противогрибковых препаратов (кетоконазол, флуконазол), антигипертензивных препаратов и ряда других. Развивается, как правило, через 5 – 8 дней от начала ЛС и предсказать его развитие не представляется возможным. Этот тип поражения не зависит от дозы лекарственного препарата, риск его развития повышается при длительном применении ЛС. Как и при остром вирусном гепатите, преджелтушный период характеризуется неспецифическими симптомами: анорексия, диспепсия, адинамия. Желтушный период сопровождается ахолией, потемнением мочи, гепатомегалией и повышением уровня трансаминаз в крови, при отмене ЛП, вызвавшего острый гепатит, регресс клинической симптоматики происходит достаточно быстро, но описаны случаи развития фульминантной печеночной недостаточности. При исследовании морфологии печени картина данного лекарственного поражения напоминает острый вирусный гепатит: выявление некроза или стеатоза, воспалительная инфильтрация выражена в различной степени и зависит от активности заболевания. Диффузный некроз медикаментозного

происхождения более выражен в центре долек. Стеатоз представлен двумя типами: макровезикулярным и микровезикулярным. При микровезикулярном стеатозе цитоплазма гепатоцитов заполнена множеством мелких жировых капель, которые не вызывают дислокацию ядра. Воспалительные изменения сопровождаются некрозом гепатоцитов в виде умеренной воспалительной реакции с наличием в инфильтрате моноцитов, лимфоцитов и эозинофилов. Воспаление ограничивается в основном портальными зонами.

Внутрипеченочный (каналикулярный) холестаз желтуха обычно развивается после длительного приема препарата в больших дозах. Как правило, развивается на 11 – 15 день, иногда через 2 – 3 месяца после лечения андрогенами и может сопровождаться зудом кожных покровов. Однако повышение печеночных ферментов отмечается значительно чаще, чем желтуха. Желтуха обычно умеренная, быстропроходящая, если прекращается прием препарата. Клинически заболевание сопровождается слабостью, тошнотой и другими расстройствами желудочно – кишечного тракта. Морфологически наблюдается накопление желчи в расширенных желчных канальцах и купферовских клетках без клеточной реакции в портальных трактах. Поражения гепатоцитов отсутствуют. Место блока экстракции билирубина неизвестно. Вероятно, связывание билирубина происходит постмикросомально, и желтуха обусловлена затруднением в транспорте билирубина из клеток печени в желчные протоки. Течение заболевания благоприятное.

Лекарственные средства, способные вызывать хронический лекарственный гепатит, представлены изониазидом, моноциклином, нитрофуранами. По своим признакам напоминает аутоиммунный гепатит: отсутствуют маркеры вирусной инфекции, в некоторых случаях обнаруживаются аутоантитела. Выявляется случайно, как правило, без предшествующего острого гепатита. Морфологически характеризуется ацинарной или перипортальной локализацией поражения, высоким

содержанием в инфильтрате плазматических клеток, иногда выраженным фиброзом.

Канальцевый холестаз как вариант лекарственного повреждения печени связан с приемом циклоспоринаА, гормональных препаратов (андрогены, эстрагены), анаболические стероиды. В патогенезе данного повреждения отмечается снижение тока желчи, уменьшение текучести мембран синусоидов, нарушение плотности межклеточных контактов. К клиническим проявлениям относится кожный зуд, незначительная билирубинемия, транзиторное увеличение трансаминаз, повышение ЩФ наблюдается не всегда. Морфологически отмечается сохранение архитектоники печени, холестатический компонент затрагивает в основном III зону с развитием невыраженной воспалительной клеточной реакции.

Паренхиматозно — канальцевый холестаз вызван действием полусинтетических и синтетических пенициллинов (оксациллин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, метициллин), макролидов (эритромицин), блокаторами гистаминовых рецепторов (циметидин, ранитидин, рабепрозол), пероральными сахароснижающими препаратами. Характеризуется наряду с развитием холестаза более значительным повреждением гепатоцитов с иммунными механизмами поражения. Отличительной клинической чертой данного лекарственного гепатита является присутствие длительного холестатического синдрома, который сохраняется в течение нескольких месяцев или лет, несмотря на отмену препарата. Морфологическая картина представлена холестатическим компонентом III и I зон ацинуса с выраженной клеточной реакцией, локализующейся преимущественно в портальных трактах с большим количеством эозинофилов в инфильтрате, иногда возможно образование гранулем.

Биллиарный сладж обусловлен применением антибиотиков цефалоспориновой группы (в первую очередь цефтриаксоном и цефтазидимом). Характеризуется нарушением пассажа желчи по внепеченочным протокам, что обусловлено нарушением транспорта желчных кислот печени и экскрецией липидов с желчью. Изменяется физико-химический состав желчи с повышением содержания кальциевых солей лекарственных средств. Клинически этот синдром протекает бессимптомно, но у части больных может развиваться типичный приступ желчной колики.

Склерозирующий холангит вызван введением химиотерапевтических средств непосредственно в печеночную артерию – 5 – фторурацил, цисплатин, а также концентрированного этанола при эхинококкозе и лучевой терапии на нижнюю часть живота (ЛГМ, нефробластома, рабдомиосаркома и т.д.). Клиническая картина сходна как при первичном склерозирующем холангите и проявляется упорным и стойким холестазом.

Цирроз печени может развиваться при длительном применении всех медикаментов, вызывающих острый или хронический гепатит. Наиболее часто исходом в цирроз заканчивается ЛПП, обусловленные приемом метотрексата.

Определение клинических и лабораторных признаков поражения печени у больных детей, получающих противоопухолевые препараты, требует проведения углубленного дифференциальной диагностики, позволяющей уточнить причины возникновения поражения печени, среди которых необходимо исключить:

- вирусные гепатиты;
- сопутствующие острые или хронические заболевания печени и желчевыводящих путей;

- предшествующие курсы химиотерапии, осложненные гемотрансфузии или применение ряда других гепатотоксичных ЛП;
- поражения печени опухолевым процессом (метастазы, тромбоз портальной вены) или паранеопластическим (амилоидоз, холестаз) процессом.

Диагностика ЛПП осуществляют, основываясь на анамнестических данных (прием гепатотоксических препаратов (ПХТ) или явления лекарственной непереносимости в прошлом), результатах биохимического исследования сыворотки крови с определением уровня общего и конъюгированного билирубина, альбумина, мочевины, сывороточного железа, АлАТ, АсАТ, церулоплазмينا, глюкозы, ЩФ, ГГТП, ЛДГ. В зависимости от концентрации в плазме крови печеночных ферментов, билирубина и альбумина выделяют четыре степени тяжести поражения печени (в соответствии с критериями Национального института рака США):

легкая степень – повышение уровня трансаминаз, ЩФ, ЛДГ менее чем в 2,5 раза от верхней границы нормы (ВГН), билирубина – менее чем в 1,5 раза от ВГН, снижение альбумина до 30 г/л;

умеренная степень – повышение уровня трансаминаз, ЩФ, ЛДГ в 2,5 – 5 раз от ВГН, билирубина – в 1,5 – 3 раза от ВГН, снижение альбумина до 20 г/л;

тяжелая степень – повышение уровня трансаминаз, ЩФ, ЛДГ в 5 – 20 раз от ВГН, билирубина – в 3 – 10 раз от ВГН, снижение альбумина менее 20 г/л;

крайне тяжелая степень – повышение уровня трансаминаз, ЩФ, ЛДГ более чем в 20 раз от ВГН, билирубина – более чем в 10 раз от ВГН.

Проведение оценки исходного функционального состояния печени до начала химиотерапии – обязательное условие безопасности противоопухолевого лечения.

Для исключения вирусного поражения печени проводят полное серологическое обследование больных детей, включающее ИФА и ПЦР на маркеры вирусных гепатитов, герпетической инфекции, парвовируса В19, аденовирусов и других гепатотропных вирусов. Элементом диагностики ЛПП является морфологическое исследование печени с помощью пункционной биопсии, которое позволяют прогнозировать течение гепатита, выбрать схему лечения.

Лечение ЛПП заключается в быстрой отмене ЛП, вызвавшего гепатит. Изменения доз цитостатиков проводится в зависимости от степени их гепатотоксичности. В 1991 году Varetta и соавтр. Разработали рекомендации, касающиеся изменения доз цитостатиков в зависимости от степени гепатотоксичности. Учитывая пополнение арсенала современных цитостатиков новыми ЛП, данные рекомендации постоянно обновляются, но стандартные принципы остаются неизменными. Легкая степень гепатотоксичности не требует изменения доз цитостатиков. При умеренной степени гепатотоксичности показано снижение дозы большинства цитостатиков (доксорубицин, митоксантрон, винбластин, винкристин, этопозид, паклитаксел) на 50 %, реже (доцетаксел, даунорубицин) – на 25 %. Циклофосфамид, метотрексат, фторурацил, капецитабин назначают в полной дозе. Тяжелая степень гепатотоксичности требует снижения доз большинства противоопухолевых препаратов на 50 – 75 %, полное прекращение терапии винкаалкалоидами, этопозидом. Фторурацил можно применять в полной дозе. Крайне тяжелая степень при нарастании лабораторных признаков цитолитического и/или холестатического синдрома – показание к отмене любых противоопухолевых средств.

При нарушении водно – электролитного баланса, развитии интоксикации посиндромная терапия с применением инфузионной терапии. Глюкокортикостероиды позволяют остановить развитие цитолиза или холестаза.

Назначение урсодезоксихолевой кислоты предпочтительно при назначении холестаза и сопряжено с улучшением биохимических и морфологических проявлений.

## Литература

1. Бабак О. Я. *Хронические гепатиты*.— 1999.— С. 175–187.
2. Буверов А. О. *Лекарственные поражения печени* // РМЖ,.— 2001.— Том 9, № 13–14.
3. Подымова С. Д. *Болезни печени*.— Москва: Медицина,- 1998.— С. 246–264.
4. Шерлок Ш, Дули Дж. *Заболевания печени и желчных путей (перевод с английского)*.— Москва,- 1999.— С. 386–423.
5. DeLeve L., Kaplowitz N. *Mechanisms of drug-induced liver disease* //Gastroenterol Clin. N. Am. – 1995. – V. 24. – P. 787–810.
6. Dahl M.G.C., Gregory M.M., Schever P.J. *Liver damage due to methotrexate in patients with psoriasis*// Br. Med. J. -1971. – V. 1. – P.625–630.
7. McIntosh S., Davidson D.L., O'Brien R.T. et al *Methotrexate hepatotoxicity in children with leukemia*// J. Pediatr. -1977. – V. 90. – P.1019–1021.
8. Sharp H., Nesbit M., White J. et al. *Methotrexate liver toxicity*// J. Pediatr.- 1969. –V. 74. – P.818–819.

## ДИАГНОСТИКА ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

*Ромашевская И.П., Тишкова Н.В., Демиденко А.Н., Мицура Е.Ф.*

Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека  
Гомель, Беларусь

Печень играет центральную роль в метаболизме и детоксикации многих химиотерапевтических препаратов и является органом-мишенью лекарственной токсичности. Однако было бы неверно возлагать на химиотерапию всю ответственность за поражение печени при лечении лейкозов. Поражение паренхимы печени является результатом



взаимодействия локализации лейкозного процесса в печеночной ткани, дистрофогенного влияния тяжелой анемии и интоксикации, присоединением септических и некротических осложнений, вирусного поражения, веноокклюзионной болезни, а также токсическим влиянием цитостатических химиопрепаратов.

*Целью* данного исследования являлась оценка стандартных диагностических критериев поражения печени у детей, больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), на фоне проведения химиотерапии.

*Материалы и методы.* За период с января 2011г. по июнь 2012г. в гематологическом отделении для детей ГУ «РНПЦ РмиЭЧ» получали лечение 27 детей с диагнозом ОЛЛ, из них 16 (51,8%) мальчиков, 11 (48.2%) девочек. Средний возраст на момент постановки диагноза –  $4,7 \pm 2,3$  года. Все пациенты получали стандартное лечение по программе ALL MB-2008 (меркаптопурин, метотрексат, L-аспарагиназа, дексаметазон, винкристин). Для оценки состояния функции печени использовали следующие биохимические лабораторные показатели: содержание общего билирубина (ОБ), аспартат аминотрансферазы (АСТ), аланин аминотрансферазы (АЛТ), С-реактивного белка (СРБ). С целью получения информации о структуре печени, наличии очаговой патологии органа проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) (ультразвуковой сканер «Voluson 730 Expert»). Для исключения веноокклюзионной болезни протокол стандартного УЗИ был расширен применением оценки проходимости крупных вен гепатобилиарной зоны при помощи доплеровского режима (ЦДК). Оценивались следующие ультразвуковые показатели: передне-задний размер правой доли печени (ПЗР), который соотносился с возрастными показателями, эхогенность и структура паренхимы, наличие очаговых образований.

*Результаты.* У всех детей поражение печени протекало без клинических проявлений. Повышение уровня билирубина в сыворотке крови было незначительным ( $20,6 \pm 5,2$  мкмоль/л) и транзиторным. Более выраженным оказалось повышение уровня трансаминаз крови – АЛТ –  $146,7 \pm 27,8$  Е/л и

АСТ –  $75,7 \pm 12,4$  Е/л , и СРБ –  $8,6 \pm 2,1$  мг/л. Последнее расценивалось как инфекционный статус и требовало назначения антибиотикотерапии.

Отмечено увеличение ПЗР правой доли в среднем на 23,6% от возрастной нормы. У 7 детей (26%) эхогенность печени признана средней, у 20 (74%) эхогенность паренхимы печени описывалась как умеренно или значительно повышенная. У 8 детей (30%) эхоструктура паренхимы печени была не изменена (однородная мелкозернистая), у 19 (70%) она описывалась как диффузно неоднородная. У 6 детей (22%) при проведении УЗИ печени изменения не выявлены. У 2 детей на фоне диффузных изменений паренхимы выявлена очаговая патология: гипоехогенные участки в правой доле размером 1,0 – 1,2см (у мальчика 15 лет) и 1,1 – 2,0см (у девочки 9 лет с клиникой сепсиса). При этом зафиксирован высокий уровень СРБ – 16,7 и более 150 соответственно. У 1 девочки выявлены фиброзные изменения по ходу круглой связки печени, что признано ультразвуковой находкой, не имеющей клинического значения. У всех детей при оценке состояния венозного русла гепатобилиарной зоны (воротная, селезеночная, верхнебрыжеечная, нижняя полая и печеночные вены) в режиме ЦДК отмечена проходимость просвета этих сосудов и интактность сосудистой стенки.

*Выводы.* Учитывая полиэтиологичный характер повреждения печени у больных ОЛЛ на фоне химиотерапии, необходима комплексная оценка клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования для своевременной диагностики этого осложнения.

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА У ДЕТЕЙ  
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
КРОВИ МЕТОДОМ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ КОРОТКИХ  
ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ УЧАСТКОВ ДНК**

*Савицкая Т.В., Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А.*

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

Достижения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) при лечении детей ограничивают многочисленные посттрансплантационные осложнения, в том числе такие, как реакции «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, возникновение посттрансплантационных рецидивов основного заболевания. Поэтому изучение динамики гемопоэтического химеризма, приживания донорских гемопоэтических стволовых клеток, играет важную роль для правильной оценки состояния больного.

На сегодняшний день наиболее распространенной и гибкой системой для рутинного количественного исследования смешанного гемопоэтического химеризма является диагностика STR последовательностей ДНК (STR, short tandem DNA repeats), которая используется практически во всех гематологических центрах мира [1-3]. Исследование STR последовательностей представляет собой молекулярно-генетический метод на основе мультиплексной ПЦР, с последующим фрагментным анализом продуктов реакции капиллярным электрофорезом. Короткие тандемные повторы имеют характерную хромосомную локализацию и представлены повторами контретного участка ДНК от 4 до 50 раз. Так как такие повторы являются высокополиморфными, то набор из различных STR последовательностей теоретически различен у каждого человека (информативные аллели), и используются для идентификации отдельного

индивидуума. Современные методы определения химеризма основываются на количественной оценке химеризма, то есть на процентом отношении количества донорских клеток, присутствующих в крови или костном мозге реципиента после трансплантации [4, 5].

*Материалы и методы.* В исследовании использовали ДНК выделенную из мононуклеаров периферической крови 20 пар реципиент – донор, а также из крови и костного мозга реципиентов на 14, 30, 45, 60, 80, 100, 140, 180, 360 дни после ТГСК. Тестирование проводили на системе AmpFlSTR SGM Plus multiplex PCR kit (ABI, UK) которая основана на амплификации полиморфных вариантов 10 STR тетрануклеотидных маркеров плюс амелогенин. Идентификацию аллелей проводили с использованием оригинального программного обеспечения «Gene Mapper» (ABI, UK).

*Результаты.* Из 20 обследованных пар реципиент – донор, у 19 (95,0%) количество STRs с информативными аллелями составило 3 и более, и только одна пара донор и реципиент различалась по двум маркерам, включая маркер Y хромосомы (Рисунок 1).

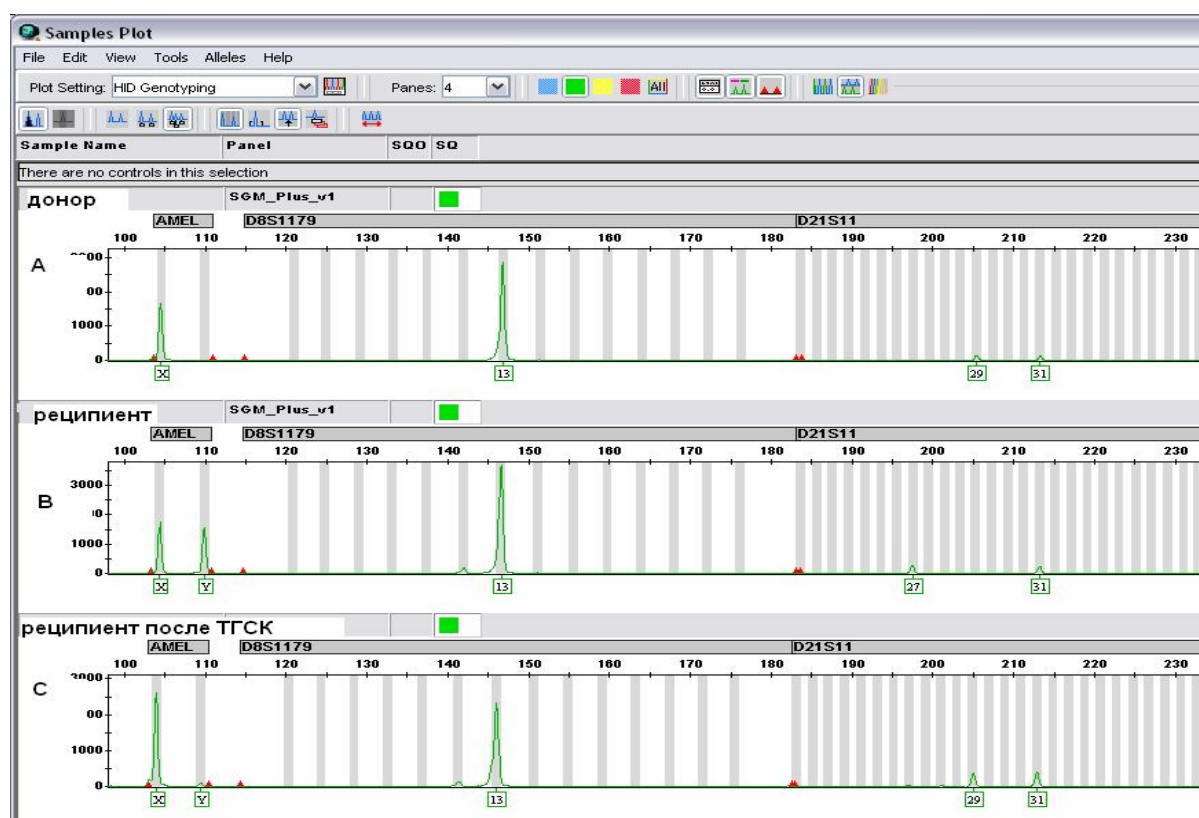


Рисунок 3. Электрофореграммы образцов ДНК из периферической крови реципиента (А),

донора (И), реципиента после ТГСК (С) после амплификации STR локусов. Донор и реципиент различаются маркеру половых хромосом XX и XY, а также аллелями локуса D21S11. На (С) представлен образец со смешанным химеризмом.

