

# ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Прогнозирование гемorragических  
осложнений у детей  
с онкологическими заболеваниями,  
получающих химиотерапию**

---

**Агонисты рецепторов  
тромбопоэтина в терапии  
тромбоцитопений после  
аллогенной трансплантации  
костного мозга**

---

**Молекулярные механизмы  
лейкемогенеза: основы таргетной  
терапии**

---

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

# ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

## ONCOHEMATOLOGY

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

*проф., д.м.н. Е.В. Самочатова*  
Заместители главного редактора  
*д.м.н. В.В. Птушкин,*  
*проф., д.м.н. Б.В. Афанасьев*  
Ответственный секретарь  
*д.м.н. Ю.В. Румянцева*

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

*проф., д.м.н. О.В. Алейникова (Минск)*  
*проф., д.м.н. А.К. Голенков (Москва)*  
*проф., д.м.н. А.И. Карачунский (Москва)*  
*д.м.н. Е.Н. Паровичникова (Москва)*  
*проф., д.м.н. Ю.А. Криволапов (С.-Петербург)*  
*доц., д.м.н. М.Л. Минков (Австрия)*  
*д.м.н. Н.В. Мякова (Москва)*  
*к.м.н. Е.А. Никитин (Москва)*  
*проф., д.м.н. О.А. Рукавитсын (Москва)*  
*проф., д.м.н. С.А. Румянцев (Москва)*  
*д.м.н. Л.П. Менделеева (Москва)*  
*к.м.н. Л.Г. Фечина (Екатеринбург)*  
*д.м.н. А.Л. Усс (Минск)*

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

*проф., д.м.н. Е.А. Лукина (Москва)*  
*чл.-корр. РАМН И.В. Поддубная (Москва)*  
*чл.-корр. РАМН А.Г. Румянцев (Москва)*  
*к.м.н. В.А. Россиев (Самара)*  
*проф., д.м.н. А.Г. Талалаев (Москва)*

### EDITOR-IN-CHIEF

*Prof. Ye.V. Samochatova*  
Deputy Editors  
*D. Sci. V.V. Ptushkin,*  
*Prof. B.V. Afanasiev*  
Executive Secretary  
*D. Sci. Yu.V. Rumyantseva*

### EDITORIAL BOARD

*Prof. O.V. Aleynikova (Minsk)*  
*Prof. A.K. Golenkov (Moscow)*  
*Prof. A.I. Karachunskiy (Moscow)*  
*D. Sci. Ye.N. Parovichnikova (Moscow)*  
*Prof. Yu.A. Krivolapov (St.-Petersburg)*  
*D. Sci. M.L. Minkov (Austria)*  
*D. Sci. N.V. Myakova (Moscow)*  
*PhD Ye.A. Nikitin (Moscow)*  
*Prof. O.A. Rukavitsyn (Moscow)*  
*Prof. S.A. Rumyantsev (Moscow)*  
*D. Sci. L.P. Mendeleeva (Moscow)*  
*PhD L.G. Fechina (Yekaterinburg)*  
*D. Sci. A.L. Uss (Minsk)*

### EDITORIAL COUNCIL

*Prof. Ye.A. Lukina (Moscow)*  
*Prof. I.V. Poddubnaya (Moscow)*  
*Prof. A.G. Rumyantsev (Moscow)*  
*PhD V.A. Rossiyeв (Samara)*  
*Prof. A.G. Talalayeв (Moscow)*

О с н о в а н в 2 0 0 5 г.

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

Заведующая редакцией Т.В. Клюковкина  
Корректор В.В. Калинина  
Дизайн и верстка Е.В. Степанова

Служба подписки и распространения  
В.Ю. Тимохина, +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [baza@abvpress.ru](mailto:baza@abvpress.ru)  
Служба рекламы  
В.А. Клюковкин, +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [gm@abvpress.ru](mailto:gm@abvpress.ru)

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

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

Редакция не несет ответственности  
за содержание публикуемых  
рекламных материалов.

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

ISSN 1818-8346  
Онкогематология. 2012. № 1. 1–60  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2012

Подписной индекс в каталоге  
«Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии  
ООО «Графика»

Тираж 3000 экз.