Наиболее часто информативные аллели регистрировали по следующим STRs: vWa – различия были у 18 (90,0%) пар, по D2S1338 и D18S51 аллели различались у 15 (75,0%) пар. В ходе исследования у 11 (55,0%) пациентов был выявлен полный гемопоэтический химеризм во всех исследованных образцах. У 9 (45,0%) детей был выявлен смешанный химеризм, при этом у 2 только на 14 день после ТГСК. У 2 пациентов смешанный химеризм регистрировали транзитивно на 100 и 180 дни наблюдения после ТГСК. При этом, у одного пациента только в образце костного мозга диагностировали 98,0% донорский химеризм, а в периферической крови он оставался 100%. У 2 детей с острым миелобластным лейкозом после ТГСК развился рецидив заболевания, которому предшествовала потеря полного донорского химеризма в последней точке обследования перед событием. Однако, у 2 пациентов с острым лимфобластным лейкозом с транслокацией  $t(4;11)(q21;q23)$  и экспрессией химерного онкогена *MLL-AF4*, проводимый мониторинг периферической крови не выявил потерю полного донорского химеризма перед наступлением рецидива. При этом чувствительность метода в собственных исследованиях составила 1-3%.

*Заключение.* Фрагментный анализ продуктов мультиплексной ПЦР на основе STRs является стандартом диагностики гемопоэтического химеризма, и большинство опубликованных в литературе результатов посттрансплантационного мониторинга пациентов выполнены на основе этого метода. Однако, недостаточная чувствительность этой методологии не позволяет диагностировать минимальные реакции трансплантата, в частности диагностировать минимальную потерю полного донорского химеризма у некоторых групп пациентов с гемобластомами.

## Литература

1. Thiede C.. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection// *Leukemia*.- 2001. – V.15. – P. 303–306.
2. Thiede C., Bornha M., Ehninger G.. Evaluation of STR informativity for chimerism testing systems in 203 matched related donor recipient pairs – comparative analysis of 27 STR// *Leukemia*.- 2004.- V. 18. –P.2483–254.
3. Kristt D., Gesundheit B., Stein J., Shapira M., Or R., Amar A., Yaniv I., Garty B., Itah R, Israeli M., Klein T. Quantitative monitoring of multi-donor chimerism: a systematic, validated framework for routine analysis // *Bone Marrow Transplantation*.- 2010. – V. 45. – P. 37–147.
4. Kristt D., Israeli M, Narinski R., Or H., Yaniv I., Stein J., Klein T.. Hematopoietic Chimerism Monitoring Based on STRs: Quantitative Platform Performance on Sequential Samples// *J. Biomolecular. Techniques*. – 2005. – V.16. – P. 378–389.
5. Kristt D., Stein J., Yaniv I., Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility// *Bone Marrow Transplantation*. – 2007. – V. 39. – P. 255–268.

## **ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РОСТА**

*Севрук О.В., Девялтовская М.Г.*

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Минск, Беларусь

По данным ВОЗ в мире рождается около 30% новорожденных с задержкой внутриутробного роста (ЗВУР). Высокая заболеваемость этой категории детей инфекционными и инфекционно-воспалительными заболеваниями в неонатальном и грудном возрасте подчеркивает актуальность нашей работы.

Цель: определить влияние применения препаратов рекомбинантных интерферонов на показатели клеточного иммунитета и апоптоза лимфоцитов у новорожденных с ЗВУР.

*Материалы и методы исследования.* В исследование было включено 78 доношенных новорожденных. Исследование проводилось на базе

педиатрического отделения для новорожденных ГУ «РНПЦ «Мать и дитя».

По центильным таблицам дети были разделены на две группы:

1-я группа (основная) – 55 новорожденных с задержкой внутриутробного роста (масса и/или рост при рождении менее 10 перцентилей);

2-я группа (контроль) – 23 здоровых новорожденных, с антропометрическими параметрами, соответствующими сроку гестации.

Использованы данные лабораторных и инструментальных исследований, выполненных согласно отраслевым стандартам. Иммунологическое обследование включало оценку клеточного звена иммунитета (субпопуляции основных иммунокомпетентных клеток, показатели активации лимфоцитов) и апоптоза лимфоцитов, проведенные методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Материалом служили лимфоциты крови для оценки иммунного статуса. Определяли лимфоциты с поверхностными антигенами CD45+3+, CD3+4+, CD3+8+, CD3-19+, CD3-56+, CD3+56+, маркеры ранней и поздней активации лимфоцитов CD3+25+ и CD3+HLA-DR+ методом проточной цитометрии при помощи проточного цитометра «Cytomics FC 500» с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter). Использовали пятицветные реагенты линии Cyto-Stat – комбинации прямых моноклональных антител, меченых флюорохромами: FITC (изотиоционат), RD<sub>1</sub> (фикоэритрин), ECD (техасский красный –X/фикоэритрин) и PC (цианин-5/фикоэритрин и цианин-7/фикоэритрин):

-1-я панель: CD45- FITC /CD4-RD<sub>1</sub>/CD8-ECD/CD3-PC5/CD25-PC7;

-2-я панель: CD45-FITC /CD56-RD<sub>1</sub>/CD19-ECD /CD3-PC5/HLA-DR-PC7.

Рассчитывали иммунорегуляторный индекс как соотношение CD4+/CD8+. Абсолютное число клеток определяли при помощи реагента Flow-count.

Исследование апоптоза лимфоцитов периферической крови проводилось при помощи набора для определения апоптоза Annexin V-FITC (Beckman Coulter).

Результаты обработаны параметрическими и непараметрическими методами вариационной статистики с применением пакета прикладной программы «Statistica 6.1». Для величин, имеющих нормальное распределение, рассчитывались средняя арифметическая (M), стандартное отклонение (SD). Для величин, имеющих распределение, отличное от нормального, рассчитывались медиана (Me) и интерквартильный размах ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$ ). Для определения статистически значимых количественных различий между группами использовали критерий Стьюдента (t) или Манна-Уитни (U). Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами. Различия считались статистически значимыми при величине уровня значимости  $p < 0,05$ . Выявление взаимосвязей между изучаемыми признаками проводилось при помощи метода Пирсона с вычислением коэффициента корреляции  $R$ . Различия в группах в динамике определяли при помощи критерия Вилкоксона.

*Результаты и обсуждение.* Дети исследуемых групп достоверно различались по антропометрическим показателям: массе тела (основная группа –  $2326 \pm 235$  г, контрольная группа –  $3412 \pm 324$  г,  $t = -15,9$ ,  $p < 0,001$ ); длине тела (основная группа –  $47 \pm 2,0$  см, контрольная группа –  $52 \pm 1,9$  см,  $t = -10,9$ ,  $p < 0,001$ ), окружности головы (основная группа –  $32 \pm 1,4$  см, контрольная группа –  $36 \pm 4,9$  см,  $t = -4,4$ ,  $p < 0,001$ ) и грудной клетки (основная группа –  $30 \pm 1,5$  см, контрольная группа –  $33 \pm 1,0$  см,  $t = -7,8$ ,  $p < 0,001$ ). Это подтверждает принадлежность основной группы к детям с ЗВУР и соответствует критериям отбора. Группы были сопоставимы по сроку гестации (основная группа –  $38,3 \pm 1,11$  нед., контрольная группа –  $38,7 \pm 0,73$  нед.,  $p = 0,15$ ), полу ( $\chi^2 = 0,37$ ,  $p = 0,54$ ), возрасту матерей (основная группа –  $28,1 \pm 5,68$  лет, контрольная группа –  $27,4 \pm 4,36$  лет,  $t = 0,73$ ,  $p = 0,47$ ).



Данные исследования показателей клеточного иммунитета и апоптоза лимфоцитов исследуемых групп представлены в таблице .

Таблица - Показатели клеточного иммунитета исследуемых групп, M±SD

| Показатели                              | Группа 1<br>(n=55),<br>M±SD | Группа 2<br>(n=23),<br>M±SD | t     | p     |
|-----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|-------|
| CD45+3+, %                              | 78±7,2                      | 79,7±7,31                   | -0,92 | 0,36  |
| CD45+3+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)     | 4,1±2,2*                    | 5,8±4,04*                   | -2,22 | 0,03  |
| CD3+4+, %                               | 58,6±8,57                   | 61,9±8,07                   | -1,51 | 0,14  |
| CD3+4+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)      | 3,1± 1,73*                  | 4,5±3,08*                   | -2,31 | 0,02  |
| CD3+8+, %                               | 20,3±7,49                   | 18,0± 4,53                  | 1,27  | 0,21  |
| CD3+8+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)      | 1,0±0,58                    | 1,3±0,92                    | -1,44 | 0,15  |
| CD3-19+, %                              | 12,3±5,93                   | 10,9±3,74                   | 0,98  | 0,33  |
| CD3-19+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)     | 0,78±0,75                   | 0,94±0,95                   | -0,76 | 0,45  |
| CD3-56+, %                              | 5,2±3,12*                   | 3,2±2,52*                   | 2,49  | 0,02  |
| CD3-56+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)     | 0,3±0,3                     | 0,2± 0,13                   | 1,39  | 0,17  |
| CD3+56+, %                              | 0,7±0,66*                   | 0,3±0,12*                   | 2,68  | 0,01  |
| CD3+56+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)     | 0,04±0,05                   | 0,02±0,01                   | 1,85  | 0,07  |
| CD3+25+, %                              | 7,6±5,46                    | 6,7±2,11                    | 0,72  | 0,47  |
| CD3+25+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л)     | 0,42±0,59                   | 0,48±0,36                   | -0,38 | 0,7   |
| CD3+HLA-DR+, %                          | 1,6±1,08*                   | 1,0±0,47*                   | 2,1   | 0,04  |
| CD3+HLA-DR+, абс.(? 10 <sup>9</sup> /л) | 0,08±0,09                   | 0,12±0,16                   | -1,0  | 0,32  |
| ИРИ                                     | 3,23±1,18                   | 3,71±1,16                   | -1,56 | 0,12  |
| Annexin+PI-, % (ранний апоптоз)         | 9,8±6,2*                    | 4,8±2,8*                    | 3,4   | 0,001 |
| Annexin+PI+, % (поздний апоптоз)        | 1,4±1,4                     | 1,5±1,8                     | -0,31 | 0,76  |
| Annexin-PI-, % (живые клетки)           | 86,7±6,8*                   | 91,3±4,5*                   | -2,66 | 0,01  |
| Annexin-PI+, % (некроз)                 | 2,4±1,2                     | 2,7±1,5                     | -0,81 | 0,42  |

Примечания: \*- различия между группами достоверны при p<0,05; M±SD- средние значения признака и стандартное отклонение; t-критерий Стьюдента; p-коэффициент достоверности; ИРИ-иммунорегуляторный индекс.

В основной группе новорожденных с ЗВУР наблюдалось достоверно более низкое значение абсолютного числа CD45+3+ лимфоцитов (основная группа-4,1±2,2? 10<sup>9</sup>/л, контрольная группа - 5,8±4,04? 10<sup>9</sup>/л; t=-2,22, p=0,03) за счет снижения Т-хелперов с поверхностными маркерами CD4+8- (основная группа-3,1±1,73? 10<sup>9</sup>/л, контрольная группа -4,5±3,08? 10<sup>9</sup>/л; t= -2,31, p=0,02). Также установлено повышение относительного числа NK-клеток с фенотипом CD3-56+(основная группа - 5,2±3,12%, контрольная группа - 3,2±2,52%, p=0,02) и относительного числа маркеров поздней активации

лимфоцитов CD3+HLA-DR+(основная группа  $-1,6\pm1,08\%$ , контрольная группа  $-1,0\pm0,47\%$ ,  $p=0,04$ ) в основной группе. Отмечалось значительное повышение относительного числа NKT-клеток CD3+56+ (основная группа  $-0,7\pm0,66\%$ , контрольная группа  $-0,3\pm0,12\%$ ,  $p=0,01$ ). Содержание относительного числа В-лимфоцитов CD3-19+ в группах достоверно не различалось ( $p>0,05$ ) и было низким в обеих группах. Это значит, что при развитии инфекционно-воспалительного процесса у новорожденных его локализация редко возможна вследствие общей незрелости и низкой функциональной активности В-лимфоцитов, вырабатывающих интерфероны, что требует проведения этиотропной заместительной терапии с использованием лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантные интерфероны. Выявлены отрицательные корреляции средней силы между массой тела при рождении и количеством клеток – натуральных киллеров CD3-56+ ( $r=-0,45$ ,  $p<0,05$ ), маркеров активации лимфоцитов CD3+HLA-DR+ ( $r=-0,41$ ,  $p<0,05$ ) и NKT-клеток CD3+56+ ( $r=-0,40$ ,  $p<0,05$ ). Полученные данные подтверждают наличие напряженности иммунитета в группе новорожденных с ЗВУР и большей подверженности этой когорты детей инфекционно-воспалительным заболеваниям.

Процент лимфоцитов, подверженных раннему апоптозу (лимфоциты Annexin+PI-), был больше у детей основной группы (основная группа  $-9,8\pm6,2\%$ , контрольная группа  $-4,8\pm2,8\%$ ,  $p=0,001$ ) за счет уменьшения числа живых клеток (основная группа  $-86,7\pm6,8\%$ , контрольная группа  $-91,3\pm4,5\%$ ,  $p=0,01$ ). Количество лимфоцитов в состоянии позднего апоптоза и некроза в группах не различалось ( $p>0,05$ ). Полученные нами данные о апоптозе лимфоцитов у новорожденных соответствуют литературным данным, говорящим о норме до 5% [1, 2].

Проведена терапия с использованием препаратов, содержащих интерфероны в составе комплексной терапии у новорожденных с ЗВУР. Интерфероны являются основными регуляторами системы клеток-киллеров, играют главную роль в созревании и взаимодействии Т-клеток. Ранний

интерферон- $\alpha$  новорожденных отличается от интерферона взрослых полипептидным составом и гидрофобными свойствами и служит причиной возможного срыва защитных реакций и развития вирусных и бактериальных инфекций [3]. После проведенного лечения произошло увеличение относительного и абсолютного числа лимфоцитов с фенотипом CD3-19+ до нормального уровня (с 10,6 (8,5; 16,5)% до 25,8 (20; 29,3)%, критерий Вилкоксона  $p=0,0003$ ; с  $0,6 (0,4; 0,9) \cdot 10^9/\text{л}$  до  $1,1 (0,8; 1,73) \cdot 10^9/\text{л}$ , критерий Вилкоксона  $p=0,008$ ). При этом произошла нормализация относительного и абсолютного показателей Т-хелперов CD3+4+ пациентов (контроль-  $64,3 \pm 1,43\%$ ,  $p=0,03$ ; контроль -  $3,2 \pm 1,3 \cdot 10^9/\text{л}$ ,  $p=0,02$ ), нормализация относительного числа CD3+56+клеток (контроль-  $0,2 \pm 0,03\%$   $p=0,04$ ) и относительного числа маркеров активации лимфоцитов CD3+HLA-DR+(контроль-  $1,1 \pm 0,26\%$ ,  $p=0,04$ ). По сравнению с группой контроля выявлено снижение процента клеток вступивших в ранний апоптоз у детей основной группы (контроль-  $4,8 \pm 2,8\%$ ,  $p=0,01$ ). Таким образом, значение показателя раннего апоптоза лимфоцитов отражает степень иммунологической направленности организма на патологический процесс и может быть использовано в практической медицине как один из показателей степени напряженности иммунитета наряду с показателями активации лимфоцитов.

*Заключение.* У новорожденных с ЗВУР наблюдается достоверно более низкое значение абсолютного числа CD45+3+ лимфоцитов за счет снижения Т-хелперов с поверхностными маркерами CD3+4+ , увеличение относительного числа NK-клеток с фенотипом CD3-56+, NKT-клеток CD3+56+ и маркеров активации лимфоцитов CD3+HLA-DR+.

Использование в комплексной терапии новорожденных с ЗВУР препаратов, содержащих рекомбинантные интерфероны, приводит к повышению уровня лимфоцитов с фенотипом CD3-19+, нормализации Т-хелперов CD3+4+, NKT-клеток, маркеров поздней активации лимфоцитов CD3+HLA-DR+ и показателя раннего апоптоза лимфоцитов. Рекомендуется

применение рекомбинантных интерферонов в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний новорожденных с ЗВУР.

## Литература

1. Левицкая, А.Б. Современные методы определения апоптоза / А.Б. Левицкая, Д.Б. Никитюк // Вестник новых медицинских технологий. - 2005. - Т. XII.- № 3-4. - С. 33.
2. Vermes I. Flow cytometry of apoptotic cell death // J. Immunol. Methods. - 2000. – V. 243. - P. 167-190.
3. Неонатология. Национальное руководство / Под ред. Я.Я. Володина.-изд. «ГЭОТАР-Медиа», 2011.- 743 с.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЬЦЕВЫХ СТРУКТУР ДНК Т-КЛЕТОЧНОГО (TREC) и В-КЛЕТОЧНОГО (KREC) РЕЦЕПТОРА КАК МАРКЕРА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

*Стёганцева М.В., Кустанович А.М., Шарапова С.О., Белевцев М.В.*

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

Т-лимфоциты наравне с В-лимфоцитами уникальны в своей способности формировать антигенраспознающий рецептор в результате V(D)J рекомбинации соответствующих генов. Такое эволюционное приобретение связано с тем, что в течение жизни человек постоянно контактирует с множеством инфекционных агентов, которые зачастую обладают уникальным набором антигенных детерминант. Большинство из них подвержены процессам антигенного шифта и дрейфа, что требует от иммунной системы постоянного обновления клеточных популяций и выбора тех, которые содержат необходимые специфические рецепторы. В процессе клеточной дифференцировки в костном мозге или тимусе образуется такой побочный продукт как Т-клеточные и В-клеточные эксцизионные кольца (TREC и KREC), соответственно [1]. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что

позволяет использовать их определение как показатель пролиферации лимфоцитов и суррогатный маркер нормального развития иммунной системы [2].

В тимусе предшественники Т-клеток подвергаются серии преобразований, которые проявляются в мембранной экспрессии антигенов кластеров дифференцировки. Фенотип отражает этапы созревания Т-лимфоцитов, ключевым событием которого является формирование иммунорецептора. В процессе созревания  $\alpha\beta$  (или  $\gamma\delta$ ) Т-лимфоцитов перестройка генных сегментов ведет к формированию  $\alpha$  и  $\beta$  или  $\gamma$  и  $\delta$  цепей Т-клеточного рецептора (ТКР). Антиген распознающие переменные домены  $\alpha$  и  $\beta$  цепей ТКР образуются путем комбинирования 3 типов сегментов: V (переменный), D (формирующий разнообразие) и J (соединительный) (для  $\beta$  цепи) или 2 сегментов: V и J (для  $\alpha$  цепи). V(D)J рекомбинация инициируется распознаванием сигнальной последовательности рекомбинации (RSS), которая фланкирует кодирующий сегмент. В процессе реарранжировки ДНК, расположенная между двумя RSS, замыкается в кольцо, в результате чего образуется экстрахромосомный кольцевой продукт, содержащий две лигированные RSS последовательности [1]. Эти, так называемые, signal joint TRECs (sjTREC) стабильны, не дублируются в процессе митоза [1,2] и обнаруживаются в ~70%  $\alpha\beta$  Т-лимфоцитов [5].

Сходный механизм образования эксцизионных колец наблюдается и в процессе созревания В-лимфоцитов в костном мозге. V(D)J рекомбинация IGK локуса гена иммуноглобулинов приводит к образованию V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub> signal joint KREC. Последующая реарранжировка между интроном RSS и K<sub>de</sub> элементом делает IGK locus нефункциональным, посредством удаления S<sub>K</sub> экзона и энхансеров, предотвращая тем самым дальнейшие перестройки данного локуса, поэтому coding joint стабильно остается в геноме. По данным исследований они обнаружены в ~50% В-клеток [3].

Как упоминалось ранее, TREC и KREC являются стабильными структурами, которые в ходе пролиферации лимфоцитов остаются в одной из дочерних клеток, не дублируются в процессе митоза и являются результатом успешной перестройки Т- и В-клеточных рецепторов. Это позволяет использовать определение кольцевых структур как маркеров пролиферации лимфоцитов. Количественное определение встречаемости sjTRECs в периферической крови позволяет установить число ранних тимических мигрантов (PTM), что в свою очередь является показателем эффективности функционирования тимуса [6]. На содержание TRECs значительно влияет пролиферация наивных Т-клеток, в то время как антиген индуцированная пролиферация затрагивает только клетки памяти и не влияет на тимические мигранты [4,6]. Следовательно, количество TRECs также может быть использовано для оценки функционирования иммунной системы в таких случаях, как восстановление иммунитета в последствие трансплантации костного мозга или в течение ВИЧ инфекции [7,8,9,10].

Определение TRECs можно применять для ранней диагностики иммунодефицитных состояний [11,12]. Причиной данных расстройств зачастую являются генетические мутации, которые нарушают функционирование компонентов иммунитета и приводят к увеличению восприимчивости к инфекциям [2]. Однако, несмотря на успехи в области молекулярно-генетических исследований, доступные методы диагностики не всегда позволяют обнаружить имеющиеся дефекты, чтобы вовремя диагностировать заболевание и спрогнозировать его течение. В ряде случаев дефекты/мутации генов приводят к отсутствию/снижению содержания Т- и В-клеток, что проявляется в снижении уровня TREC/KREC. Так, при агаммоглобулинемии присутствуют TREC, но отсутствуют KREC. Это позволяет использовать определение TREC/KREC как суррогатный, но надежный маркер, характеризующий дефекты иммунной системы, связанные с созреванием Т- и В-клеточного звена иммунитета.

На сегодняшний день уже разработана и внедрена методика их использования для скрининга новорожденных [12, 13]. По последним данным считается, что норма TREС для детей в возрасте от 6 месяцев до 18 лет составляет более 801 копии на миллион мононуклеаров периферической крови. С возрастом этот показатель падает, для людей в возрасте от 19 до 44 лет норма TREС составляя более 227 копий на миллион CD3+ клеток, с 45 до 54 лет – более 111 копий и после 55 лет – более 78 копий на миллион CD3+ клеток [15]. Существует ряд подходов к определению содержания эксцизионных колец. Их количество может быть подсчитано количественным или полуколичественным методом. Концентрацию оценивают с помощью ПЦР в реальном времени, количественной конкурентной ПЦР и ПЦР-ELISA. В литературе используются различные подходы к стандартизации методов определения количества копий TREС/KREC [1,4]. Например, учитывают TREС/10<sup>6</sup> мононуклеаров периферической крови, TREС/CD45RA+ Т-клетки, TREС/мг ДНК или TREС/10<sup>5</sup> CD4+ Т-клеток. В данном исследовании мы разработали методику количественного определения TREСs стандартизованную по количеству копий контрольного гена в соответствии с методиками, используемыми в национальных программах скрининга новорожденных в США [11].

Целью работы являлась разработка метода количественной оценки содержания кольцевых структур ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TREС и KREC) в образцах крови пациентов с дисфункцией иммунной системы.

*Материалы и методы.* Объектом исследования послужили образцы периферической крови 15 пациентов с расстройствами иммунной системы в возрасте от 1 месяца до 16 лет. В контрольную группу вошли дети в возрасте от 3 лет.

ДНК выделяли из ядродержащих клеток периферической крови согласно стандартной процедуре. 100 нг ДНК вносили в реакцию для ПЦР в реальном времени, содержащую буфер QuantiTect Probe PCR mix (Qiagen, Германия) и соответствующие праймеры/пробы. ПЦР реакцию проводили на

амплификаторе StepOne Plus (Life technologies, США). Для амплификации в ПЦР были использованы праймеры для sjTREC Ja, KREC и альбумина [2].

Для лигирования и трансформации использовали набор Rapid DNA Ligation&Transformation Kit (Fermentas, Литва). В качестве компетентных клеток для трансформации использовали штамм XL-blue1 E.coli. Плазмидная ДНК была выделена в общем объеме 50 мкл с использованием набора Gen Elute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Sigma, США).

Концентрация плазмидной ДНК определялась в реакции рестрикции общим объемом 20 мкл. Согласно полученным по результатам электрофореза концентрациям (маркер O'GeneRuler<sup>TM</sup> Express DNA Ladder (0,1 ?g/?l)) было посчитано количество копий плазмид. По стандартной кривой получены серийные разведения линейаризованной плазмидной ДНК, содержащей соответствующие вставки sjTREC Ja, sjKREC, альбумин, с шагом в 10 раз ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ).

Серийные разведения плазмид, содержащих участки TREC, KREC и альбумина в качестве контрольного гена использовались в качестве стандартов в ПЦР в реальном времени.

*Результаты и обсуждение.* Зарубежные авторы используют различные подходы к оценке уровня содержания TREC и KREC: гатри карты, разведения плазмид или количество копий исследуемой мишени в расчете на микролитр периферической крови. В нашей работе была использована стандартизация по количеству плазмид. В ходе работы нами были созданы стандарты для абсолютного количественного определения содержания плазмид со вставками альбумина, KREC и TREC (рисунок 1).



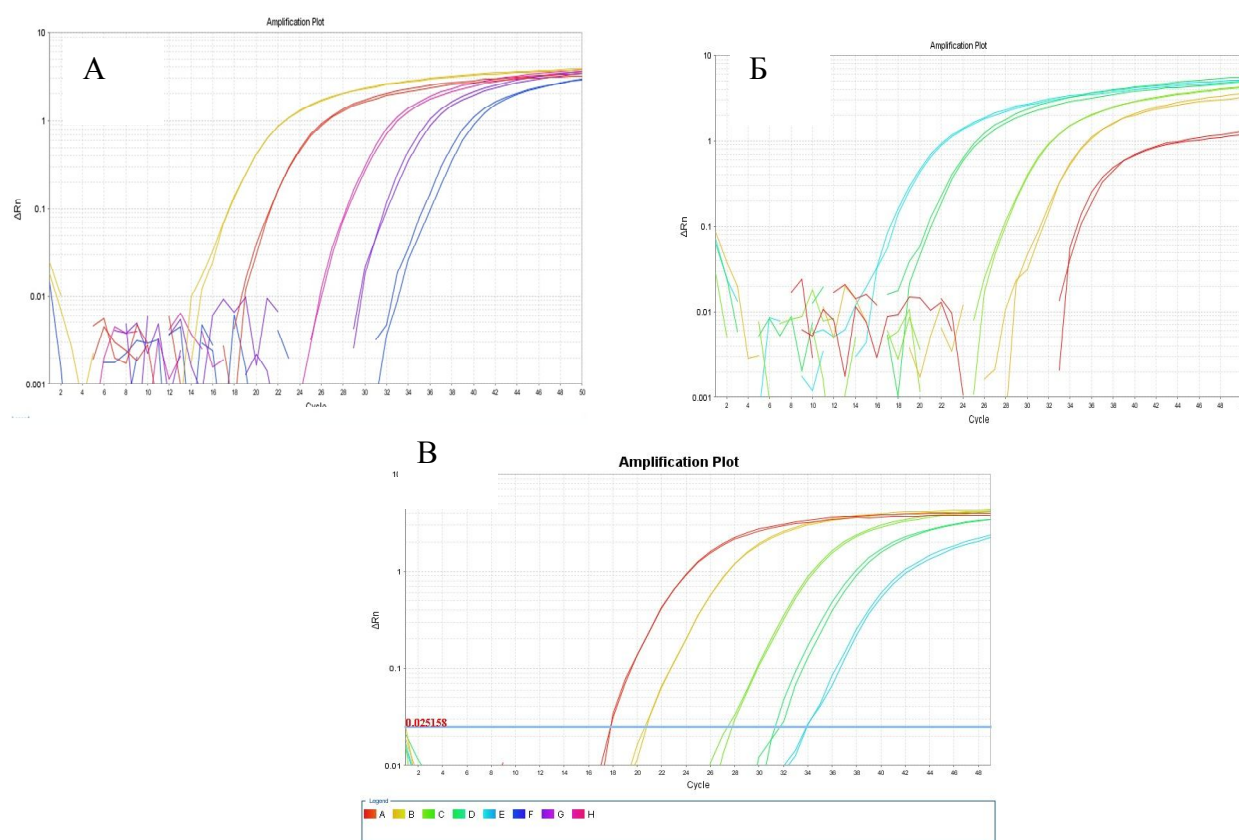


Рисунок 1 – Стандартные кривые амплификации альбумина (А), KREC (Б), TREC (В).

Все параметры стандартных кривых используемых разведений (альбумин, TREC, KREC) находятся в пределах нормы и представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры стандартных кривых используемых разведений

| Мишень   | Наклон | Y-Inter | Коэффициент корреляции | Эффективность, % |
|----------|--------|---------|------------------------|------------------|
| Альбумин | -3.609 | 39.4    | 0.999                  | 89.2             |
| KREC     | -3.487 | 40.0    | 0.999                  | 93.5             |
| TREC     | -3.344 | 37.7    | 0.997                  | 99.1             |
| TREC Ja  | -3.740 | 40.6    | 0.995                  | 85.1             |

С использованием стандартов и соответствующих праймеров мы проанализировали содержание искомых мишеней в образцах крови 10 исследуемых пациентов и 2 здоровых донора в качестве группы сравнения. Пациенты имели дефект в Т-клеточном звене иммунитета, однако нами было проанализировано содержание как TREC, так и KREC (рисунок 2). На

рисунке видно, что доноры группы сравнения (без дефектов иммунной системы) имели более высокий уровень TRECs по сравнению с пациентами с нарушением Т-клеточного звена иммунитета, хотя сами пациенты также отличались по этому критерию. По результатам исследования установлено, что количество копий искомым мишеней у пациентов с расстройствами иммунной системы существенно ниже, чем в контрольной группе, либо вообще не определяется, что соответствует данным, полученным зарубежными авторами. Сопоставление содержания TRECs и KRECs показало, что, в зависимости от типа нарушения, уровни этих мишеней существенно варьируют, достигая (для KREC) значений даже больших, по сравнению со здоровыми донорами. Однако необходимо проведение дальнейших исследований, сопоставление с клинико-биологическими характеристиками и увеличение исследуемых групп для корректной интерпретации биологической и клинической значимости определения исследуемых маркеров.

В ходе выполнения работы нами разработана и валидирована система количественного определения содержания TREC и KREC в образцах периферической крови. Подобная система количественного определения позволяет проводить стандартизацию исследований по количеству ядродержащих клеток (2 копии альбумина на клетку), на объем крови, то есть по параметрам, используемым зарубежными исследователями. Разработанная в данном исследовании методика определения кольцевых структур ДНК Т-клеточного и В-клеточного рецептора может быть использована для определения эффективности функционирования иммунной системы.

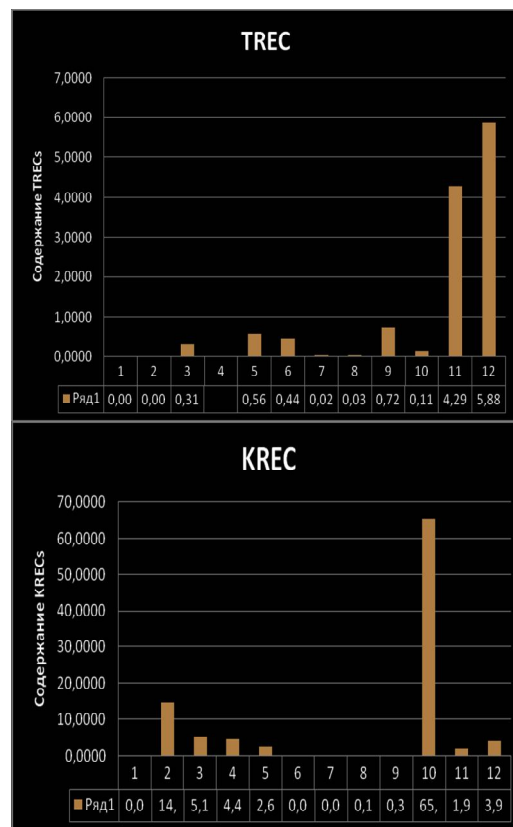


Рисунок 2 – Результаты количественного сопоставления содержания TREC и KREC у пациентов (1-10) и в группе сравнения (11-12) (по горизонтальной оси). Данные представлены как количество копий исследуемой мишени в пересчете на копию альбумина.

## Литература

1. Geenen V. et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. // *Journal of Endocrinology*. – 2003. – V. 176. – P. 305-311.
2. Van Zelm M., van der Burg M., van Dongen J.M. PID comes full circles: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. // *Frontiers in immunology*. – 2011. – V.2. – P. 1-9.
3. Van Zelm M., Szczepanski T., van Dongen J., Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B-cell expansion. // *The Journal of experimental medicine*. – 2007. – V.204. – P. 645-655.
4. Hazenberg MD, et al. Thymic output: a bad TREC record. // *Nature immunology*. – 2003. – V.4. – P. 97-99.
5. De Villartay J., et al. Deletion of the human T-cell receptor  $\delta$  gene by a site-specific recombination. // *Nature*. – 1988. – V.335. – P. 170-174.
6. Kong F., et al. T-cell receptor deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. // *PNAS*. – 1999. – V.96. – P. 1536-1540.

7. Hazenberg M. et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. // *Blood journal*. – 2002. – V. 99. – P. 3449-3453.
8. Svaldi M, et al. T-cell receptor excision circles: a novel prognostic parameter for the outcome of transplantation in multiple myeloma patients. // *British Journal of Haematology*. – 2003. – V. 122. – P. 795-801.
9. Chavan S, et al. Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2001. – V. 183. – P. 1445-1454.
10. Franco J. M, et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. // *Blood Journal*. – 2002. – V. 99. – P. 3702-3706.
11. Verbsky J., Thakar M., Routes J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2012. – V. 129. – P. 622-627.
12. Chase N., Verbsky J., Routes J. Newborn screening for SCID: three years of experience. // *New York Academy of Sciences*. – 2011. – V. 1238. – P. 99-105;
13. Borte S. et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. // *Blood Journal*. – 2011. – V. 8. – P. 3710-3721.
14. Atar Lev, et al. The Kinetics of Early T and B Cell Immune Recovery after Bone Marrow Transplantation in RAG-2-Deficient SCID Patients. // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – P. 1-12.
15. Mayo Clinic Mayo Medical Laboratories 2012 Test definition: T-cell receptor excision circles (TREC) Analysis for immune reconstitution // [www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/print/87959](http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/print/87959).

## ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ХИМИОПРЕПАРАТАМ IN VITRO

*Тарасова А.В., Шман Т.В., Исайкина Я.И., Жерносеченко А.А.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Формирование множественной лекарственной устойчивости *de novo* по-прежнему является основным препятствием в лечении онкологических заболеваний, в том числе и лейкозов [1].

В настоящее время выделяют четыре основные группы механизмов химиорезистентности лейкемических клеток. К ним относятся: снижение накопления препарата в клетке; изменение мишеней препаратов или их

повышенная репарация; обезвреживание препарата в клетке; блокирование апоптотических сигнальных путей [2].

Исключительный интерес представляют исследования, которые показали существование принципиально нового класса резистентности, не связанной со свойствами самих опухолевых клеток, а проявляющейся только при условии взаимодействия опухолевых клеток с компонентами микроокружения – резистентность опосредованная адгезией [3].

Микроокружение костного мозга – это комплекс нескольких клеточных типов, включающий гемопоэтические и негемопоэтические клетки – эндотелиальные клетки, мезенхимальные стромальные клетки (МСК), а также остеокласты и остеобласты. Тесное функциональное взаимодействие между этими составляющими обеспечивает регуляцию гемопоэза, мобилизацию клеток крови в кровяное русло, а также «хоуминг» стволовых клеток в селективные участки костного мозга.

Исследования, посвященные влиянию мезенхимальных клеток на множественную лекарственную устойчивость лейкозных клеток, становятся актуальными в связи с широким использованием МСК для лечения и профилактики реакции трансплантат против хозяина [4], а также при проведении котрансплантаций с гемопоэтическими стволовыми клетками [5].

Кроме известных преимуществ использования мезенхимальных клеток в трансплантологии, неизученными являются их возможные негативные эффекты, такие как, например, поддержание жизнеспособности и химиорезистентности остаточных лейкоэмических клеток. Выполняя свою естественную функцию, микроокружение способно создать благоприятные условия для лейкозной клетки, повышая ее шансы на выживание во время химиотерапии [6]. Как показано ранее, приобретённая таким образом лекарственная устойчивость лейкозных клеток зависит как от растворимых факторов микроокружения, так и от прямых контактов опухолевых клеток с клетками стромы [7].

Целью работы было проанализировать влияние МСК на чувствительность клеточных линий и лейкемических клеток пациентов с острыми лейкозами к химиопрепаратам *in vitro*.

*Материалы и методы.* В работе использовали лейкемические клеточные линии человека: эритромиелоидная линия K562, лимфобластоидные линии Raji и Nalm-6. 23 пациента с диагнозом острый лейкоз (ОЛ), находящиеся на лечении в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», были включены в исследование. Лейкемические клетки выделяли на градиенте плотности из пунктата костного мозга на момент диагностики заболевания до начала лечения.

Лекарственную чувствительность лейкемических клеток определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) теста. Тестировали шесть доз химиопрепаратов в двух повторях. Диапазон изучаемых концентраций для лейкемических клеток пациентов составил: L-аспарагиназа - от 0,003 до 10 ЕД/мл; этопозид – от 0,05 до 50 мкг/мл. Диапазон концентраций для клеточных линий составил: L-аспарагиназа - от 0,015 – 50 ЕД/мл; этопозид - от 0,195 до 200 мкг/мл. Образцы инкубировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе 96 часов. По истечении времени культивирования в каждую лунку добавляли раствор МТТ и продолжали инкубирование 6 часов. После растворения образовавшихся гранул формазана определяли оптическую плотность при длине волны 540 нм на спектрофотометре Sanofi Diagnostic Pasteur PR 2100. Выживаемость клеток (ВК) определяли по следующей формуле:

$$\text{ВК \%} = (\text{ОПл} - \text{ОПс}) / (\text{ОПк} - \text{ОПс}) * 100\%, \text{ где}$$

ОПл– это оптическая плотность опытных лунок, ОПк – оптическая плотность лунок контроля жизнеспособности клеток, ОПс – оптическая плотность лунок контроля среды без клеток. Результаты считают адекватными, если  $\text{ОПк} - \text{ОПс} > 0,05$ . Затем рассчитывали величину полулетальной концентрации химиопрепарата LC50 (концентрация, при которой гибнет 50 % клеток).

При сокультивировании лейкемических клеток с мезенхимальными стромальными клетками вводили дополнительный параметр ОПкс – оптическая плотность лунок контроля МСК с клетками. В качестве контроля среды МСК использовали значения ОПк. Выживаемость лейкемических клеток на монослое МСК определяли по формуле  $ВК\% = (ОПл - ОПк) / (ОПкс - ОПк)$ .

В дополнение к МТТ-тесту определяли количество погибших клеток по накоплению флуоресцентного красителя пропидиум йодида методом проточной цитофлуориметрии.

#### *Результаты и их обсуждение.*

#### *Влияние МСК на чувствительность клеточных линий к химиопрепаратам in vitro.*

При сравнении химиочувствительности клеток лейкемических клеточных линий в присутствии МСК и без них выявили, что эритромиелоидная линия K562 менее подвержена защитному влиянию МСК, чем лимфобластоидные линии Nalm-6 и Raji. Так выживаемость клеток линии K562 была достоверно выше ( $p=0,017$ ) на монослое МСК в случае только одного из разведений этопозиды (50 мкг/мл). На остальных исследуемых концентрациях препарата чувствительность клеток K562 под влиянием МСК не изменялась.

Для клеток линии Raji было выявлено снижение их чувствительности к L-аспарагиназе при культивировании клеток на монослое МСК. Однако достоверные различия в чувствительности клеток были получены обоими методами только на 2-ух концентрациях: 0,08 U/ml ( $p=0,004$ ) и 10 U/ml ( $p=0,016$ ). Схожие результаты были получены при исследовании чувствительности клеточной линии Nalm-6 к этопозиду. На монослое МСК выживаемость клеток была достоверно выше на следующих концентрациях препарата: 0,195 мкг/мл ( $p=0,004$ ), 10 мкг/мл ( $p=0,016$ ) и 50 мкг/мл ( $p=0,007$ ).

#### *Влияние МСК на чувствительность лейкемических клеток пациентов с острыми лейкозами к химиопрепаратам in vitro.*

Для проведения исследований выделенные лейкемические клетки культивировали на монослое МСК 24 часа, затем добавляли химиопрепараты (этопозид/аспарагиназу) в 6-ти разведениях и инкубировали 72 часа при 37°C. Лейкемические клетки 9-ти пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) инкубировали с L-аспарагиназой, клетки 10-ти пациентов с ОЛЛ и 4-х с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) инкубировали с этопозидом. Результаты сравнения химиочувствительности лейкемических клеток пациентов в зависимости от присутствия МСК представлены на Рисунке 1.

Повышение химиорезистентности под влиянием МСК было более характерно для лейкемических клеток пациентов с ОЛЛ, тогда как миелобластные клетки практически не изменяли своей чувствительности к химиопрепарату в присутствии МСК.

Достоверные различия в чувствительности лимфобластных клеток пациентов к L-аспарагиназе в присутствии и отсутствии МСК были получены на низкой (0,0032 U/ml) и высокой (10 U/ml) концентрациях препарата. Повышенная резистентность лейкемических клеток пациентов с ОЛЛ к L-аспарагиназе при их совместном культивировании с МСК объясняется компенсаторной функцией стромальных клеток в экспрессии гена аспарагин-синтетазы (ASNS) и повышенной секрецией аспарагина в межклеточную среду [8].

Для лейкемических клеток пациентов с ОЛЛ было также характерно значительное понижение чувствительности к этопозиду при культивировании их на монослое МСК, которое было достоверно выражено на более высоких концентрациях химиопрепарата. Полулетальная концентрация LC50 этопозиды для лимфобластных клеток составила 1,07 мкг/мл без МСК и более 50 мкг/мл в присутствии монослоя стромальных клеток.