2012

**ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ**

*С.С. Бессмельцев, Е.В. Карягина, Л.В. Стельмашенко, Г.Н. Салогуб,  
Е.Р. Мачюлайтене, К.М. Абдулкадыров, Н.А. Котова, И.И. Кострома,  
Н.В. Медведева, Л.И. Крылова, Е.Ю. Илюшкина*

**Эффективность леналидомида при рефрактерных/рецидивирующих  
формах множественной миеломы ..... 6**

*В.В. Дмитриев, И.А. Дунаев*

**Прогнозирование геморрагических осложнений на этапах программного лечения детей  
со злокачественными новообразованиями и гемобластозами ..... 15**

*Л.В. Мовчан*

**Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей  
с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов ..... 22**

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*И.А. Лисуков, О.С. Успенская, А.Д. Кулагин, С.Н. Бондаренко,  
Т.А. Рудакова, О.А. Слесарчук, Б.В. Афанасьев*

**Использование ромиплостима в терапии тромбоцитопений  
после аллогенной трансплантации костного мозга ..... 29**

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

*Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев*

**Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (обзор литературы) ..... 35**

**ЛЕКЦИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ**

*Д.А. Домнинский*

**Молекулярные механизмы лейкогенеза: основы таргетной терапии (лекция № 5) ..... 45**

**КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ, АНОНСЫ, ОБЪЯВЛЕНИЯ ..... 55**

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ..... 59**

**HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE**

*S.S. Bessmeltsev, E.V. Kariagina, L.V. Stelmashenko, G.N. Salogub,  
E.R. Machulaitene, K.M. Abdulkadyrov, N.A. Kotova, I.I. Kostroma,  
N.V. Medvedeva, L.I. Krylova, E.Yu. Ilushkina*

**Lenalidomide for relapsed or refractory multiple myeloma ..... 6**

*V.V. Dmitriev, I.A. Dunaev*

**Prediction of hemorrhagic complications during treatment of children with malignant diseases ..... 15**

*L.V. Movchan*

**Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia ..... 22**

**HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

*I.A. Lisukov, O.S. Uspenskaya, A.D. Kulagin, S.N. Bondarenko,  
T.A. Rudakova, O.A. Slesarchuk, B.V. Afanasyev*

**Romiplostim in thrombocytopenia treatment after allogeneic bone marrow transplantation ..... 29**

**BASIC RESEARCH**

*T.V. Shamanskaya, E.Yu. Osipova, S.A. Rummyantsev*

**Umbilical cord bloods hematopoietic stem cells *ex vivo* expansion (the literature review) ..... 35**

**LECTURES**

*D.A. Domninsky*

**Molecular mechanisms of leukemogenesis. Overview of targeted therapy ..... 45**

**CORRESPONDENCE, ANNOUNCEMENTS ..... 55**

**INFORMATION FOR AUTHORS ..... 59**

## Эффективность леналидомида при рефрактерных/ рецидивирующих формах множественной миеломы

С.С. Бессмельцев<sup>1</sup>, Е.В. Карягина<sup>3</sup>, Л.В. Стельмашенко<sup>1</sup>, Г.Н. Салогуб<sup>2</sup>, Е.Р. Мачюлайтене<sup>2</sup>,

К.М. Абдулкадыров<sup>1</sup>, Н.А. Котова<sup>4</sup>, И.И. Кострома<sup>1</sup>, Н.В. Медведева<sup>4</sup>, Л.И. Крылова<sup>3</sup>, Е.Ю. Илюшкина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;

<sup>3</sup>Городская больница № 15, Санкт-Петербург;

<sup>4</sup>Городская клиническая больница № 31, Санкт-Петербург

Контакты: Станислав Семенович Бессмельцев [bsshem@hotmail.com](mailto:bsshem@hotmail.com)

Для лечения 34 больных в возрасте 37–76 лет с рефрактерными и рецидивирующими формами множественной миеломы (ММ) был использован леналидомид (ревлимид) в монорежиме (R), леналидомид в сочетании с дексаметазоном (Rd) и бортезомиб + дексаметазон + леналидомид (VRd). При применении леналидомида в целом по группе ответ был получен у 70,5 %. Количество полных и очень хороших частичных ответов составило 38 %. Медиана общей выживаемости больных с момента включения их в исследование составила 48 мес. Установлено, что леналидомид эффективен у больных с неблагоприятными факторами прогноза (высокий уровень  $\beta_2$ -микроглобулина, возраст > 65 лет). Показана роль поддерживающей терапии. Медиана продолжительности ответа в группе больных без поддерживающей терапии составила 10 мес, а с поддерживающей терапией – 20 мес ( $p < 0,05$ ). Медиана общей выживаемости в группе больных с поддерживающей терапией не достигнута, в то время как без поддерживающей терапии – 36 мес. Побочные эффекты леналидомида предсказуемы и управляемы. В преобладающем большинстве случаев наблюдалась нейтропения (38,3 %) и тромбоцитопения (23,7 %). Серьезные осложнения встречались крайне редко.