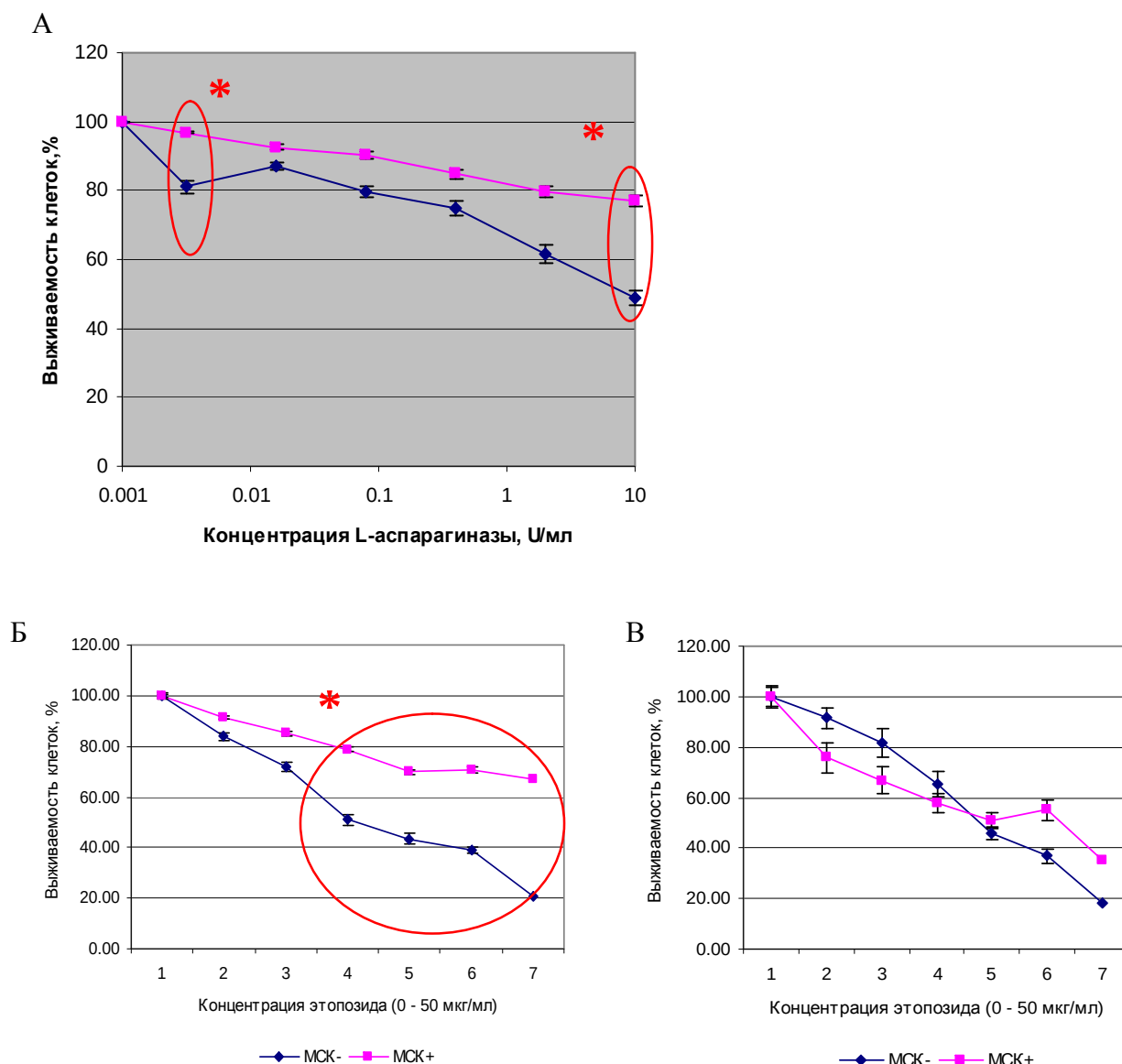


Рисунок 1 - Влияние МСК на чувствительность лейкемических клеток пациентов с ОЛЛ к L-аспарагиназе (А), пациентов с ОЛЛ (Б) и ОМЛ (В) к этопозиду.

Для пациентов с ОМЛ влияния МСК на чувствительность лейкемических клеток выявлено не было. Это связано с тем, что бластные клетки при ОМЛ, в отличие от ОЛЛ, значительно более резистентны к действию химиопрепаратов, в том числе к этопозиду.

**Заключение.**

Воздействие МСК, как элемента микроокружения костного мозга, на лейкемические клеточные линии различного происхождения и бластные клетки пациентов с острым лейкозом проявлялись в повышении резистентности клеток лимфобластоидных линий Raji и Nalm-6, а также

лейкемических клеток пациентов с ОЛЛ к химиопрепаратам. Протективный эффект МСК на клетки миелоидной линии К562 и бластные клетки пациентов с ОМЛ отсутствовал.

## Литература

1. Ravindranath Y. Recent advances in pediatric lymphoblastic and myeloid leukemia // *Curr Opin Oncol.*- 2003.- V. 15. – P.23-35.
2. Shain K., Dalton W. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR // *Mol Cancer Ther.*- 2001. – V. 1(1). – P 69-78.
3. Hazlehurst L., Landowski T., Dalton W. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death // *Oncogene.*- 2003. – V. 22(47). – P. 7396-702.
4. Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease // *Br J Haematol.*-2007. - V. 137(2). -P.87-98.
5. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., Ljungman P, Lonnies H, Nava S, Ringden O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells // *Leukemia.*- 2007. –V. 21(8). - P.1733-1738.
6. Konopleva M., Tabe Y., Zeng Z., Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. // *Drug Resist Updat* - 2009.- V.12(4-5). –P. 103-13.
7. Nefedova Y., Landowski T. , Dalton W. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms // *Leukemia.* – 2003. –V. 17. – P. 1175–1182.
8. Iwamoto S., Mihara K., Downing J., Pui C., Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase // *J Clin Invest.*- 2007. – V. 117(4). – P. 1049-1057.
9. Nilsson S., Johnston H., Coverdale J. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches // *Blood* .- 2001. - V. 97(8). – P. 2293-2299.
10. Bendall L., Makrynikola V., Hutchinson A., Bianchi A., Bradstock K., Gottlieb D. Stem cell factor enhances the adhesion of AML cells to fibronectin and augments fibronectin-mediated antiapoptotic and proliferative signals // *Leukemia.* – 1998. –V. 12(9). – P. 1375-1382.
11. Matsunaga T., Takemoto N., Sato T. et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia // *Nat Med.*-2003. – V. 9(9). – P. 1158-1165.

# ПЕРСПЕКТИВЫ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ

*Углова Т.А.*

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

Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), прежде называемая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, – одно из наиболее часто встречающихся и легко распознаваемых гематологических заболеваний как у детей, так и у взрослых, характеризующееся низким уровнем тромбоцитов и кровотечениями вследствие преждевременной деструкции тромбоцитов или уменьшенной их продукции или комбинации обоих механизмов. Частота ИТП сравнима с острой лейкемией и составляет 3 – 10 на 100 000 детского населения в год. Успехи детской лейкологии берут начало из солидного запаса медицинских знаний и научных исследований. Информации такого рода явно недостаточно для ИТП.

Несмотря на то, что ИТП впервые была описана еще в XVIII веке, многие вопросы остаются спорными и недостаточно изученными. Высокая частота спонтанных ремиссий у детей при этом заболевании, стоимость лечения, возможные побочные осложнения терапии и риск возможных угрожающих жизни кровотечений, который существует до тех пор, пока число тромбоцитов остается ниже  $20 \cdot 10^9$ /л., обуславливают необходимость тщательного анализа данных и строгих клинических испытаний в этой области детской гематологии. В последнее десятилетие, к тому же, отмечается отчетливая тенденция к росту хронического течения заболевания (ХИТП), существенно нарушающего качество жизни не только ребенка, но и всей его семьи. Ежегодно в мире регистрируется 5,8 – 6,6 случаев ХИТП на 100 000 населения [1]. По самым приблизительным подсчетам, в нашей стране насчитывается более 1500 детей с ХИТП. Практический опыт показал, что терапевтическая тактика у больных детей с de novo ИТП при первично

хроническом течении (ПХИТП) должна быть иной, чем у детей с острыми формами заболевания (ОИТП).

Нет «золотого стандарта» в диагностике ИТП, это диагноз исключения. Пациенты с ИТП имеют, как правило, изолированную тромбоцитопению в мазке крови (уровень тромбоцитов менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ ), нормальную плазменную коагуляцию. Семейный анамнез – ключ к диагностике редких типов наследственной тромбоцитопении типа Бернара-Сулье (Bernard Soulier syndrome) или синдрома Вискотта – Олдрича (Wiskott-Aldrich syndrome) и др. Полный анамнез важен для исключения лекарственной тромбоцитопении (прием гепарина, хинина, триметоприм/сульфаметоксазола, ранитидина, противосудорожных препаратов, биодобавок и др.) и вакцининдуцированной ИТП. Если для этого есть основания, обследование должно быть нацелено на исключение вторичных форм иммунной тромбоцитопении, связанной с инфекцией (гепатит С, синдром приобретенного иммунодефицита, первичный иммунодефицит, хеликобактериальная инфекция), аутоиммунными заболеваниями (системные заболевания соединительной ткани, антифосфолипидный синдром), а также злокачественными заболеваниями (лейкоз, миелодиспластический синдром, апластические анемии и др.). У больных с уровнем тромбоцитов более  $50 \times 10^9/\text{л}$  диагноз ИТП устанавливается случайно. У пациентов с уровнем тромбоцитов менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  имеет место геморрагический синдром той или иной степени выраженности. Пациенты с уровнем тромбоцитов менее  $10 \times 10^9/\text{л}$  имеют высокий риск развития тяжелых кровотечений в жизненно важные органы. Однако в настоящее время не существует эффективных методик прогнозирования риска тяжелых кровотечений у больных с ИТП. Некоторые пациенты с уровнем тромбоцитов менее  $10 \times 10^9/\text{л}$  не имеют геморрагического синдрома даже минимальной степени выраженности, в то время как другие имеют выраженный геморрагический синдром и даже угрожающие жизни кровотечения при более высоком уровне тромбоцитов. Т.к. уровень тромбоцитов точно не предсказывает риск и тяжесть

кровотечений у пациента с ИТП, перед врачом всегда встает главный вопрос – когда начать терапию, особенно у пациентов с тяжелой тромбоцитопенией без геморрагического синдрома. Традиционно деструкция тромбоцитов вследствие связывания с аутоантителами или иммунными комплексами признается первичным патогенетическим механизмом ИТП. Однако при ХИТП ускоренная периферическая деструкция тромбоцитов не единственный патогенетический механизм. Неэффективный тромбоцитопоез – другое важное патогенетическое звено. Показано, что антитромбоцитарные аутоантитела ингибируют рост и созревание мегакариоцитов, а также способствуют их апоптозу [2]. Тромбопоэтин (ТРО) – гуморальный регулятор продукции тромбоцитов [3]. Эндогенный ТРО, синтезируемый преимущественно в печени, активизирует определенные тромбопоэтиновые рецепторы на мембране мегакариоцитов и вызывает эндоплазматическую передачу сигналов для продукции тромбоцитов. Уровни эндогенного ТРО в сыворотке крови у пациентов с нарушениями костномозгового кроветворения (апластическая анемия, амегакариоцитарная тромбоцитопения) значительно увеличены. Однако у пациентов с ИТП, подобно как и с тромботической тромбоцитопенической пурпурой и гемолитико-уремическим синдром, уровень ТРО нормальный или неадекватно незначительно увеличен по причинам, которые остаются неясными [4]. Этот факт обусловил клинические испытания рекомбинантных форм ТРО при ИТП, которые, однако, не оправдали возлагаемых на них надежд, т.к. у здоровых добровольцев на введение этих препаратов вырабатывались аутоантитела, и развивалась тромбоцитопения [5]. Дальнейшие научные изыскания привели к разработке тромбопоэтиновых миметиков или агонистов, которые структурно не подобны с ТРО и не вызывают формирования аутоантител – ромиплостим и эльтромбопаг. Эльтромбопаг – маленькая непептидная молекула, связывается с трансмембранным регионом тромбопоэтинового рецептора и активизирует внутриклеточные JAK2/STAT и MAP-киназные сигнальные пути,

активизируя тромбоцитопоз. Ромиплостим, связываясь с тромбопоэтиновым рецептором, активизирует эти же пути [6].

В терапии ХИТП могут использоваться 3 стратегии, основанные на патогенетических механизмах заболевания: (1) увеличение продукции тромбоцитов за счет стимуляции тромбоцитопоза, (2) увеличение средней продолжительности жизни тромбоцитов за счет снижения фагоцитоза тромбоцитов макрофагами, (3) блокировка продукции аутоантител иммуносупрессией. Больные с ХИТП и уровнем тромбоцитов более  $50 \times 10^9$  /л должны только наблюдаться. Для пациентов с уровнем тромбоцитов  $20-50 \times 10^9$  /л решение о терапии должно быть индивидуально с учетом социальных условий, двигательной активности, сопутствующих заболеваний и сопутствующего лечения. Пациентам с тяжелым геморрагическим синдромом в анамнезе и уровнем тромбоцитов  $20-50 \times 10^9$  /л или уровнем тромбоцитов менее  $20 \times 10^9$  /л показано специфическое лечение.

Глюкокортикостероиды обладают не только иммуносупрессивным действием, но и стимулируют тромбоцитопоз [7,8]. У 60% пациентов отмечается быстрый эффект, но только у 10 % уровень тромбоцитов более  $50 \times 10^9$  /л сохраняется более 3 месяцев [9]. Подоптимальные уровни тромбопоэтина у пациентов с ХИТП являются обоснованием стимуляции мегакариоцитопоза. Эффективность и безопасность эльтромбопага были оценены и доказаны у пациентов с ХИТП, у которых зафиксирована неэффективность первой и второй линии терапии или которым была противопоказана спленэктомия, в мультицентровых рандомизированных контролируемых клинических исследованиях TRA102537, TRA100773, TRA108057, TRA105325. В настоящее время подобные исследования проводятся у детей в возрасте 1-18 лет. Результаты клинических исследований применения эльтромбопага у пациентов с ИТП ободряют: у 87% пациентов с ХИТП и инициальным уровнем тромбоцитов менее  $30 \times 10^9$  /л отмечался положительный эффект через 1-3 недели терапии эльтромбопагом [10, 11, 12]. Стартовая доза эльтромбопага 50 мг/сут.

однократно ежедневно за 1-2 часа до еды или 4 часа после приема молочных продуктов, антацидов или добавок, которые содержат поливалентные катионы, типа кальция, магния и алюминия. При неэффективности стартовой дозы в течение 2 недель, доза повышается до 75 мг/сут., не более. При неэффективности последующей дозы в течение 4 недель – терапия эльтромбопагом отменяется. Уровень тромбоцитов контролируется еженедельно, пока не будет достигнут устойчивый уровень тромбоцитов более  $50 \times 10^9$ /л в течение 4 недель, затем 1 раз в месяц.

При уровне тромбоцитов более  $50 \times 10^9$ /л, но менее  $150 \times 10^9$ /л рекомендуется уменьшить ежедневную дозу до поддерживающей устойчивый уровень тромбоцитов более  $50 \times 10^9$ /л. При уровне тромбоцитов более  $250 \times 10^9$ /л терапия отменяется, количество тромбоцитов контролируется 2 раза в неделю и при уровне менее  $100 \times 10^9$ /л терапия возобновляется в суточной дозе, уменьшенной на 25 мг. После отмены терапии эльтромбопагом, как правило, количество тромбоцитов снижается до первоначального уровня в течение 2 недель, т.е. требуется непрерывное лечение минимальными дозами. Следует помнить, что монотерапия эльтромбопагом не может использоваться для неотложной терапии при urgentных состояниях, для остановки кровотечения. Отсутствуют данные о долгосрочных результатах применения этого препарата, значение ретикулинового накопления в костном мозге неясно [13]. По мере появления результатов клинических исследований и опыта клинического применения эльтромбопага с выяснением непосредственных и отдаленных эффектов значимость его в современных алгоритмах лечения ИТП будет возрастать.

## **Литература**

1. Zeller B., Rajantie J., Hedlund-Treutiger I at al. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease// *Acta Paediatr.*-2005.-V. 94. – P.178-184.
2. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP//*Blood.*- 2004. – V. 103(4). – P. 1364–1369.

3. Rojnuckarin P, Drachman J.G, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis// *Blood*.- 1999. – V. 94(4). – P.1273–1282 .
4. Kuter D.J and Gernsheimer T.B Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia// *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2009. – V. 23. –P.1193–1211.
5. Li J.Z, Yang C, Xia Y.P, et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin// *Blood*. - 2001- V. 98(12). - P.3241–3248.
6. Kuter D., Begley C. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies// *Blood*. - 2002.- V.100. – P .3457–3469.
7. Gernsheimer T., Stratton J., Ballem P.J, et al. Mechanisms of response to treatment in autoimmune thrombocytopenic purpura //N. Engl. J. Med .- 1989. – V.320. –P.974–980
8. Houwerzijl E.J, Louwes H, Sluiter W., et al. Platelet production rate predicts the response to prednisone therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura// *Ann. Hematol* .- 2008. – V.87. - P.975–983.
9. George J.N, Vesely S.K. How can we provide the best care for our patients with immune thrombocytopenic pupura? //Mayo Clin. Proc .- 2004.- V. 79(4). – P.456–457.
10. Bussel J.B, Provan D, Shamsi T et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial//*Lancet*.- 2009. – V.373. – P.641–648.
11. Bussel J.B., Cheng G., Kovaleva L. et al. Long-Term Safety and Efficacy of Oral Eltrombopag for the Treatment of Subjects with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP): Preliminary Data from the EXTEND Study *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2007. 11011566.
12. Cheng G, Saleh M.N, Marcher C. et al.Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomized, phase 3 study//*Lancet*.-2011.- V.377.- P.393–402.
13. Mansoor N, Saleh J.B.B, Meyer Oliver, Frederiksen Henrik, Johnni Diane, Aivado Manuel, Brainsky Andres. Results of bone marrow examinations in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura treated with eltrombopag paper presented at: 51st ASH Annual MeetingDecember 5, 2009; Hall E (Ernest N. Morial Convention Center).

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

**Фёдорова А.С., Мовчан Л.В., Белевцев М.В.**

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Иммунофенотипирование опухолевых клеток при неходжкинских лимфомах (НХЛ) является обязательным исследованием для верификации



диагноза в соответствии с классификацией ВОЗ [1] и может проводиться методами проточной цитофлуориметрии или иммуногистохимии, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Иммунофенотипирование НХЛ методом проточной цитометрии давно и эффективно применяется в клинической практике [2-3]. Исследование проводится на взвеси лимфомных клеток, полученных из ткани опухоли или биологической жидкости. Преимущества метода заключаются в быстроте получения результата, возможности использования расширенной панели моноклональных антител и анализа большого количества клеток. Каждый вариант НХЛ характеризуется определенным фенотипом. Клетки с опухолеассоциированным фенотипом, не встречающимся на нормальных лимфоидных клетках, могут быть также определены иммунофенотипически в крови или в морфологически не пораженном костном мозге (КМ) при диагностике (определение т.н. минимальной диссеминированной болезни) или на этапах химиотерапии (минимальная остаточная болезнь) [4].

Оценка результатов экспрессии моноклональных антител на опухолевых клетках позволит получить их иммунофенотипический профиль и обосновать целесообразность и эффективность селективного использования метода проточной цитометрии для диагностики и оценки эффективности лечения при различных вариантах НХЛ.

*Материалы и методы.* Материалом для исследования являлся пунктат КМ, образец плевральной (ПЖ), перикардальной (ПрЖ) или асцитической жидкости (АЖ), лимфоузла (ЛУ) или ткани при наличии в них опухолевых клеток. Иммунофенотипирование выполняли методом ПЦФ с использованием панели моноклональных антител (“BectonDickinson”, США), выявляющих поверхностные (CD45, CD14, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD10, CD34, HLA-DR, mIgM, kappa/CD19, lamda/CD19) и внутриклеточные (cyIgM, MPO, TdT, CD79a) маркеры. Результаты учитывали на аппарате FC 500 FACScan фирмы Becton Coulter с

помощью программы СХР, регистрируя процент позитивных клеток по каждому маркеру (положительный результат – более 20%).

*Результаты.* Проведено иммунофенотипирование методом 3-цветной проточной цитофлуориметрии 136 образцов опухолевых клеток морфологически подтвержденных НХЛ у детей, подростков и молодых взрослых за период с 1997 по июль 2012 гг., находившихся на лечении в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. Из них во всех 7 случаях анапластической крупноклеточной лимфомы (АККЛ) исследование с использованием стандартной описанной выше панели не было результативным, и эти случаи были исключены из последующего анализа. Опухольассоциированный иммунофенотип был установлен в 129 (94,9%) случаях (109 – первичных, 20 – при прогрессировании или рецидиве, из них 7 – парных случаев.). Распределение случаев проведенного анализа в зависимости от использованного для исследования материала и нозологической формы представлены в таблице 1.

Таблица 1- Распределение случаев в зависимости от материала для исследования и нозологической формы

| Материал/<br>Вариант НХЛ | АЖ        | ПЖ        | ПрЖ     | КМ        | ЛУ        | Опухоль   | Всего,<br>n (%) |
|--------------------------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| ЛБ                       | 20        | 6         |         | 5         | 16        | 13        | 60 (46,5)       |
| ДВККЛ                    |           |           |         |           | 1         | 2         | 3 (2,3)         |
| ПМВККЛ                   |           |           |         |           |           | 2         | 2 (1,6)         |
| В-ОЛЛ                    | 1         |           |         | 23        |           | 1         | 25 (19,4)       |
| ЛЛ                       |           | 10        | 2       | 5         | 17        | 4         | 38 (29,5)       |
| ПТКЛ                     |           |           | 1       |           |           |           | 1 (0,8)         |
| Всего, n(%)              | 21 (16,3) | 16 (12,4) | 3 (2,3) | 33 (25,6) | 34 (26,4) | 22 (17,1) | 129 (100)       |

Наиболее частым материалом для исследования были ЛУ (26,4%) и КМ (25,6%). Чаще других диагностировалась лимфома Беркитта (ЛБ) (46,5%).

Из вошедших в анализ случаев преобладали опухоли с В-линейным фенотипом (94/129 (72,9%)), из них зрелый В-фенотип был определен в 89/94 (94,7%) (ЛБ – 59, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – 3, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (ПМВККЛ) – 2, В-зрелый острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) - 25). Незрелый В-линейный фенотип был установлен в 5/94 (5,3%) случаях: В-лимфобластная лимфома

(В-ЛЛ) – 4, ЛБ (прогрессирование) – 1). Лимфомы с Т-клеточным иммунофенотипом составили 35/129 (27,1%) от всех НХЛ: зрелый Т-иммунофенотип был установлен в 4/35 (11,4%) случаях (Т-лимфобластная лимфома (Т-ЛЛ) – 3, периферическая Т-клеточная лимфома (ПТКЛ), не специфицированная – 1), незрелый Т-иммунофенотип – в 31/35 (88,6%) случаях Т-ЛЛ.

Результаты исследования экспрессии основных маркеров опухолевыми клетками при различных вариантах НХЛ представлены в таблице 2.

Таблица 2- Частота выявления основных маркеров при различных вариантах НХЛ у детей

| Антиген      | Т-ЛЛ<br>n, %  | В-ЛЛ<br>n, % | ЛБ<br>n, %    | В-ОЛЛ<br>n, % | ДВККЛ<br>n, % |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| CD1a+        | 21/29 (72,4%) | 0/2          | 1/36 (2,8%)   | 0/19          | 0/2           |
| CD2+         | 32/35 (91,4%) | 1/4          | 4/55 (7,3%)   | 1/23 (4,3%)   | 0/3           |
| CD3+         | 20/34 (58,8%) | 0/4          | 1/57 (1,8%)   | 0/23          | 0/3           |
| CD5+         | 33/34 (97,1%) | 1/4          | 4/55 (7,3%)   | 0/24          | 1/3           |
| CD7+         | 34/34 (100%)  | 1/4          | 2/51 (3,9%)   | 2/21 (9,5%)   | 0/3           |
| CD4+CD8-     | 5/35 (14,3%)  | 0/4          | 2/57 (3,5%)   | 0/22          | 0/3           |
| CD4-CD8+     | 16/34 (47,1%) | 0/4          | 2/56 (3,6%)   | 0/22          | 0/3           |
| CD4+CD8+     | 19/33 (57,6%) | 0/4          | 0/57          | 0/22          | 0/3           |
| CD10+        | 12/32 (37,5%) | 3/4          | 41/60 (68,3%) | 17/23 (73,9%) | 1/3           |
| CD19+        | 1/34 (2,9%)   | 4/4          | 55/55 (100%)  | 24/24 (100%)  | 3/3           |
| CD20+        | 0/31          | 3/4          | 58/59 (98,3%) | 25/25 (100%)  | 3/3           |
| CD22+        | 0/31          | 3/4          | 51/54 (94,4%) | 23/24 (95,8%) | 2/2           |
| cyIgM+       | 0/8           | 1/2          | 6/10 (60,0%)  | 11/13 (84,6%) | --            |
| sIgM+        | 0/29          | 0/4          | 51/57 (89,5%) | 25/25 (100%)  | 1/3           |
| CD19+ kappa  | 0/26          | 0/4          | 24/55 (43,6%) | 6/21 (28,6%)  | 2/2           |
| CD19+ lambda | 0/26          | 0/4          | 31/55 (56,4%) | 15/21 (71,4%) | 0/2           |
| CD79a+       | 1/8 (12,5)    | 2/2          | 11/11 (100%)  | 12/13 (92,3%) | --            |
| CD13+        | 1/18 (5,6%)   | 0/2          | 4/30 (13,3%)  | 2/22 (9,1%)   | 0/2           |
| CD33+        | 2/22 (9,1%)   | 1/2          | 1/29 (3,4%)   | 0/25          | 0/2           |
| CD15+        | 0/13          | 0/1          | 1/21 (4,8%)   | 0/21          | 0/2           |
| CD11c/v+     | 1/19 (5,3%)   | 1/3          | 2/29 (6,9%)   | 0/20          | 0/2           |
| CD45+        | 31/31 (100%)  | 3/4          | 53/55 (96,4%) | 21/23 (91,3%) | 2/2           |
| CD14+        | 0/7           | 0/2          | 2/22 (9,0%)   | 2/23 (8,7%)   | --            |
| TdT          | 7/11 (63,6%)  | 1/2          | 0/15          | 0/13          | --            |
| CD34+        | 5/32 (15,6%)  | 3/4          | 1/56 (1,8%)   | 0/25          | 0/3           |
| HLA-DR+      | 3/29 (10,3%)  | 4/4          | 3/60 (5,0%)   | 23/23 (100%)  | 3/3           |

n – число позитивных/исследованных случаев

В группе ЛЛ в соответствии с классификацией EGIL-95 выделяли 4 подтипа Т-линейных и 3 подтипа В-линейных ЛЛ, различающихся по

степени дифференцировки [5]. Проведено иммунофенотипирование 38 опухолевых образцов у 31 пациента (30 – первичных, 8 – при рецидиве, из них 6 – парных случаев (у одного больного рецидив 1 и 2)). Преобладали случаи с Т-линейным фенотипом (26/30 (86,7%) первичных образцов): про-Т – 2 (7,7%) случаев, пре-Т – 4 (15,4%), кортикальный Т– 16 (61,5%); зрелый Т – в 3 (11,5%); в 1 случае (3,8%) степень дифференцировки не была уточнена из-за недостаточного количества клеток для постановки широкой панели моноклональных антител. В-ЛЛ была диагностирована у 4/30 (13,3%) первичных пациентов: про-В –1, common-В – 2, пре-В –1. При анализе парных случаев у 3 пациентов с Т-ЛЛ фенотип лимфобластов в дебюте и при рецидиве заболевания был идентичен (кортикальный Т), а у 3 пациентов (в 1 случае – рецидив 1 и 2) фенотип изменился на более ранний вариант (кортикальный Т --> пре-Т). За исключением случаев с Т-зрелым фенотипом для этой группы пациентов проточная цитометрия является не только высокоэффективным диагностическим методом, но и методом выбора для анализа минимальной болезни.

Было проведено иммунофенотипирование 60 образцов опухолевых клеток пациентов с ЛБ (53 - первичных, 7 – при прогрессировании или рецидиве). В 59 (98,3%) случаях был выявлен фенотип зрелых В-лимфобластов, из которых в 6 случаях (10,2%) ЛБ опухолевые клетки не экспрессировали тяжелую цепь (?) sIgM (во всех случаях выявлена моноклональная экспрессия легких цепей Ig). В 1 образце была выявлена экспрессия ?- цепи sIgG, в 1 – sIgD, в 4 – верификация не проводилась. В одном случае ЛБ при опухолевой прогрессии опухолевые клетки утратили экспрессию CD20 и sIgM (фенотип бластов соответствовал common В-лимфобласту со слабой коэкспрессией 3-х миелоидных маркеров). В подтверждение наличия моноклонального роста исследовалась рестрикция легких цепей (в 55 случаях), в результате популяции клеток с рестрикцией kappa или lambda были примерно одинаковыми: в 24/55 (43,6%) выделенная

популяция была представлена клетками CD19+ kappa+ lambda-, в 31/55 (56,4%) - CD19+ kappa- lambda+.

Экспрессия антигена CD10 определена в 41/60 (68,3%) случае ЛБ. Не было выявлено зависимости экспрессии CD10 в зависимости от вида легких цепей sIgM. Экспрессия CD10 была позитивной в 17/37 (45,9%) образцах В-лимфобластов с рестрикцией kappa легких цепей и в 20/37 (54,1%) – lambda легких цепей. Коэкспрессия Т-линейных маркеров при ЛБ выявлялась редко: CD2 – в 4/55 (7,3%), CD3 – в 1/57 (1,8%), CD5 – в 4/55 (7,3%) и CD7 – в 2/47 (4,3%) случаев. Из миелоидных маркеров в дебюте заболевания была выявлена только коэкспрессия CD13 – в 2/28 (7,1%) случаев. При рецидиве заболевания коэкспрессия CD13 была определена в 2 случаях, и по 1 случаю – CD15, CD33 и CD34.

Было проведено иммунофенотипирование 25 образцов КМ у пациентов с В-ОЛЛ (21 – первичных, 4 – при прогрессировании или рецидиве (1 случай парный)). При исследовании рестрикции легких цепей sIgM среди первичных случаев превалировала популяция CD19+ kappa- lambda+ – в 15/21 (71,4%), CD19+ kappa+ lambda- – в 6/21 (28,6%). Экспрессия антигена CD10 опухолевыми клетками определялась у 23 пациентов, из которых в 17 (72,7%) случаях был получен положительный результат. В 4 случаях рецидивных опухолей бласты экспрессировали CD10 антиген, хотя в дебюте заболевания (в 1 случае по данным из выписки) лимфобласты были CD10-негативными. Коэкспрессия CD7 антигена была выявлена в 2/21 (9,5%), коэкспрессия CD13 – так же в 2/21 (9,5%) случаях.

Таким образом, aberrантный иммунофенотип опухолевых клеток, который позволил бы проводить мониторинг остаточных лимфомных клеток иммунологическим методом при ЛБ и В-ОЛЛ может быть определен не более чем в 10-15% случаев.

В 3 случаях ДВККЛ опухолевые клетки характеризовались В-зрелым иммунофенотипом с рестрикцией легких цепей kappa или lambda, экспрессия тяжелых цепей (?) была представлена по 1 случаю sIgM, sIgG и sIgD, что

подтверждает необходимость обязательного исследования рестрикцией легких цепей kappa или lambda при отсутствии экспрессии sIgM при В-линейных лимфомах. Экспрессия антигена CD10 была выявлена в 2/3 (66,7%), коэкспрессия CD5 – в 1 случае.

Типирование опухолевых клеток при АККЛ с использованием стандартной панели является неинформативным, что связано с невысоким процентом бластов в опухолевом материале, а также с вариабельностью экспрессии Т-клеточных маркеров. По литературным данным, определение экспрессии характерных для опухоли антигенов CD30 и CD52 позволяет определить опухолеассоциированный фенотип и эффективно использовать этот метод для определения минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни [6].

*Закключение.* Таким образом, иммунофенотипирование можно считать высокоэффективным методом диагностики НХЛ у детей, который в ряде случаев позволяет быстро решить принципиальную задачу о выборе программы лечения и безотлагательном его начале, а также оказать помощь в постановке морфологического диагноза благодаря использованию широкой панели диагностических моноклональных антител, которая не может быть воспроизведена при иммуногистохимическом анализе.

В большинстве случаев ЛЛ и в некоторых случаях В-зрелых лимфом типирование методом проточной цитометрии позволяет определить aberrантный фенотип опухолевых клеток, что делает возможным применение данного метода для определения минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни при НХЛ у детей.

## Литература

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* // IARC Pres, Lyon, France, 4<sup>th</sup> edition, 2008. – P. 312-316.
2. Goergen M.H. *Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies* // *Lab Med.* – 2000. – V. 124, №10. – P.1792-1799.

3. Abeer M El-Sayed, Mohammad H El-Borai, Abeer A Bahnassy et al. Flow cytometric immunophenotyping (FCI) of lymphoma: correlation with histopathology and immunohistochemistry // *Diagnostic Pathology*. – 2008. – V. 43. – P. 1186-90.
4. Coustan-Smith E., Sandlund J.T., Perkins S.L., et al. Minimal disseminated disease in childhood T-cell lymphoblastic lymphoma: a report from the Children's Oncology Group // *J Clin Oncol*. – 2009. – V. 27, №21. – P. 3533-9.
5. Bene M.S., Castoldi G., Knapp W., et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) // *Leukemia*. – 1995. – V. 9, №10. – P. 1783-6.
6. Damm-Welk C., Schieferstein J., Schwalm S., et al. Flow cytometric detection of circulating tumour cells in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma: comparison with quantitative polymerase chain reaction // *Br J Haemat.* – 2007. – V. 138, №4. – P. 459-66.

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА У ДЕТЕЙ

**Фёдорова А.С., Соколова Н.А., Юцкевич Р.И.**

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Лимфома Беркитта (ЛБ) у детей характеризуется высокой частотой хромосомных нарушений [1-2]. Патогенетическими для ЛБ являются транслокации с вовлечением локуса протоонкогена *C-MYC* (8q24), который в большинстве случаев (80%) транслоцируется к локусу гена тяжелой цепи Ig [t(8;14)(q24;q32)], реже – к одной из легких цепей карпа [t(2;8)(p12;q24)] или lambda [t(8;22)(q24;q11)] в 15 и 5% случаев соответственно [1-2]. Хромосомные повреждения приводят к дизрегуляции с повышением уровня экспрессии гена *C-MYC*, который в норме играет существенную роль в контроле клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Нарушения часто носят комплексный характер. Некоторые вторичные хромосомные aberrации, вовлекающие участок 13q32, а также dup(1)(q12-32) и полное или частичное удвоение 7q могут иметь неблагоприятное прогностическое значение [3-6]. Однако, ввиду небольшого числа пациентов

в приведенных работах необходимы дальнейшие исследования для оценки прогностической значимости хромосомных нарушений.

Целью работы являлся анализ результатов исследований кариотипа клеток ЛБ у детей по данным лаборатории цитогенетических исследований Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии за период 1998-2012 гг.

*Материалы и методы.* Молекулярно-генетические исследования проведены у 49 пациентов с ЛБ и с В-зрелым острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ). Материал был забран у 45 больных при первичной диагностике и у 4 – при прогрессировании или рецидиве (1 парный случай). Материалом для исследований являлись: ткань опухоли – 6 (12,2%), лимфоузел – 9 (18,4%), КМ – 25 (51,0%), плевральная жидкость – 3 (6,1%), асцитическая жидкость – 6 (12,2%).

Проведено кариотипирование опухолевых клеток методом дифференциального окрашивания (G-banding) по стандартной методике у 24 пациентов с ЛБ и у 20 – с В-ОЛЛ [7]. При отсутствии в опухолевых клетках метафазных пластинок хорошего качества, а также для подтверждения наличия или отсутствия реаранжировки гена *C-MYC* использовали метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Анализ проводился на стеклах с нативным клеточным материалом согласно инструкции производителя зондов ([www.DakoCytomation.com](http://www.DakoCytomation.com) и [www.abbotmolecular.com](http://www.abbotmolecular.com)) с незначительными модификациями. Использовались локуспецифические зонды фирмы Abbott Vysis и DAKO для определения реаранжировки гена *C-MYC* (*MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe*) (проведено 20 исследований), *del(13q)* (*LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange/ LSI 13q34 SpectrumGreen Probe*) (2 исследования), *dup(1q)* (*1p36/LSI 1q25 and LSI 19q13/19p13 Dual-Color Probe*) (2 исследования), и трисомии по 7 хромосоме (*D7S522 (7q31) SpectrumOrange /CEP 7 SpectrumGreen Probe*) (1 исследование с положительным результатом). Анализ окрашенных хромосомных



препаратов выполняется с использованием световых микроскопов Olympus (фирмы Olympus), Leica (фирмы Leica).

*Результаты.* Результаты кариотипирования пациентов с ЛБ и В-ОЛЛ представлены в таблице 1.

Таблица 1- Частота выявления хромосомных нарушений при лимфоме Беркитта у детей

| Морф.вариант/<br>Перестройка кариотипа | ЛБ            | В-ОЛЛ         | Всего         |
|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Есть реар. 8q24:                       | 23/27 (85,2%) | 19/22 (86,4%) | 42/49 (85,7%) |
| t(8;14)                                | 16/27 (59,3%) | 16/22 (72,7%) | 32/49 (65,3%) |
| t(8;22)                                | 5/27 (18,5%)  | 2/22 (9,1%)   | 7/49 (14,3%)  |
| не устан.                              | 2/27 (7,4)    | 1/22 (4,5%)   | 3/49 (6,1%)   |
| Нет реар. 8q24                         | 4/27 (14,8%)  | 3/22 (13,6%)  | 7/49 (14,3%)  |
| del(13)(q14q32)                        | 1/25 (4,0%)   | 2/20 (10,0%)  | 3/47 (6,4%)   |
| dup(13)(q14q32)                        | 3/23 (13,0%)  | 0/20          | 3/47 (6,4%)   |
| dup(1q21)                              | 3/24 (12,5%)  | 5/20 (25,0%)  | 8/47 (17,0%)  |
| gain7q31                               | 6/24 (23,1%)  | 1/20 (5,0%)   | 7/47 (14,9%)  |
| del(6q)                                | 4/23 (17,4%)  | 0/20          | 4/43 (9,3%)   |
| -17                                    | 1/23 (4,3%)   | 2/20 (10,0%)  | 3/43 (7,0%)   |
| анэуплоидия                            | 8/23 (34,8%)  | 4/20 (20,0%)  | 12/43 (27,9%) |
| Комплексные нарушения                  | 10/24 (41,7%) | 7/20 (35,0%)  | 17/44 (38,6%) |

Хромосомные нарушения были выявлены в 100% случаев. Рearанжировки с вовлечением *C-MYC* гена хотя бы одним из методов выявлены у 85,7% пациентов. У больных с В-ОЛЛ несколько чаще определялась t(8;14)(q24;q32), чем вариантная t(8;22)(q24;q11) в сравнении с пациентами с ЛБ (72,7% против 59,3%). Транслокация t(2;8)(p12;q24) ни в одном случае выявлена не была. Рearанжировка 8q24 была единственной хромосомной аберрацией у 10/44 (22,7%) пациентов. Комплексные нарушения кариотипа (2 и более аберрации кроме реаранжировки гена *C-MYC*) выявлены более чем у трети больных (в 38,6% случаев). Анэуплоидия

наблюдалась в 27,9% случаев, причем во всех случаях нарушения носили комплексный характер.

Вторичные хромосомные нарушения выявлены в 31/45 (68,9%) случаях, из которых наиболее частыми были *dup(1)(q21q25)* – в 8 (17,0%) случаях, *dup7q31* или полное удвоение 7 хромосомы – в 7 (14,9%), реаранжировка *13q14* – в 6 (12,8%) (по 3 случая дупликации и делеции *13(q14q32)*). Делеция *6q21* выявлена у 4 (9,3%) пациентов, в том числе у 2 – без перестройки гена *C-MYC*. У 3 больных выявлена моносомия 17 хромосомы.

В соответствии с классификацией ВОЗ лимфоидных неоплазий 2008 г. лейкоз Беркитта – клинический вариант лимфомы Беркитта и не является самостоятельной нозологической категорией [8]. Однако, по всей видимости, В-ОЛЛ у детей имеет более широкое понятие. В 2 из 3 *C-MYC*-негативных случаев выявлена абберрация с вовлечением *MLL*-гена, не характерная для клеток Беркитта.

Во всех случаях прогрессирования или рецидива кариотип характеризовался как числовыми, так и структурными комплексными нарушениями. В 2 из 4 случаев ЛБ с возвратом заболевания была выявлена *dup(13)(q14q32)*. В 2 наблюдаемых случаях В-ОЛЛ, у которых впоследствии развился рецидив, выявлена моносомия 17.

Заключение. Нарушения кариотипа при ЛБ у детей выявляются всегда и часто носят комплексный характер. Большое количество вторичных хромосомных абберраций не позволяет однозначно говорить об их прогностической значимости и требует дальнейшего изучения.