**Ключевые слова:** множественная миелома, леналидомид, полный ответ, очень хороший частичный ответ, общая выживаемость

### Lenalidomide for relapsed or refractory multiple myeloma

S.S. Bessmeltsev<sup>1</sup>, E.V. Kariagina<sup>3</sup>, L.V. Stelmashenko<sup>1</sup>, G.N. Salogub<sup>2</sup>, E.R. Machulaitene<sup>2</sup>,

K.M. Abdulkadyrov<sup>1</sup>, N.A. Kotova<sup>4</sup>, I.I. Kostroma<sup>1</sup>, N.V. Medvedeva<sup>4</sup>, L.I. Krylova<sup>3</sup>, E.Yu. Ilushkina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg;

<sup>2</sup>Pavlov State Medical University of St.-Petersburg;

<sup>3</sup>City Hospital 15, St.-Petersburg;

<sup>4</sup>City Hospital 31, St.-Petersburg

We report the activity of lenalidomide (revlimide – R), lenalidomide plus dexamethasone (Rd), lenalidomide plus bortezomib plus dexamethasone (RVd) in 34 patients with relapsed and refractory myeloma. For patients who received lenalidomide the overall response rate was 70.5 %. 38 % patients achieved very good partial response (VGPR) + complete response (CR). Median overall survival (OS) was 48 months. Lenalidomide may overcome the poor prognostic impact of various factors, particularly elevated beta (2)-microglobulin. Lenalidomide is highly active in elderly patients (> 65 years). Significantly increased OS with a lenalidomide-based induction and lenalidomide maintenance therapy was revealed. The median duration of the overall response without lenalidomide maintenance therapy was 10 months. The median duration of the overall response with lenalidomide maintenance therapy was 20 months ( $p < 0,05$ ). Median OS with lenalidomide maintenance therapy was not reached. Median OS without lenalidomide maintenance therapy was 36 months ( $p < 0.05$ ). Side effects were predictable and manageable. The most common adverse events reported were neutropenia (38.3 %) and thrombocytopenia (23.7 %). Serious adverse events were rare.

**Key words:** multiple myeloma, lenalidomide, complete response, very good partial response, overall survival

### Введение

За последние годы в диагностике и лечении множественной миеломы (ММ) произошли большие изменения. В клинической практике широко используют метод иммунофиксации, что позволяет обнаружить моноклональный парапротеин в низких концентрациях и произвести измерение в сыворотке свободных легких цепей, что важно при оценке активности заболевания и диагностике низкосекре-

тирующих форм ММ, а также уточнения полноты противоопухолевого ответа. При лечении больных ММ применяют новые препараты (бортезомиб, талидомид, леналидомид и др.), способные эффективно воздействовать на ангиогенез и апоптоз опухолевых клеток, различные звенья множественной лекарственной устойчивости [1].

Одним из препаратов, проявивших высокую активность в продвинутых стадиях ММ, является

леналидомид (ревлимид). Леналидомид – структурный аналог талидомида со сходной, но более высокой биологической активностью, обладающий иным профилем безопасности. Этот препарат, в отличие от талидомида и бортезомиба, не вызывает развития периферической нейропатии. К настоящему времени получены данные о высокой эффективности леналидомида при лечении рефрактерных/рецидивирующих форм ММ и при впервые выявленном заболевании, причем они наиболее убедительны при использовании леналидомида в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами. Так, по результатам 2 параллельных многоцентровых исследований (ММ-009 и ММ-010), в которых сравнивалась эффективность леналидомида + дексаметазон с дексаметазоном при рефрактерных/рецидивирующих формах ММ, были продемонстрированы явные преимущества комбинации леналидомида с дексаметазоном [2, 3]. Частота общего ответа на комбинированную терапию в этих 2 исследованиях составила 60 % и 61 %, а на дексаметазон в монорежиме – 20 % и 24 %. Весьма успешными оказались попытки использовать леналидомид в комбинации с бортезомибом. В частности, хорошо зарекомендовала себя программа VRd (велкейд, ревлимид, дексаметазон). По данным P.G. Richardson et al. [4], объективный ответ (ОО) при использовании такой комбинации при рефрактерных/рецидивирующих формах ММ составил 86 %, включая 24 % полных ремиссий. Все большее применение леналидомид находит в первой линии терапии ММ, в том числе при выявлении факторов неблагоприятного прогноза, что продемонстрировано S.V. Rajkumar et al. [5], S.K. Kumar et al. [6], A. Palumbo et al. [7].