## Литература

1. Hecht J., Aster J. *Molecular biology of Burkitt's lymphoma* // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – V. 18 (6). – P. 3707–3721.
2. Toujanis S., Dessen P., Ithzar N., et al. *High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma* // *PLoS ONE*. – 2009. Vol.4 (9). – P. 1-14.

3. Garcia J., et al. Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study // *Leukemia*. – 2003. – V. 17 (7). – P. 2016–2024.
4. Lones M., et al. Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08 // *Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2004. – V. 26 (2). – P. 169–178.
5. Poirel H.A., Cairo M.S., Heerema N.A., et al. Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Results of the FAB/LMB96 international study // *Leukemia*. – 2009. – V. 23 (2). –P. 323–331.
6. Nelson M., Perkins S.L., Dave B.J., et al. An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from thep. 600–610.
7. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. *Human Cytogenetics: a practical approach // Laboratory manuals*, Oxford University Press, 287 p. –1992. – V.1. –P. 1-17.
8. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues // IARC Pres, Lyon, France, 4<sup>th</sup> edition, 2008.* – P. 312-316.

## **ГЕПАТОБЛАСТОМА У ДЕТЕЙ, ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ**

***А.Т. Шиманский, Р.С. Исмаил-заде, А.Н. Никифоров,***

***Д.В. Кочубинский, Г.И. Закревский***

Республиканский научно - практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Первичные злокачественные опухоли печени у детей встречаются редко и составляют в структуре онкологической заболеваемости около 1–3% . Данные опухоли относятся к нозологической группе VII, согласно международной классификации детского рака от 2005 г. (VII ICCS), которая включает: гепатобластому (ГБ) (подгруппа VIIa), карциному печени (ГЦР) (подгруппа VIIb), неуточненные злокачественные опухоли печени (подгруппа VIIc) [1,3].

Цель нашего исследования: изучить результаты лечения детей с ГБ и выработать оптимальный подход к диагностике и лечению данной патологии.

*Материалы и метод.* За период 1989–2011 гг. в Республике Беларусь было зарегистрировано 50 детей с ГБ (возраст от 2,5 мес. до 12 лет, медиана – 2 года). Мальчиков было 31, девочек – 19 (соотношение 1,6/1)[2].

Комплексное обследование пациентов включало: клиническое обследование, лабораторную диагностику с определением, помимо общего и биохимического анализов крови, уровня АФП, при необходимости в плане дифференциальной диагностики – раково-эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови, ультразвуковое исследование (УЗИ), компьютерную томографию (КТ), биопсию новообразования. Выполнение биопсии проводилось пункционным методом или с помощью диагностической лапаротомии.

При ГБ в 83% случаев имело место увеличение АФП в сыворотке крови.

Все пациенты в зависимости от размеров и локализации первичной опухоли, а также наличия MTS после постановки морфологического диагноза, были распределены по стадиям. Шестнадцать больных (32%) имели II стадию заболевания, одиннадцать (22%) – III и двадцать три (46%) – IV. Таким образом, из 50 детей с ГБ, 23 (46%) на момент поступления имели неблагоприятный прогноз, связанный с вовлечением в процесс обеих долей печени, либо наличием отдаленных MTS.

У 4 больных гистологическое исследование не выполнялось ввиду отказа от обследования и лечения, диагноз был поставлен на основании клинических и объективных методов обследования.

Морфологический диагноз до начала лечения был подтвержден у 46(100%) пациентов. Эпителиальный тип опухоли наблюдался в 30(65%) случаях, включающий следующие подтипы: фетальный – у 18(39%) больных, эмбриональный – у 3(6.5%), эмбрионально-фетальный – у 4(9%), фетально-эмбриональный – у 1(2%), недифференцированный – у 3(6,5%),

макротрабекулярный – у 1(2%). Смешанный тип ГБ был отмечен у 11(24%) пациентов. В 5(11%) случаях тип и подтип ГБ не был определен.

Все больные по характеристике лечения были разделены на 3 группы: непрограммное лечение (10 пациентов), использование протокола НВ-89 (9) и протокола SIOPEL-3 (27).

Для проведения ПХТ согласно протоколу НВ-89 препаратами выбора являются: ифосфамид – 3 г/м<sup>2</sup>, цисплатин – 100 мг/м<sup>2</sup>, адриамицин – 60 мг/м<sup>2</sup>; согласно протоколу SIOPEL-3: цисплатин – 80 мг/м<sup>2</sup>, доксорубицин – 60 мг/м<sup>2</sup>, карбоплатин – 500 мг/м<sup>2</sup>.

В протоколе SIOPEL – 3 предоперационная ПХТ предусмотрена всем больным за исключением первой стадии, в протоколе НВ – 89, только при нерезектабельности опухоли. Предоперационная ПХТ позволяет значительно уменьшить объем опухоли, определить чувствительность опухоли к терапии и, при необходимости, использовать альтернативные схемы [4,5].

Операции при удалении опухоли выполнялись преимущественно в объеме анатомических резекций. Для расчета выживаемости пациентов с первичными злокачественными опухолями печени использовался метод Kaplan-Meier. Статистическая значимость различий выживаемости в группах оценивалась с использованием log-rank теста. За цензоры принимались следующие события: 0–жив, исчез из - под наблюдения, 1–умер.

*Результаты и обсуждение.* Непосредственный результат лечения оценен у 32(100%) больных. Как свидетельствуют наши данные, ГБ у детей обладает хорошей чувствительностью к ПХТ, включающей препараты доксорубицин и цисплатин. Частичной регрессии опухоли удалось добиться у 25(78%) пациентов. Стабилизация процесса отмечена у 7(22%) детей. На фоне изначального применения ПХТ не у одного больного не отмечалось прогрессирование процесса.

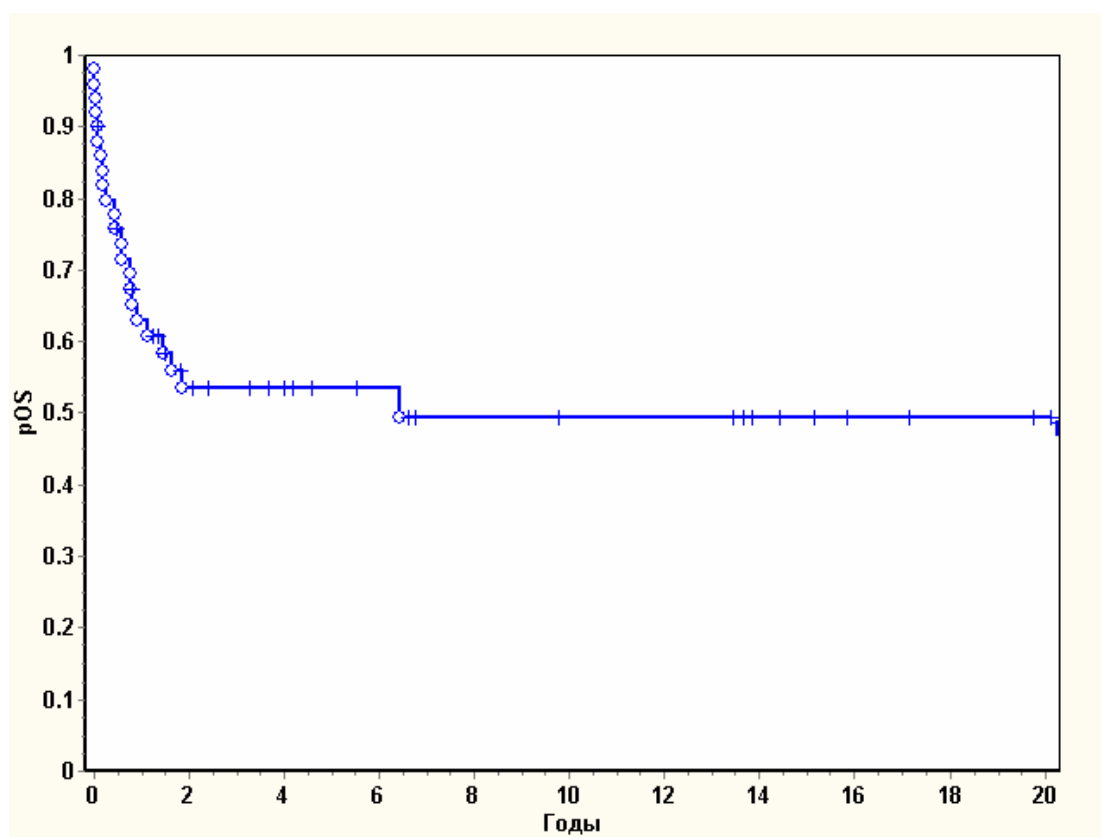
Радикальная операция была выполнена у 31 (62%) пациентов: в объеме расширенной правосторонней гемигепатэктомии - у 2, правосторонней

гемигепатэктомии – у 5, левосторонней гемигепатэктомии – у 2, левосторонней кавальной лобэктомии – у 7, атипичная резекция правой доли печени – у 14 и родственной трансплантации печени – у 1.

Для оценки эффективности ПХТ на гистологическом уровне и для планирования дальнейшего лечения в удаленных опухолях у 28(100%) пациентов проанализирован лекарственный патоморфоз. У 5(18%) он соответствовал - I степени, у 8(29%) -II, у13(46%) - III и у 2(7%) – IV.

У 3 больных с ГБ после радикальных операций возник местный рецидив опухоли, в одном случае у больного с ГБ спустя 1 месяц после операции, во втором спустя 4 месяца и у третьего спустя 4 года.

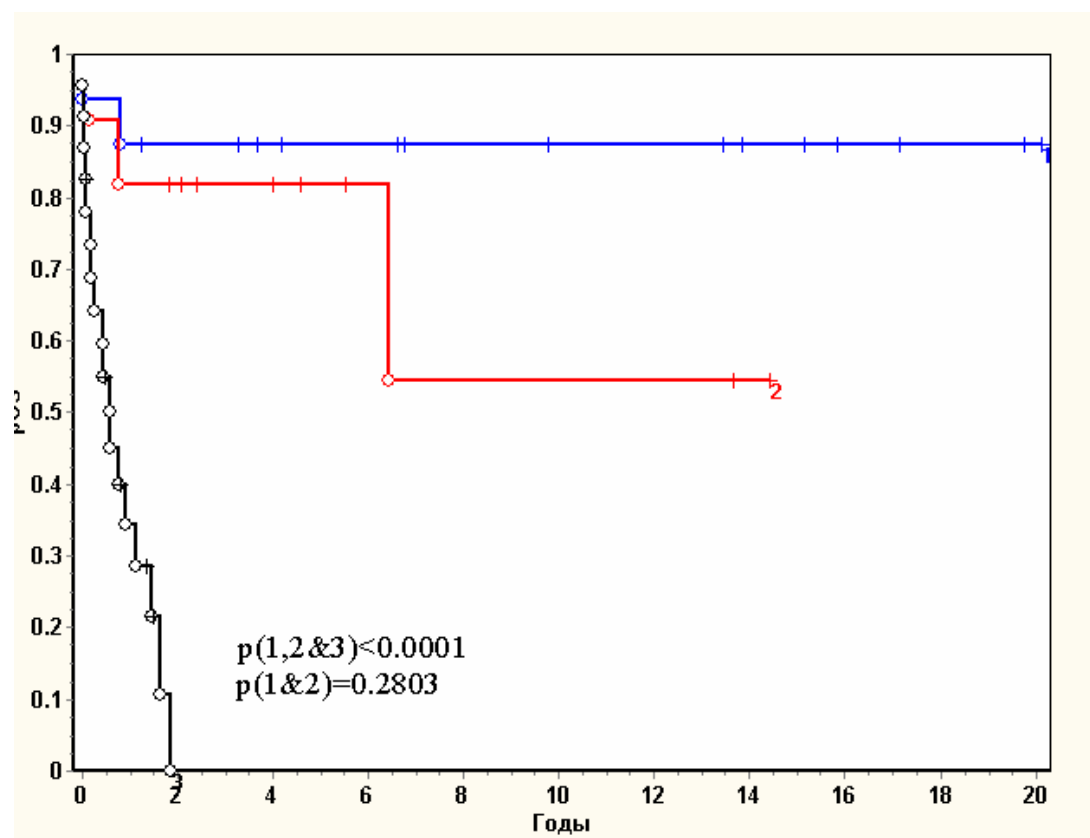
В настоящее время из 50 детей с ГБ, живы 27 (Рис.1).



ГБ, n=50, 27 живы  $[0.49 \pm 0.07]$  MF=18.00

Рисунок 1- Общая выживаемость детей с ГБ

Выживаемость детей с ГБ в зависимости от стадии представлена на рисунке 2.



1. 2-я стадия  $n=16$ , 14 живы  $[0.88 \pm 0.08]$  MF=100.62

2. 3-я стадия  $n=11$ , 8 живы  $[0.55 \pm 0.15]$  MF=38.97

3. 4-я стадия  $n=23$ , 5 живы  $[0.00 \pm 0.00]$  MF=5.43

Рисунок 2 - Общая выживаемость при ГБ в зависимости от стадии.

#### Заключение.

1. При комбинированном лечении ГБ у детей наиболее целесообразно использовать протокол, предусматривающий проведение предоперационной химиотерапии (SIOPEL-3), что позволяет не только повысить резектабельность опухоли за счет уменьшения размеров, но и определить чувствительность ее к химиотерапии, что крайне важно при планировании послеоперационного лечения.
2. Основным фактором, определяющим прогноз заболевания при ГБ у детей, является радикальность оперативного лечения. Выполнение операций необходимо осуществлять в объеме анатомических резекций.
3. Комбинированное лечение эффективно при своевременной диагностике ГБ. В случае поражения обеих долей печени и отсутствии MTS, эффективным может оказаться трансплантация печени от живого родственного донора.

## Литература

1. *Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. – 10-й пересмотр, 1-4 том / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 1998. – М.: Медицина, 1998.*
2. *Заболеваемость и лечение гепатобластомы и гепатоцеллюлярного рака у детей в Республике Беларусь / А.Т. Шиманский, Р.С. Исмаил-заде, Д.В. Кочубинский, А.А. Зборовская, Г.И. Закревский // Детская онкология. –2008;2009. – №4;№1. – С. 79–82.*
3. *Черствой, Е.Д. Опухоли и опухолеподобные процессы у детей / Е.Д.Черствой, Г.И.Кравцова, А.В.Фурманчук. – Минск: Асар, 2002. – С. 289-308.*
4. *Von Schweinitz D, Burger D, Mildenerberger H. Is laparotomy the first step in the treatment of childhood Liver Tumours. The experience from German Cooperative Pediatric Liver Tumour Study HB-89 // J Ped Surg. –1994. –V. 4. –P.82-86*
5. *Plaschkes J, Perilongo G, Shafford E, et al. Pre-operative chemotherapy-Cisplatin(PLA) and Doxorubicin (DO) PLADO for the treatment of hepatoblastoma (HB) and hepatocellular carcinoma (HCC)-results after 2 years follow up// Med Ped Oncol–1996. –V.27 –P. 256*

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ

### CD34+CD38- КЛЕТОК ПРИ ОМЛ У ДЕТЕЙ

*Шман Т.В., Тарасова А.В., Жерносек А.Н.*

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,

гематологии и иммунологии

Минск, Беларусь

Существование стволовых опухолевых клеток, способных инициировать и поддерживать рост опухоли уже доказано для опухолей мозга, рака молочной железы, а также для некоторых типов лейкозов [Becker MW 2010]. В середине 90-х годов XX-века при исследовании острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) были получены первые экспериментальные данные о существовании особой популяции клеток с иммунофенотипом CD34+CD38-, которая способна инициировать лейкоз в иммунодефицитных мышцах [Lapidot T, 1994; Bonnet D., 1997]. Клетки с такими свойствами называют лейкоз инициирующими или лейкемическими стволовыми клетками (ЛСК) [Becker MW, 2010]. К настоящему времени показано, что количество бластных клеток с фенотипом CD34+CD38- имеет



прогностическое значение при ОМЛ. Так, выявлено, что высокий процент ( $>3,5\%$ ) лейкемических клеток с таким фенотипом при ОМЛ у взрослых пациентов достоверно ассоциируется с высоким уровнем минимальной остаточной болезни (МОБ) и худшей выживаемостью пациентов [Rhenen A., 2005]. Аналогично, большая бессобытийная выживаемость была выявлена в случаях с низким ( $<0,7\%$ ) содержанием CD34+CD38- лейкемических клеток при ОМЛ у детей [Witte K., 2011]. За счет особых свойств, присущих стволовым клеткам (самовозобновление, нахождение в покоем состоянии, высокая активность ABC-транспортеров, систем детоксикации ксенобиотиков и репарации ДНК), ЛСК резистентны к современным режимам химиотерапии и, таким образом, являются субстратом для развития рецидива.

Целью работы был анализ количества лейкемических клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- при ОМЛ у детей, а также выявление дополнительных иммунофенотипических маркеров для мониторинга этих клеток на этапах терапии.

*Материалы и методы.* Определение количества лейкемических клеток с фенотипом CD34+CD38- проводили с помощью четырехцветной проточной цитофлуориметрии. Для этого образцы выделенных или полученных после лизиса эритроцитов клеток костного мозга помещали в пробирки и добавляли моноклональные антитела, в следующих комбинациях: CD38FITC/CD34PE-Cy5/CD45PE-Cy7. Дополнительно для отличия лейкемических предшественников от нормальных гемопоэтических клеток использовали следующие маркеры, меченные PE: CD22, CD56, CD7, CD11b, CLL/hMICL, CD123. Образцы перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. После окрашивания клетки отмывали в фосфатном буфере и фиксировали раствором параформальдегида. Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter) в программе CXP. Учитывали не менее 500 тысяч клеток.

В исследование было включено 32 образца костного мозга пациентов детского возраста с острым миелоидным лейкозом. Исследования проводили на момент диагностики лейкоза до начала специфического лечения.

Данные представленные в виде значений медианы и диапазона (25-75 персентиля).

### *Полученные результаты и их обсуждение*

Более двадцати лет гемопоэтические клетки с фенотипом CD34+CD38- рассматриваются как наименее дифференцированные и обладающие свойствами стволовых клеток [Becker MW, 2011]. На рисунке 1 представлен алгоритм анализа количества стволовых клеток с фенотипом CD34+CD38- в образце костного мозга пациента с ОМЛ.

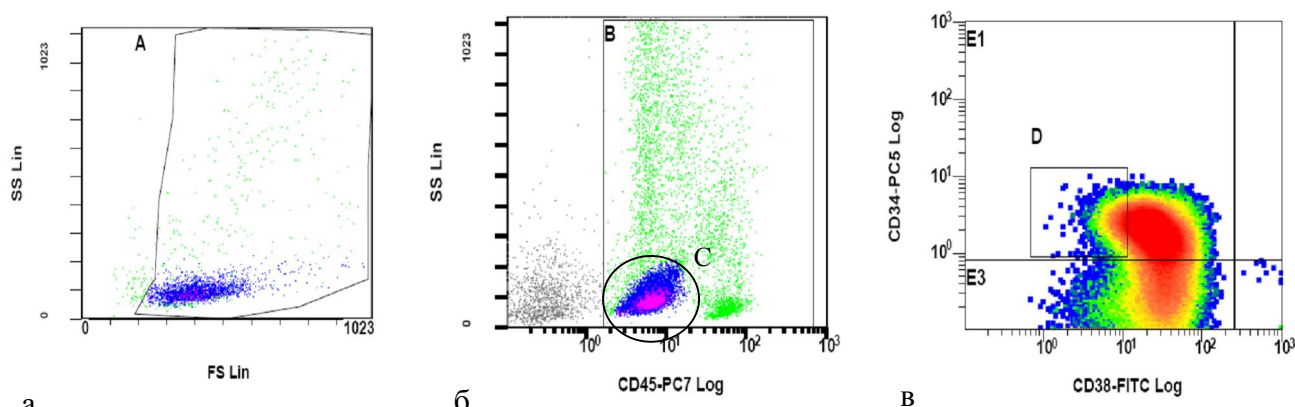


Рисунок 1 – Определение количества CD34+CD38- клеток. а - распределение клеток по светорассеиванию, б – распределение клеток по экспрессии CD45, в – распределение клеток по экспрессии CD38 и CD34. А – регион живых клеток, В – анализируемые гемопоэтические клетки, С – лейкемические клетки с низкой экспрессией CD45, D - регион клеток с фенотипом CD34+CD38-.

Для определения количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- использовали алгоритм, представленный на рисунке 1. На первом этапе выделяли живые клетки по показателям прямого (FS) и бокового (SS) светорассеивания (регион А), затем по сниженной экспрессии CD45 выделяли регион CD45<sup>low</sup> (лейкемических) клеток (С), далее среди них рассчитывали количество наименее дифференцированных клеток (регион D). В представленном примере количество CD34+CD38- составило 5,2 % среди CD45<sup>low</sup> клеток.