**Цель настоящего исследования** – определить эффективность леналидомида (ревлимида) в монорежиме и в сочетании с дексаметазоном и бортезомибом при лечении химиорезистентных/рецидивирующих форм ММ, в том числе с учетом количества и характера предшествующей терапии, возраста больных и других факторов неблагоприятного прогноза, а также проанализировать частоту и характер неблагоприятных побочных явлений.

### Материалы и методы

Под наблюдением находились 34 пациента с ММ (женщин – 20, мужчин – 14) в возрасте 37–76 лет. В большинстве случаев у больных установлена III стадия заболевания, у 4 пациентов отмечено умеренное нарушение функции почек (клиренс креатинина – 30–50 мл/мин). У пациентов был определен уровень сывороточного  $\beta_2$ -микроглобулина ( $\beta_2$ -м), при этом у 18 (53 %) из них он оказался выше 2,5 мг/л, что позволило отнести их к группе неблагоприятного прогноза. Длительность заболевания перед включением больных в исследование колебалась от 24 до 120 мес. Все больные, включенные в исследо-

вание, ранее получали различное лечение (химиотерапию, аутологичную трансплантацию периферических стволовых клеток, бортезомиб, талидомид, леналидомид) с развитием резистентности или рецидива заболевания. Число линий предшествующей терапии колебалось от 1 до 6. Характеристика больных представлена в табл. 1.

**Таблица 1.** Характеристика больных ММ (n = 34, рефрактерность/рецидив)

Характеристика	Значение
Медиана возраста (диапазон), годы	60 (37–76)
< 65 лет	23
> 65 лет	11
Мужчины : женщины	14 : 20
Варианты:	
G	18
A	10
Бенс-Джонса	6
Стадии ММ по Durie, Salmon: II/III ст.	8/26
Подстадии ММ: А/В	30/4
$\beta_2$ -м > 2,5 мг/л, число больных	18
Число предшествующих линий терапии (медиана, колебания)	4 (1–6)
Предшествующее химиотерапевтическое лечение: ВЦАП, МП, М2, ВАД (число больных)	7
Предшествующее лечение с проведением аутологичной трансплантации периферических стволовых клеток, число больных	5
Предшествующее лечение бортезомиб-содержащими программами (VD, PAD, VMP, VCD), число больных	16
Предшествующее лечение леналидомидом (леналидомид + дексаметазон, МР-Р) и талидомидом (талидомид + дексаметазон, МР-Т), число больных	6

В зависимости от схемы лечения были сформированы 3 группы больных. В 1-ю группу вошли 6 человек, которые получали леналидомид (ревлимид – R) по 25 мг внутрь (р. о.) с 1-го по 21-й день 28-дневного цикла (8 циклов). Вторую группу составили 17 больных, получавших леналидомид (25 мг/день с 1-го по 21-й день каждого 28-дневного цикла) и дексаметазон (40 мг в 1–4-й, 9–12-й и 17–20-й дни – первые 4 цикла). После завершения 4 циклов дексаметазон назначался только в 1–4-й дни (больные этой группы на момент оценки результатов получили от 4 до 8 циклов такой комбинации – Rd). Одиннадцати больным 3-й группы была назначена трехкомпонентная терапия по программе VRd – бортезомиб (велкейд) 1,3 мг/м<sup>2</sup> в/в, дни 1, 4, 8, 11; леналидомид (ревлимид) 25 мг/день р. о., дни 1–14; дексаметазон

20 мг р. о., дни 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12 (6–7 21-дневных циклов). У 2 пациентов из 1-й группы и 2 из 3-й группы в связи с клиренсом креатинина  $> 30$ , но  $< 50$  мл/мин доза леналидомида была редуцирована до 10 мг. После достижения ОО во всех группах больным проводилось еще 2 одноименных цикла консолидации. В последующем леналидомид в качестве поддерживающей терапии (по 25 мг с 1-го по 21-й день 28-дневного цикла, число циклов – от 12 до 35) был назначен 5 пациентам, а остальные находились под наблюдением. При развитии повторного рецидива среди больных, вошедших в исследование, начиналось иное лечение. Обычно это были программы, содержащие бортезомиб, у отдельных больных – леналидомид. Мы оценивали лишь эффективность леналидомида при назначении его при резистентных/рецидивирующих формах ММ – непосредственные (ответ, качество ответа) и отдаленные (выживаемость от начала использования леналидомида, в том числе с учетом поддерживающего лечения) результаты. Пациенты, включенные в исследование, подписывали форму информированного согласия.

Всем больным в течение всего периода применения леналидомида ежемесячно вводились бисфосфонаты (золедронат, бондронат). При развитии нейтропении (нейтрофилов  $< 1 \times 10^9$ /л) назначались колониестимулирующие факторы (ленограстим, филграстим и др.) с целью предупреждения редукции дозы и фебрильной нейтропении и поддержания нейтрофилов на уровне  $> 0,5 \times 10^9$ /л. При снижении гемоглобина  $< 80$  г/л применяли трансфузии эритроцитарной массы, а в случае тяжелой тромбоцитопении – тромбоконцентраты. Для профилактики тромбоэмболических осложнений больные получали аспирин (Тромбо АСС 100 мг/сут) или низкомолекулярные гепарины (клексан 40 мг/сут). В случае снижения уровня тромбоцитов ( $< 50 \times 10^9$ /л) антикоагулянты отменяли. При проведении тромбопрофилактики учитывали факторы риска тромбозов – венозные катетеры, химиотерапия, применение доксорубина, эритропоэтинов, высоких доз дексаметазона, большая масса опухоли, присоединившиеся инфекции, пожилой возраст, предшествующие тромбозы, тромбофилия. При выявлении не более 1 фактора риска назначали аспирин,  $> 1$  фактора риска – низкомолекулярные гепарины.

В этом исследовании приняли участие несколько гематологических центров Санкт-Петербурга, а именно: Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, городская больница № 15 и городская больница № 31. Больные находились на лечении в указанных центрах в период с 2005 по 2011 г.

Результаты лечения оценивали с использованием критериев ЕВМТ [8] с дополнениями Международной рабочей группы [9]. Выделяли полный

ответ (ПО), частичный ответ (ЧО), очень хороший частичный ответ (очЧО), минимальный ответ (МО) и стабилизацию опухолевого процесса. ПО (ремиссию) диагностировали у больных ММ, у которых в пунктате костного мозга число плазматических клеток нормальной морфологии было менее 5%, моноклональный иммуноглобулин и легкие цепи в моче не обнаруживались. Для уточнения полноты ремиссии использовали тест иммунофиксации. ЧО (ремиссию) устанавливали в том случае, если наблюдалось  $> 50\%$  уменьшение количества моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и  $> 90\%$  – уровня легких цепей в суточной моче; для очЧО было характерно  $> 90\%$  снижение парапротеина в сыворотке крови или моче ( $< 100$  мг/сут), а для минимального –  $> 25\%$  и  $< 49\%$  снижение сывороточного М-протеина и 50–89% – мочевого. Прогрессирование болезни (рецидив) устанавливали при 25% увеличении (или появлении) уровня моноклонального иммуноглобулина (в сыворотке крови  $> 0,5$  г/дл, а в моче  $> 200$  мг/сут), выявлении новых очагов деструкции в костях скелета или появлении костной или мягкотканной плазмоцитомы, появлении или усугублении гиперкальциемии (больше 11,5 мг/дл или 2,8 ммоль/л или 6,3 мг/дл или 1,5 ммоль/л в ионизированной форме (не объяснимое какими-либо причинами).

Оценка безопасности препарата проводилась у всех пациентов на основании учета всех возможных и серьезных нежелательных явлений, выявленных по данным физикального обследования, анализа показателей жизненно важных функций, клинических лабораторных анализов и инструментальных методов, заложенных в дизайн исследования. Показатели, связанные с оценкой токсичности (по критериям ВОЗ), повторялись после каждого цикла и, по клинической ситуации, – в период проведения цикла. Все изменения лабораторных показателей, равные или превышающие установленные предельные показатели, регистрировали как негативные проявления.