Среди проанализированных нами пациентов с ОМЛ были выявлены различные образцы распределения лейкемических клеток по экспрессии маркеров CD34 и CD38 (рисунок 2).

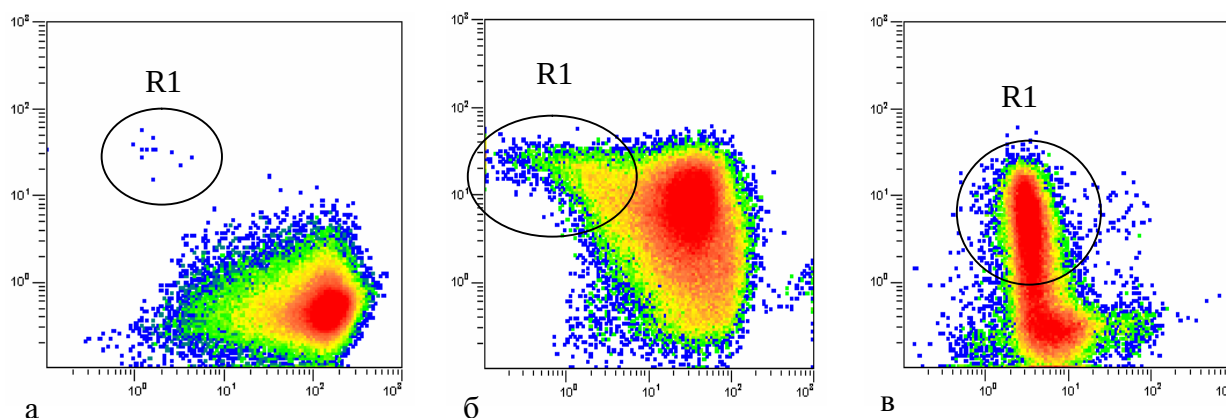


Рисунок 2 – Примеры различного распределения лейкемических клеток по экспрессии CD34 и CD38. По оси X – распределение клеток по флуоресценции CD38FITC, по оси Y – CD34PE-Cy5. Количество CD34+CD38- бластных клеток составило 0,05% (а), 8,6% (б) и 56% (в).

Согласно представленным примерам количество стволовых CD34+CD38-клеток среди лейкемических клеток значительно варьирует среди пациентов. Нами было проанализировано 32 образца клеток пациентов с ОМЛ, для которых медиана количества CD34+CD38-, рассчитанная среди региона бластных клеток, составила 1,1 % (0,04-3,9).

Ранее было показано, что в большинстве случаев ОМЛ выявляемые CD34+CD38- клетки имеют специфические молекулярно-генетические изменения, что подтверждает лейкемическую природу этих клеток [Rhenen A., 2007]. Однако, также было показано, что в случаях, когда количество CD34+ клеток составляет менее 1%, то большую часть этих клеток составляют нормальные стволовые клетки [van der Pol MA., 2003]. Также для отслеживания лейкемических стволовых клеток на этапах терапии использование только фенотипа CD34+CD38- недостаточно, поскольку нормальные гемопоэтические и лейкемические предшественники характеризуются идентичным иммунофенотипом CD34+CD38- (также как

CD133+, CXCR4+). Для иммунофенотипического подтверждения принадлежности клеток с фенотипом CD34+CD38- к лейкоемическому клону используют дополнительные маркеры [van Rhenen A, 2007]. К таким маркерам относятся CD123, CD47, CLL-1/hMICL, CD7, CD56, CD19, CD90+, CD96 и др [Horton SJ. 2012]. В норме эти маркеры не экспрессируются на гемопоэтических стволовых клетках, тогда как при ОМЛ встречаются с различной частотой, при этом экспрессия их индивидуальна и связана с особенностями иммунофенотипа самого лейкоза. В таблице представлены наши результаты, отражающие встречаемость при ОМЛ некоторых маркеров, в норме не характерных для миелоидных клеток, которые могут использоваться для дифференцирования лейкоемических от нормальных стволовых клеток.

Таблица – Встречаемость некоторых маркеров при ОМЛ

| Антиген     | Обследовано<br>n | Количество позитивных случаев |      |
|-------------|------------------|-------------------------------|------|
|             |                  | n                             | %    |
| CD22        | 27               | 4                             | 14,8 |
| CD56        | 28               | 4                             | 14,3 |
| CD7         | 32               | 9                             | 28,1 |
| CD11b       | 32               | 13                            | 40,6 |
| CD123       | 15               | 9                             | 60,5 |
| CLL-1/hMICL | 8                | 5                             | 62,5 |

Среди проанализированных нами маркеров наиболее часто встречаются CD11b, CD123 и CLL-1/hMICL. При этом, если общая популяция лейкоемических клеток экспрессирует какой-либо специфический маркер, то большинство CD34+CD38- клеток также несут его на своей поверхности. Так, в CLL-1 позитивных лейкозах количество CD34+CD38-CLL-1+ клеток составляло 55 (31,5-73,8) %, тогда как в нормальном костном мозге (n=7) клеток с таким фенотипом выявлено 1,3 (0,9-2,1)%.

Таким образом, использование многоцветной проточной цитофлуориметрии позволяет выявить и проанализировать количество лейкоэмических CD34+CD38- клеток при ОМЛ. Использование специфических лейкоз-ассоциированных маркеров позволит мониторировать лейкоэмические предшественники на этапах терапии, позволит оценить чувствительность этих клеток к проводимому лечению и прогнозировать развитие рецидива.

### *Литература*

1. Becker M., Jordan C. *Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions* // *Blood Rev.* - 2011. – V.25(2). – P. 75-81.
2. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice* // *Nature*. -1994. - V.367. – P.645-648.
3. Bonnet D., Dick J. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell* // *Nat. Med.* - 1997. – V.3. – P.730-737.
4. van Rhenen A., Feller N., Kelder A., Westra A., Rombouts E., Zweegman S., van der Pol M., Waisfisz Q., Ossenkoppele G., Schuurhuis G.. *High stem cell frequency in acute myeloid leukemia*- 2005.- V.11. – P.6520-6527.
5. Witte K., Ahlers J., Schafer I., Andre M., Kerst G., Scheel-Walter H., Schwarze C., Pfeiffer M., Lang P., Handgretinger R., Ebinger M. *High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia* // *Pediatr Hematol Oncol.* - 2011. – V.28. – P.91-99.
6. van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., Feller N., Nieuwint A., Zweegman S., Ossenkoppele G., Schuurhuis G. *Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission* // *Leukemia*.- 2007. – V.21. – P.1700-1707.
7. van der Pol M., Feller N., Roseboom M., Moshaver B., Westra G., Broxterman H., Ossenkoppele G., Schuurhuis G. *Assessment of the normal or leukemic nature of CD34+ cells in acute myeloid leukemia with low percentages of CD34 cells* // *Haematologica*.- 2003. – V.88(9). – P.983-993.
8. Horton S., Huntly B.. *Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology* // *Haematologica*. – 2012 –V .97: [Epub ahead of print] doi:10.3324/haematol.2011.054734.

# **ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ТРАНСПЛАНТАТА НА РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЕТЕЙ**

*Шман Т.В., Марейко Ю.Е., Шарапова С.О., Невмержицкая А.С.,  
Минаковская Н.В.*

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

В исследованиях, изучающих значение состава трансплантата при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), был продемонстрирован вклад различных популяций гемопоэтических клеток, влияющих на скорость приживления трансплантата, развитие реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), показатели выживаемости пациентов после трансплантации. Ранее были описаны факты, указывающие, что количество CD8<sup>+</sup> цитотоксических клеток, а также естественных киллерных (ЕК) клеток в большей степени, чем процент CD34<sup>+</sup> клеток, являются факторами, влияющими на раннее приживление и результаты аллогенной трансплантации [1]. Более того, показано, что содержание отдельных субпопуляций ЕК-клеток в трансплантате позволяет прогнозировать развитие острой РТПХ. Так, высокая доза CD56<sup>bright</sup> ЕК-клеток может являться прогностическим фактором развития острой РТПХ [2]. В другом исследовании выявлено, что у пациентов, получивших большую дозу  $\gamma\delta$ T-клеток, чаще развивалась острая РТПХ [3]. В настоящее время перспективными являются исследования роли Т-регуляторных клеток. Известно, что эти клетки подавляют развитие воспалительных реакций, связанных с РТПХ. При этом сниженное количество Т-регуляторных клеток в трансплантате ассоциируется с высокой вероятностью развития острой РТПХ [3-5].

Целью работы было исследование субпопуляционного состава трансплантата и оценка его влияния на развитие реакции трансплантат против хозяина после проведения аллогенной ТГСК для пациентов детского возраста.

*Материалы и методы.* В исследование было включено 43 пациента детского возраста с проведенной аллогенной ТГСК. В 18 случаях трансплантации были проведены от совместимых родственных доноров, 15 - совместимых неродственных, 10 - несовместимых неродственных.

Среди 43 образцов трансплантата было 34 образца костного мозга и 9 образцов периферической стволовой клетки.

Определение субпопуляционного состава трансплантата методом проточной цитофлуориметрии проводили в день проведения трансплантации. Образец трансплантата разливали по 100 мкл в полистироновые пробирки (Beckman Coulter, USA) и добавляли соответствующие моноклональные антитела. Использовали следующие комбинации антител: CD45/CD4/CD8/CD3/CD56, CD45/CD56/CD19/CD3/DR, меченные флуорохромами FITC/PE/ECD/PC5/PC7, а также CD4/CD127/CD25, CD34/CD38/CD45, CD3/NKp30/CD56, CD3/NKp46/CD56, меченные флуорохромами FITC/PE/PC7.

Образцы инкубировались в станции пробоподготовки Beckman Coulter TQ prep (USA) 10 минут при комнатной температуре. По окончании времени инкубирования в автоматическом режиме проводили лизирование и фиксирование образцов с использованием коммерческих растворов (Immunoprep Reagent System (Beckman Coulter)). Через 20 минут пробоподготовки образцы были готовы для анализа на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter).

По показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания, а также экспрессии CD45 выделяли регион лимфоцитов. В пределах этого региона рассчитывали процент различных субпопуляций клеток: В-клетки анализировали по фенотипу CD19+; ЕК-клетки – по CD3-/CD16CD56+; Т-

клетки - CD3+, Т хелперы – CD3+CD4+, Т цитотоксические – CD3+CD8+; Т-регуляторные клетки – CD4+CD127-CD25+; ЕК подобные Т-клетки - CD3+CD56+; активированные ЕК-клетки – по экспрессии CD3-CD56+NKp30+ и CD3-CD56+NKp46+, количество стволовых клеток – по экспрессии CD34+CD38-.

Данные о количестве трансплантированных CD34+ клеток и общей дозе ядросодержащих клеток (ЯСК) были получены из историй болезней пациентов.

На основании данных о количестве трансплантированных ЯСК, проценте лимфоцитов в образце рассчитывали абсолютные значения трансплантированных изучаемых субпопуляций клеток.

Статистический анализ. Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программу Statistica 6.0. Результаты представлены в виде значений медианы и диапазона (25 - 75 персентили). Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с помощью U-теста Манна-Уитни. Результаты считали достоверными, если  $p \leq 0,05$ .

#### *Полученные результаты и обсуждение*

В настоящее время исследователями получены противоречивые данные о вкладе отдельных субпопуляций клеток, составляющих трансплантат, в развитии осложнений после ТГСК, а также в общем исходе трансплантации [1, 6]. В представленной работе нами было исследовано влияние количества трансплантированных различных субпопуляций клеток на развитие острой и хронической РТПХ после ТГСК.

На первом этапе работы проанализировали состав трансплантата в двух группах пациентов в зависимости от выраженности острой РТПХ: группа пациентов без РТПХ (0-1 стадии) и группа с РТПХ (2-4 стадиями). Однако, среди анализируемых показателей достоверных различий между двумя группами пациентов выявлено не было. Далее мы выделили три группы пациентов: без РТПХ, с РТПХ 1-2 стадий и с РТПХ 3-4 стадий. Полученные



данные о дозе трансплантированных клеток в сравниваемых группах пациентов представлены в таблице.

Таблица – Субпопуляционный состав трансплантата в группах пациентов с различными стадиями острой РТПХ

| Исследуемые показатели | Абсолютные показатели клеточного состава трансплантата в зависимости от проявлений острой РТПХ, $\times 10^8/\text{кг}$ |                     |                      |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|
|                        | Нет (n=16)                                                                                                              | 1-2 стадия (n=17)   | 3-4 стадия (n=10)    |
| ЯСК                    | 3,4 (2,5-5,3)                                                                                                           | 2,45 (2,0-4,4)      | 6,0 (4,3-7,1) *      |
| CD34+                  | 0,04 (0,025-0,065)                                                                                                      | 0,03 (0,02-0,036)   | 0,06 (0,036-0,078) * |
| CD34+CD38-             | 0,007 (0,003-0,013)                                                                                                     | 0,004 (0,003-0,006) | 0,004 (0,003-0,007)  |
| CD3+                   | 0,42 (0,35-0,63)                                                                                                        | 0,33 (0,23-0,48)    | 0,94 (0,51-1,56) *   |
| CD3+CD4+               | 0,21 (0,15-0,42)                                                                                                        | 0,2 (0,14-0,22)     | 0,54 (0,36-0,83) *   |
| CD3+CD8+               | 0,19 (0,13-0,26)                                                                                                        | 0,15 (0,1-0,22)     | 0,39 (0,18-0,54) *   |
| CD3+CD56+              | 0,009 (0,004-0,017)                                                                                                     | 0,006 (0,004-0,008) | 0,02 (0,007-0,03) *  |
| CD4+CD25+CD127-        | 0,016 (0,01-0,03)                                                                                                       | 0,015 (0,01-0,02)   | 0,03 (0,02-0,05) *   |
| CD19+                  | 0,185 (0,078-0,35)                                                                                                      | 0,12 (0,1-0,2)      | 0,38 (0,097-0,6)     |
| CD3-CD56+              | 0,035 (0,02-0,08)                                                                                                       | 0,03 (0,02-0,04)    | 0,07 (0,039-0,11)    |

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой пациентов с острой РТПХ 1-2 стадий.

Согласно представленным данным видно, что пациенты, проявившие РТПХ 3-4 стадий, получили достоверно большую дозу ЯСК, стволовых CD34+ клеток, общую дозу Т-клеток, а также всех анализируемых субпопуляций Т-клеток (хелперы, цитотоксические, Т-регуляторные, ЕКТ-клетки) по сравнению с группой пациентов с РТПХ 1-2 стадий.

Аналогично, проанализировали влияние дозы трансплантированных клеток на проявления хронической РТПХ. Достоверных различий в дозе трансплантированных клеток различных субпопуляций при сравнении групп пациентов с хронической РТПХ и без нее выявлено не было. Однако, было отмечено, что пациенты, развившие распространенную РТПХ по сравнению

с группой пациентов с локальной РТПХ получили достоверно большую дозу цитотоксических Т-клеток, а также большую дозу В-клеток (рисунок).

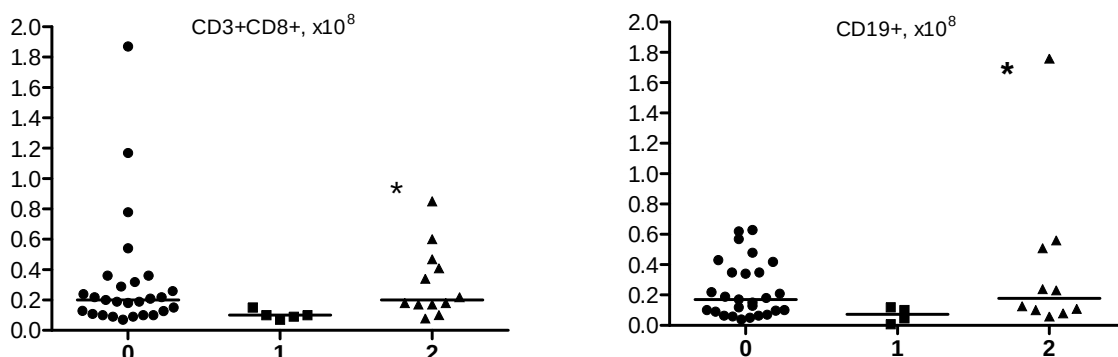


Рисунок – Количество трансплантированных цитотоксических Т-клеток и В-клеток в группах пациентов в зависимости от наличия хронической РТПХ.

0 – группа пациентов без проявлений хронической РТПХ, 1 – пациенты с локальной, 2 – распространенной формами хронической РТПХ.

\* -  $p < 0,05$  при сравнении групп пациентов с локальной и распространенной формами хронической РТПХ.

Известно, что при острой РТПХ повреждение тканей опосредуется преимущественно донорскими Т-клетками, тогда как в развитии хронической РТПХ патогенетической основой являются В-клетки восстанавливающего лимфопоеза [7]. Однако, в последнее время особое значение придается исследованию вклада дозы трансплантированных В-клеток в развитие острой и хронической РТПХ. В экспериментальных работах с использованием животных было продемонстрировано значение количества В-лимфоцитов в трансплантате в развитии хронической РТПХ [7, 8]. Хотя в других клинических исследованиях было выявлено влияние дозы В-клеток на возникновение острой, но не хронической РТПХ [9, 10].

В нашей работе было установлено, что пациенты, развившие тяжелую острую РТПХ, получили большую дозу ЯСК, CD34+ клеток, Т-клеток и их субпопуляций. Пациенты с распространенной формой хронической РТПХ получили в составе трансплантата большую дозу цитотоксических Т-клеток

и В-клеток. Таким образом, оценка субпопуляционного состава трансплантата может использоваться для прогнозирования развития как острой, так и хронической реакций трансплантат против хозяина.

## Литература

1. Kim D., Won D., Lee N., Sohn S., Suh J., Lee K. Non-CD34+ cells, especially CD8+ cytotoxic T cells and CD56+ natural killer cells, rather than CD34 cells, predict early engraftment and better transplantation outcomes in patients with hematologic malignancies after allogeneic peripheral stem cell transplantation // *Biol Blood Marrow Transplant.*- 2006. – V.12. – P.719-728.
2. Zhao X., Chang Y., Xu L., Liu D., Liu K., Huang X. Association of natural killer cells in allografts with transplant outcomes in patients receiving G-CSF-mobilized PBSC grafts and G-CSF-primed BM grafts from HLA-haploidentical donors // *Bone Marrow Transplant.*- 2009. –V. 44. – P.721-728.
3. Pabst C., Schirutschke H., Ehninger G., Bornhauser M., Platzbecker U. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors // *Clin Cancer Res.*- 2007. –V.13(10). –P. 2916-2922.
4. Wolf D., Wolf A., Fong D., Rumpold H., Strasak A., Clausen J., Nachbaur D. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation // *Transplantation.*- 2007. –V.83(8). – P.1107-1113.
5. Pastore D., Delia M., Mestice A., Carluccio P., Perrone T., Gaudio F., Curci P., Rossi A., Ricco A., Specchia G. CD3+/Tregs ratio in donor grafts is linked to acute graft-versus-host disease and immunologic recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation // *Biol Blood Marrow Transplant.*- 2012. – V.18(6). –P.887-893.
6. Cao T., Wong R., Sheehan K., Laport G., Stockerl-Goldstein K., Johnston L., Shizuru J., Negrin R., Lowsky R. CD34, CD4, and CD8 cell doses do not influence engraftment, graft-versus-host disease, or survival following myeloablative human leukocyte antigen-identical peripheral blood allografting for hematologic malignancies // *Exp Hematol.*- 2005. –V.33(3). – P.279-285.
7. Zhang C., Todorov I., Zhang Z., Liu Y., Kandeel F., Forman S., Strober S., Zeng D. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations // *Blood.* -2006. – V.107(7). – P.2993-3001.
8. Young J., Wu T., Chen Y., Zhao D., Liu H., Yi T., Johnston H., Racine J., Li X., Wang A, Todorov I., Zeng D. Donor B Cells in Transplants Augment Clonal Expansion and Survival of Pathogenic CD4+ T Cells That Mediate Autoimmune-like Chronic Graft-versus-Host Disease // *J Immunol.*- 2012. – V.189(1). –P.222-233.
9. Michonneau D., Peffault de Latour R., Porcher R., Robin M., Benbunan M., Rocha V., Ribaud P., Ferry C., Devergie A., Vanneaux V., Gluckman E., Marolleau J., Socie G., Larghero J. Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants // *Br J Haematol.*- 2009. – V.145(1). – P.107-114.
10. Iori A., Torelli G., De Propriis M., Milano F., Pupella S., Gozzer M., Mancini F., Milani M., Intoppa S., Cerretti R., Lucarelli B., Valle V., Malandrucolo L., Iannella E., Arleo E., Guarini A., Foa R. B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation // *Transplantation* – 2008. – V. 85(3). – P.386-390.