Статистическая обработка данных проведена с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003 и STATISTICA 6.0 в среде Windows XP. Расчет выживаемости осуществлялся по методу Каплана–Майера. Вычисляли время общей (промежуток времени от даты включения в протокол (среди всех больных) до смерти от любой причины или до даты последней явки больного)), бессобытийной (промежуток времени от момента включения в протокол (среди ответивших больных) до любого события – прогрессии, перехода на другую линию терапии, рецидива, смерти от любой причины) выживаемости, а также время до прогрессирования заболевания (срок от даты включения в протокол до даты первого обнаружения прогрессии заболевания (или рецидива) у больных, достигших ответа).

Медиану (Me) выживаемости вычисляли с использованием 50-го перцентиля функции выживаемости. Для сравнения кривых выживаемости в группах больных применяли log-rank test. Различие считали статистически достоверным при  $p < 0,05$ .

**Результаты**

Вначале мы оценили эффективность леналидомида среди всех 34 больных, вошедших в исследование. Как наглядно представлено на рис. 1, ОО (ПО + очЧО + ЧО + МО) независимо от возраста, стадии болезни, функции почек, уровня  $\beta_2$ -м и характера предшествующей терапии составил 70,5 %.

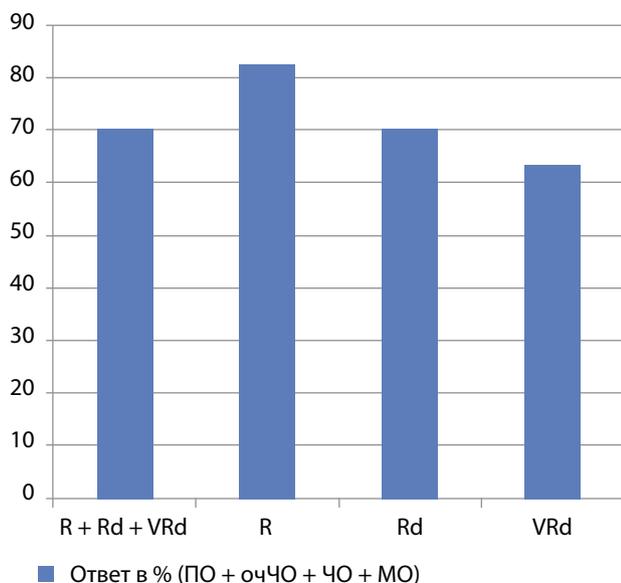


Рис. 1. Частота общего ответа больных ММ на леналидомид-содержащие программы терапии

При этом, как видно из табл. 2, у 13 (38 %) из 34 больных получен ПО либо очЧО, у 9 (26,5 %) – ЧО и у 2 (6 %) – МО. У 23,5 % больных удалось добиться стабилизации опухолевого процесса и только 2 (6 %) пациента не ответили на лечение леналидомидом. Затем была произведена оценка эффективности лечения больных ММ по группам, т. е. с учетом использованной программы лечения. В 1-й группе больных, получавших леналидомид в монорежиме, положительный ответ составил 83 %, при этом у 3 (50 %) пациентов зарегистрирован очЧО, а у 2 (33 %) – МО.

Таблица 2. Эффективность леналидомида в группе больных ММ

Терапия	ПО	очЧО	ЧО	МО	Стабилизация	Нет ответа
R, Rd, VRd (суммарный показатель), n = 34	6 (17,6 %)	7 (20,4 %)	9 (26,5 %)	2 (6 %)	8 (23,5 %)	2 (6 %)
R, n = 6	0	3 (50 %)	0	2 (33 %)	1 (17 %)	0
Rd, n = 17	4 (23,5 %)	4 (23,5 %)	4 (23,5 %)	0	4 (23,5 %)	1 (6 %)
VRd, n = 11	2 (18,5 %)	0	5 (45,5 %)	0	3 (27 %)	1 (9 %)

Однако ПО в этой группе пациентов добиться не удалось. Между тем в группе больных, получавших двухкомпонентную схему Rd, ОО составил 70,5 %, что не имело существенных различий с ОО в 1-й группе ( $p > 0,05$ ). Кроме того, количество полных ремиссий в этой группе больных составило 23,5 %. Еще у 8 (47 %) пациентов зарегистрирован очЧО или ЧО.

Не ответил на лечение 1 (6 %) больной, а у остальных удалось достичь стабилизации опухолевого процесса (см. табл. 2). В 3-й группе больных, лечившихся по схеме VRd, у 2 (18,5 %) больных верифицирован ПО и у 5 (45,5 %) – ЧО. Таким образом, отчетливый положительный ответ получен у 64 % больных. В 3 (27 %) случаях наблюдалась стабилизация и у 1 больного этой группы – прогрессия. Следует отметить, что у всех больных 3-й группы была III стадия заболевания, они были более предлеченными (5–6 линий предшествующей терапии, в том числе бортезомиб- и леналидомидсодержащие режимы – PAD, VD, CVD, VRd).

Отдельно нами проанализированы результаты лечения больных с рецидивами, развившимися после проведения им аутологичной трансплантации периферических стволовых клеток (АТПСК), терапии бортезомиб-, леналидомид- или талидомидсодержащими режимами. Как известно, при подборе терапии больным ММ важное значение придается выявлению факторов неблагоприятного прогноза, в том числе таким, как возраст и уровень  $\beta_2$ -м [1, 11]. Такие больные обычно хуже отвечают на химиотерапию, полученные ремиссии короткие, а частота рецидивов, наоборот, высока. Даже использование высокодозовой терапии не всегда бывает эффективным. Поэтому нами оценена эффективность леналидомида с учетом уровня  $\beta_2$ -м и возраста больных.

В исследование вошли 5 больных, которым ранее была проведена успешная АТПСК (у 3 из них – двойная) с последующим переводом 2 пациентов на поддерживающую терапию талидомидом или бортезомибом. Остальные поддерживающую терапию не получали. Однако в последующем у всех 5 больных развился рецидив, в связи с чем им было начато лечение леналидомидом (R) либо леналидомидом в сочетании с дексаметазоном (Rd).

В результате проведенной терапии ОО (очЧО, ЧО) нами был зарегистрирован у 4 больных (табл. 3).

Таблица 3. Эффективность лечения леналидомидом у больных ММ с учетом предшествующей терапии, уровня  $\beta_2$ -м и возраста больных

Терапия (R, Rd, VRd), $\beta_2$ -м, возраст	ПО	очЧО	ЧО	МО	Стабилизация	Нет ответа
Предшествующее лечение с проведением аутоТПСК, $n = 5$	0	3 (60 %)	1 (20 %)	0	1 (20 %)	0
Предшествующее лечение леналидомидом и талидомидом, $n = 6$	0	3 (49 %)	1 (17 %)	1 (17 %)	1 (17 %)	0
Предшествующее лечение бортезомибом, $n = 16$	4 (25 %)	3 (18,7 %)	4 (25 %)	0	4 (25 %)	1 (6,3 %)
$\beta_2$ -м > 2,5 мг/л, $n = 18$	3 (16,8 %)	4 (22 %)	5 (27,8 %)	0	5 (27,8 %)	1 (5,6 %)
$\beta_2$ -м < 2,5 мг/л, $n = 16$	3 (18,7 %)	3 (18,7 %)	4 (25 %)	2 (12,6 %)	3 (18,7 %)	1 (6,3 %)
< 65 лет, $n = 23$	4 (17,4 %)	4 (17,4 %)	7 (30,4 %)	2 (8,7 %)	4 (17,4 %)	2 (8,7 %)
> 65 лет, $n = 11$	2 (18,2 %)	3 (27,3 %)	2 (18,2 %)	0	4 (36,3 %)	0

Длительность достигнутого ответа на момент оценки результатов лечения колебалась от 8 до 20 мес.

Двадцать два пациента до включения в настоящее исследование получали бортезомиб-, леналидомид- или талидомидсодержащие режимы терапии. В связи с прогрессией заболевания им было начато лечение леналидомидом. Как видно из табл. 3, у 5 (83,3 %) больных, ранее получавших леналидомид или талидомид, в ответ на леналидомид был зарегистрирован положительный ответ. В группе пациентов с предшествующей терапией бортезомибом ОО был ниже и составил 68,7 %. Однако обращало на себя внимание, что в этой группе больных в 25 % случаев достигнут ПО и в 18,7 % – очЧО (суммарный показатель – 43,7 %). В то же время среди пациентов, ранее лечившихся леналидомидом и талидомидом, получен только очЧО, равный 49 %. В подгруппах больных с разным уровнем  $\beta_2$ -м (> 2,5 мг/л или < 2,5 мг/л) существенных различий в частоте ОО и ПО не получено (66,6 % vs 75 % и 16,8 % vs 18,7 % соответственно;  $p > 0,05$ ). Наряду с этим установлено, что леналидомид преодолевает негативное влияние возраста на

эффективность лечения больных ММ. Как видно из табл. 3, ОО среди молодых пациентов (< 65 лет) был равен 73,5 %, а среди пожилых (> 65 лет) – 63,7 %. При этом получены практически равнозначные значения ПО (17,4 % и 18,2 %;  $p > 0,05$ ).