## **ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ В МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ПРОТОКОЛУ МВ- 2002**

*Ясковец В. А. , Еленская Н.В, Красницкая Т.А., Триханова К.В.*

Учреждение здравоохранения « Могилевская областная детская больница»,  
Могилев, Беларусь

Лечение по протоколу МВ-2002 на базе УЗ МОДБ по поводу ОЛЛ получал 31 ребенок: 17 девочек (54,84%) и 14 мальчиков (45,16%). Распределение по возрасту: до 3-х лет – 4 (12,9%), 3-5 лет – 9 (29,03%), 6-10 лет – 9 (29,03%), 11-15 лет – 7 (22,58%), от 16 лет – 2 (6,45%). Проживающих на загрязненной территории: загрязненность  $Cs_{137}$  1-5  $Ku/km^2$  – 1 (3,23%), 5-15  $Ku/km^2$  – 1 (3,23%);  $Sr_{90}$  100% - менее 1  $Ku/km^2$ .

Наиболее частые жалобы пациентов при поступлении: субфебрилитет – 18 человек (58,06%); боли в костях – 11 человек (35,48%); проявления геморрагического синдрома (геморрагическая сыпь, кровоточивость десен, носовые кровотечения) – 7 пациентов (22,58%); боли в животе без четкой локализации – 4 (12,9%).

При поступлении выявлено: генерализованная лимфаденопатия – 24 человека (77,42%) (в одном случае со сдавлением яремной вены), геморрагическая сыпь – 14 (45,16%), изменения в биохимическом анализе выявлены у 22 пациентов (71,0%), у 21 пациента выявлена тахикардия (67,74%), перикардальный выпот по данным ЭХО-КГ имел место у 21 (67,74%), у 2 пациентов (6,45%) снижена сократительная способность миокарда. Гепатоспленомегалия по данным УЗИ имела место у 26 пациентов (83,9%) (в т.ч. у 3 диффузно изменена структура печени). По данным люмбальной пункции при первичном анализе существенных изменений не выявлено, при повторном исследовании у 1 пациента (3,23%) выявлен нейрорлейкоз.

Результаты исследования костного мозга:

1. Цитология (у 2 пациентов данных нет):  
-  $L_1 - L_2$  – 28 (90,3%);  $L_3$  – 1 (3,23%);

2. Цитохимия: реакция на миелопероксидазу отрицательна в 100% случаев;

3. Иммунофенотипирование: принадлежность к В- иммунофенотипу – 28 эпизодов (90,3%); принадлежность к Т- иммунофенотипу – 3 (9,7%).

4. Молекулярно- генетическое исследование: химерных онкогенов не выявлено –8 (25,81%); выявлен химерный ген E<sub>2</sub>A(PB<sub>x</sub>) –1 (3,23%); выявлен химерный онкоген TEL/AML1 –1 (3,23%); у 21 пациента данные отсутствуют.

Изменения в общем анализе крови при поступлении: ускоренное СОЭ – у 26 детей (83,87%); лейкоцитоз до 50,0 тыс. – у 10 пациентов (32,26%); лейкоцитоз более 50,0 тыс – у 4 (12,9%); лейкопения различной степени – у 7 (22,6%); снижение уровня тромбоцитов – у 23 детей (74,19%); анемия – у 23 пациентов (74,19%); бластоз в периферической крови - у 22 больных (70,97%); нейтропения различной степени – у 23 пациентов (74,2%).

Лечение по протоколам индукции на базе МОДБ получил 31 пациент, консолидации - 28 пациентов. Из них в гемотрансфузионной терапии нуждались: в индукции – 26 пациентов (83,9%); К1 – 18 пациентов (64,3%); К2 – 17 пациентов (60,7%); К3 – 21 пациент (75%).

Потребность в различных видах компонентов крови представлена в таблице 1.

Таблица 1- Потребность в компонентах крови на различных этапах лечения острого лейкоза

|                   | Индукция,<br>количество<br>эпизодов | К1,<br>количество<br>эпизодов | К2,<br>количество<br>эпизодов | К3,<br>количество<br>эпизодов | Всего |
|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Ег- масса         | 39                                  | 7                             | 9                             | 13                            | 68    |
| альбумин          | 8                                   | 13                            | 13                            | 13                            | 47    |
| Тг-<br>концентрат | 28                                  | -                             | 2                             | 2                             | 32    |
| СЗП               | 4                                   | 7                             | 3                             | 3                             | 17    |

Инфекционные осложнения на протоколах имели место:

-на протоколе индукции у 28 пациентов (90,3%), К1 – у 26 пациентов (92,9%); К2 – у 24 пациентов (85,7%); К3 – у 23 пациентов (82,1%).

Всего 206 эпизодов, в т.ч.: а протоколе индукции – 55 эпизодов (26,7%), К1 – 50 эпизодов (24,3%). К2 – 46 эпизодов (22,3%). К3 – 55 эпизодов (26,7%).

Структура инфекционных осложнений представлена в таблице 2.

Таблица 2- Инфекционные осложнения на различных этапах терапии острого лейкоза

|                                 | Индукция,<br>количество<br>эпизодов | К1, количе-<br>ство<br>эпизодов | К2, количе-<br>ство<br>эпизодов | К3,<br>количество<br>эпизодов | частота<br>встречаемо-<br>сти, % |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| мукозит                         | 25                                  | 18                              | 16                              | 13                            | 35                               |
| ОРИ                             | 9                                   | 16                              | 9                               | 16                            | 24,3                             |
| лихорадка                       | 9                                   | 4                               | 6                               | 8                             | 13,1                             |
| герпетическая<br>инфекция       | 2                                   | 5                               | 9                               | 7                             | 11,2                             |
| энтерит, энтероколит            | 2                                   | 1                               | 1                               | 1                             | 2,4                              |
| пневмония                       | 1                                   | 2                               | 1                               | -                             | 1,9                              |
| флебит                          | 2                                   | 1                               | -                               | -                             | 1,5                              |
| тонзиллит                       | 1                                   | 1                               | -                               | 1                             | 1,5                              |
| конъюнктивит                    | 1                                   | -                               | -                               | 1                             | 1,5                              |
| воспалит. изменения в<br>ОАК    | 1                                   | -                               | -                               | 2                             | 1,5                              |
| отит                            | -                                   | 1                               | -                               | 1                             | 1,0                              |
| ИМВП, цистит                    | 1                                   | 1                               | -                               | -                             | 1,0                              |
| стрептодермия лица              | -                                   | -                               | 1                               | -                             | 0,5                              |
| эпиглотит                       | -                                   | -                               | 1                               | -                             | 0,5                              |
| фарингомикоз                    | -                                   | -                               | 1                               | -                             | 0,5                              |
| внутренний ячмень               | -                                   | -                               | 1                               | -                             | 0,5                              |
| системная грибковая<br>инфекция | 1                                   | -                               | -                               | -                             | 0,5                              |
| тифлит                          | -                                   | -                               | -                               | 1                             | 0,5                              |
| периодонтит                     | -                                   | -                               | -                               | 1                             | 0,5                              |
| инфицированная рана             | -                                   | -                               | -                               | 1                             | 0,5                              |

В 105 случаях выполнялись посевы биологического материала на флору, всего выполнено 207 посевов: на протоколе индукции – 89 (43%), К1 – 53 (25,6%), К2 – 41 (19,8%), К3 – 24 (11,6%).

В том числе: со слизистых оболочек полости рта – 139 (67,1%), кровь – 24 (11,6%), моча – 25 (12,1%), с поверхности кожи – 3 (1,4%). вагинальный секрет – 3 (1,4%), кал – 3 (1,4%), из ЦВК – 2 (1,0%), гнойное отделяемое – 2

(1,0%), со слизистой носа – 2 (1,0%), ликвор – 1 (0,8%), плевральная жидкость – 1 (0,8%), из уха – 1 (0,8%); мокрота – 1 (0,8%).

Этиологическая структура результатов посевов представлена в таблице 3.

Таблица 3- Результаты посевов биоматериала на различных этапах лечения

|                                 | Индукция,<br>абсолютные<br>цифры | K1,<br>абсолютные<br>цифры | K2,<br>абсолютные<br>цифры | K3,<br>абсолютные<br>цифры | частота<br>встречаемости,<br>% |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Str. pneumonia                  | 21                               | 16                         | 12                         | 7                          | 27,1                           |
| b-гемолитический<br>Str.        | 10                               | 12                         | 3                          | 4                          | 14,0                           |
| Candida                         | 18                               | -                          | 3                          | 1                          | 10,6                           |
| Staph. epidermidis              | 6                                | 4                          | 2                          | 1                          | 6,3                            |
| Snaph. aureus                   | 7                                | 1                          | 2                          | -                          | 4,8                            |
| Str. faecalis                   | 2                                | 2                          | 1                          | -                          | 2,4                            |
| Enterobacter cl.                | -                                | -                          | 2                          | 1                          | 1,4                            |
| Proteus mirabilis               | -                                | 1                          | 1                          | -                          | 1,0                            |
| U. urealiticum                  | -                                | -                          | -                          | 2                          | 1,0                            |
| Staph. saprophyticus            | -                                | -                          | -                          | 1                          | 0,5                            |
| Klebsiella                      | -                                | -                          | -                          | 1                          | 0,5                            |
| E. coli                         | 1                                | -                          | -                          | -                          | 0,5                            |
| неинформативный<br>результат    | 19                               | 12                         | 12                         | 4                          | 22,7                           |
| нетипированный<br>микроорганизм | 5                                | 5                          | 3                          | 2                          | 7,2                            |

В 143 случаях, с целью лечения инфекционных осложнений, назначалась системная антибиотикотерапия, в том числе: на протоколе индукции – 38 эпизодов (26,6%), K1 – 32 эпизода (22,4%), K2 – 33 эпизода (23,1%), K3 – 40 эпизодов (28,0%).

В 34 эпизодах использовался один антибактериальный препарат, в т.ч.: на протоколе индукции – 8 эпизодов (23,5%), K1 – 8 (23,5%), K2 – 9 (26,5%), S3 – 9 (26,5%).

Структура используемых антибактериальных препаратов представлена в таблицах 4, 5.

Таблица 4 - Структура антибактериальных препаратов, используемых самостоятельно

|               | Индукция, случаев использования | K1, случаев использования | K2, случаев использования | K3, случаев использования | Частота использования, % |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| пенициллины   | 5                               | 4                         | 3                         | 2                         | 41,2                     |
| фторхинолоны  | 2                               | 1                         | 5                         | 5                         | 38,2                     |
| цефалоспорины | 1                               | 2                         | 1                         | 1                         | 14,7                     |
| макролиды     | -                               | 1                         | -                         | 1                         | 5,9                      |

Таблица 5 - Структура антибактериальных препаратов, используемых в комбинации

|                | Индукция, случаев использования | K1, случаев использования | K2, случаев использования | K3, случаев использования | Частота использования, % |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| фторхинолоны   | 15                              | 9                         | 12                        | 17                        | 22,2                     |
| цефалоспорины  | 22                              | 12                        | 8                         | 9                         | 21,3                     |
| пенициллины    | 17                              | 9                         | 11                        | 11                        | 20,1                     |
| аминогликозиды | 23                              | 11                        | 5                         | 6                         | 18,8                     |
| макролиды      | 3                               | 7                         | 1                         | 7                         | 7,5                      |
| карбопенемы    | 6                               | -                         | 1                         | 2                         | 3,8                      |
| метронидазол   | 2                               | 3                         | 2                         | 2                         | 3,8                      |
| ванкомицин     | 3                               | 2                         | 1                         | -                         | 2,5                      |

Результаты лечения и отдаленные последствия: стойкая ремиссия зарегистрирована у 24 пациентов, рецидив заболевания в течение пяти лет – у 3 (1- костный мозг, 1- нейрорлейкоз, 1- костный мозг + нейрорлейкоз), ремиссия после рецидива достигнута в 1 случае, рецидив в течение одного года – 1 (костный мозг), 1 пациент выбыл из-под наблюдения, умерло 5 пациентов (1- смерть в ремиссии; 1- от основного заболевания; 3- в течение года после диагностики рецидива).



## **Содержание**

*Багиров И.А., Алейникова О.В.*

|                                                                                                                        |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| ОСТРЫЙ ЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ У ДЕТЕЙ<br>АЗЕРБАЙДЖАНА, ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА И РЕЗУЛЬТАТЫ<br>ЛЕЧЕНИЯ ПО ПРОТОКОЛУ ОЛЛ МВ-2002 | 3 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

*Бегун И.В.*

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>РЕАЛИЗАЦИЯ КОНЦЕПЦИИ ПРИМЕНЕНИЯ<br/>УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕТОДА МЕДИЦИНСКОЙ<br/>ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ<br/>ГЕМОДИНАМИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПОРАЖЕННЫХ<br/>ОРГАНОВ У ДЕТЕЙ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ</b> | 18 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

*Бегун И.В., Зборовская А.А.*

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ<br>ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ АБДОМИНАЛЬНЫХ<br>НОВОООБРАЗОВАНИЙ У ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ | 24 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

*Бегун И.В., Зборовская А.А., Тарасевич Р.А., Папкевич И.И.,  
Горовикова М.М.*

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| РАБОЧИЙ АЛГОРИТМ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ<br>ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ АБДОМИНАЛЬНЫХ<br>НОВОООБРАЗОВАНИЙ У ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ | 30 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

*Вашкевич Е.П., Шман Т.В.*

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ОЦЕНКА АКТИВАЦИИ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ<br>ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК,<br>ЭКСПАНСИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ | 36 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

*Волкова Л.И., Качан Г.Л.*

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЕМОФИЛИЧЕСКОЙ<br>АРТРОПАТИИ | 43 |
|--------------------------------------------------|----|

*Дмитриев В.В., Можейко Л.Ф., Гузей И.А.*

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ<br>И ПРИЧИНЫ ПРИ ЮВЕНИЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ<br>КРОВОТЕЧЕНИЙ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ 12-18 ЛЕТ | 47 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

*Дмитриев В.В., Можейко Л.Ф., Гузей И.А.*

54

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И  
СХЕМА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
ПРИ ЮВЕНИЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ  
У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ 12-18 ЛЕТ

*Захаревич В.И., Грушевский В.В., Дмитриев В.В.*  
ФАРМАКОКИНЕТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
У ПАЦИЕНТОВ В ЦИТОПЕНИИ С СЕПСИСОМ 61

*Зборовская А.А., Лапотенцова Е.С., Зборовский Д.К.*  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ У ДЕТЕЙ  
ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ  
ЗА 25-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД (1986 - 2010 гг.) 66

*Исайкина Я.И., Минаковская Н.В., Алейникова О.В.*  
ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
СТЕРОИДОРЕЗИСТЕНТНОЙ РТПХ 69

*Исайкина Я.И., Шман Т.В., Жерносеченко А.А., Тарасова А.В.*  
ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК,  
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ  
И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК 75

*Качан Г.Л., Качан С.Э., Адасько В.И., Волкова Л.И.*  
НЕОНАТАЛЬНАЯ АЛЛОИММУННАЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ 83

*Качан Г.Л., Шман Т.В., Минаковская Н.В., Марейко Ю.Е.,  
Гущина Л.М., Алексейчик А.В., Шаранова С.О., Невмержицкая А.С.,  
Волкова Л.И.*  
ОСТРАЯ РЕАКЦИЯ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА У  
РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК: ФАКТОРЫ  
РИСКА 89

*Кугейко Т.Б., Зборовская А.А., Пролесковская И.В.,  
Алейникова О.В.*  
ПРОБЛЕМА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ СЛУЧАЕВ  
НЕЙРОБЛАСТОМЫ У ДЕТЕЙ МЛАДШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ  
ГРУППЫ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ЗА ПЕРИОД 2001-2010 ГОДЫ 93

*Кустанович А.М., Романцова А.С., Чернецкая М.А.,  
Юцкевич Р.И., Алейникова О.В.* 101

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ  
КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ  
ЛЕЙКОЗОМ

*Кустанович А.М., Волочник Е.В., Чернецкая М.А., Кирсанова Н.П.,  
Алейникова О.В.*

МУТАЦИИ ГЕНОВ НУКЛЕОФОСМИНА И СЕВРА ПРИ ОСТРОМ  
МИЕЛОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ: ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ  
ЗНАЧЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО –ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА

108

*Кустанович А.М., Романцова А.С., Стеганцева М.В., Волочник Е.В.,  
Кирсанова Н.П., Белевцев М.В., Алейникова О.В.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ MLL-ПОЗИТИВНОМ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ У  
ДЕТЕЙ

115

*Марейко Ю.Е., Савицкая Т.В., Акинфеева Э.Л., Лавриненко В.А.,  
Ступникова Т.В., Савва Н.Н.*

ДИНАМИКА ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
РУТИННЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЕЕ ОЦЕНКИ  
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ

122

*Мелешко А.Н.*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИМФОМ

129

*Мелешко А.Н., Прохореня И.В.*

ИЗМЕРЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ ГЕНА IKAROS  
МЕТОДОМ RQ-PCR

137

*Мелешко А.Н., Прохореня И.В., Исайкина Я.И.*

ВЫЯВЛЕНИЕ ХИМЕРИЗМА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ КОТРАНСПЛАНТАЦИИ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

144

*Мишаткина Т.В., Мельнов С.Б., Смольник Н.С.*

НАНОТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ:  
БИОЭТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

151

*Мовчан Л.В., Белевцев М.В., Шман Т.В., Мигаль Н.В.,  
Алейникова О.В.*

ЭЛИМИНАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ЭТАПАХ  
ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО  
ЛЕЙКОЗА ИЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-ЛИМФОЦИТОВ У  
ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИХ  
ОСОБЕННОСТЕЙ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК,  
СТАНДАРТНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

163

*Пролесковская И. В., Минаковская Н.В.*

РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ  
НЕЙРОБЛАСТОМЕ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

170

*Пролесковская И.В., Кустанович А.М.*

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ  
МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ (ММБ) И МИНИМАЛЬНОЙ  
РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ (МРБ) ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ У  
ДЕТЕЙ

177

*Романова О.Н., Коломиец Н.Дю, Минаковская Н.В., Мигаль Н.В.,  
Клецкий С.К.*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ СО  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

180

*Ромашевская И.П., Тишкова Н.В., Демиденко А.Н., Мицура Е.Ф.*  
ДИАГНОСТИКА ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ  
ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

192

*Савицкая Т.В., Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А.*

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО  
ХИМЕРИЗМА У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ  
МЕТОДОМ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ КОРОТКИХ ТАНДЕМНЫХ  
ПОВТОРОВ УЧАСТКОВ ДНК

195

*Севрук О.В., Девялтовская М.Г.*

ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ  
ИНТЕРФЕРОНОВ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО

|                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ИММУНИТЕТА И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ<br>С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РОСТА                                                                                                                                                                            | 198 |
| <i>Стёганцева М.В., Кустанович А.М., Шарапова С.О., Белевцев М.В.</i><br>ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЬЦЕВЫХ СТРУКТУР ДНК Т-КЛЕТОЧНОГО<br>(TRC) и В-КЛЕТОЧНОГО (KRC) РЕЦЕПТОРА КАК МАРКЕРА<br>ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ<br>СИСТЕМЫ                       | 204 |
| <i>Тарасова А.В., Шман Т.В., Исайкина Я.И., Жерносеченко А.А.</i><br>ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК<br>НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК<br>К ХИМИОПРЕПАРАТАМ IN VITRO                                                                    | 212 |
| <i>Углова Т.А.</i><br>ПЕРСПЕКТИВЫ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИММУННОЙ<br>ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ                                                                                                                                                         | 219 |
| <i>Фёдорова А.С., Мовчан Л.В., Белевцев М.В.</i><br>ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА<br>НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ<br>ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ                                                                                               | 224 |
| <i>Фёдорова А.С., Соколова Н.А., Юцкевич Р.И.</i><br>ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОМЫ<br>БЕРКИТТА У ДЕТЕЙ                                                                                                                                         | 231 |
| <i>Шиманский А.Т., Исмаил-заде Р.С., Никифоров А.Н.,<br/>Кочубинский Д.В., Закревский Г.И.</i><br>ГЕПАТОБЛАСТОМА У ДЕТЕЙ, ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ                                                                                                                   | 235 |
| <i>Шман Т.В., Тарасова А.В., Жерносек А.Н.</i><br>ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ<br>CD34+CD38- КЛЕТОК ПРИ ОМЛ У ДЕТЕЙ                                                                                                                            | 240 |
| <i>Шман Т.В., Марейко Ю.Е., Шарапова С.О., Невмержицкая А.С.,<br/>Минаковская Н.В.</i><br>ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ТРАНСПЛАНТАТА<br>НА РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ<br>ХОЗЯИНА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ<br>ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ | 246 |

*Ясковец В. А., Еленская Н.В, Красницкая ТА., Триханова К.В.*  
ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА  
У ДЕТЕЙ В МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ  
ПО ПРОТОКОЛУ МВ- 2002

252

Научное издание

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ  
ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ

Материалы XII международной научно-практической конференции

Ответственный за выпуск Т.А.Углова  
Компьютерная верстка М.Г.Исмагилова