Длительность достигнутого ОО на момент оценки результатов лечения в целом по группе больных колебалась от 6 до 25 мес. Продолжительность ОО мы оценили также с учетом поддерживающей терапии. Как указывалось выше, после получения ответа была возможность 5 больным назначить леналидомид в качестве поддерживающей терапии (25 мг с 1-го по 21-й день 28-дневного цикла; от 12 до 36 циклов в 1 случае). Остальные пациенты поддерживающую терапию не получали. Ме продолжительности ответа в группе больных без поддерживающей терапии составила 10 мес, а с поддерживающей терапией – 20 мес ( $p < 0,05$ ).

Оценены показатели общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости пациентов, включенных в исследование. Кривая ОВ больных за весь период наблюдения показана на рис. 2, а бессобытийной – на рис. 3.

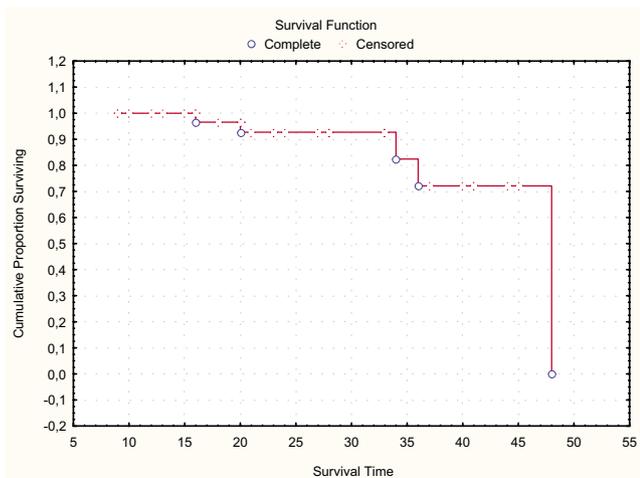


Рис. 2. Кривая ОВ больных ММ, получавших лечение леналидомидом

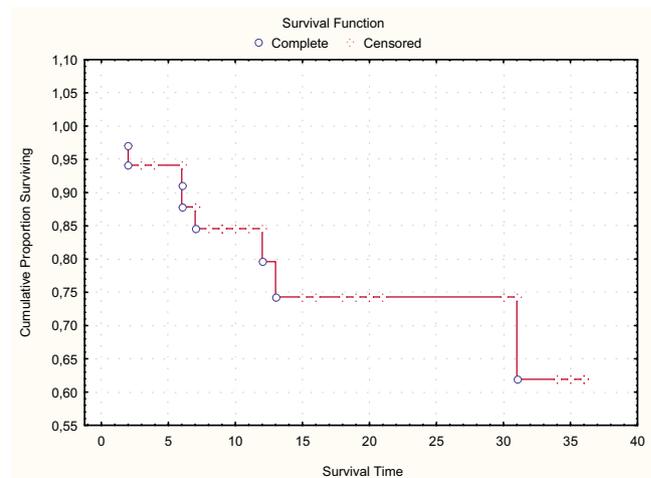


Рис. 3. Бессобытийная выживаемость больных ММ, получавших леналидомид

Как видно, Ме ОВ составила 48 мес, а бессобытийной не была достигнута. Учитывая то, что непосредственные результаты применения различных леналидомидсодержащих программ терапии имели умеренные отличия по частоте ОО, мы рассчитали ОВ в каждой группе больных.

Однако различий не обнаружено, т. е. ОВ больных ММ не зависела от выбранной схемы лечения. Однолетняя выживаемость в целом среди 34 больных составила 94 %, а 2-летняя – 88,3 %. Также было рассчитано время до прогрессирования заболевания. Ме времени до прогрессии за указанный период наблюдения не была достигнута (рис. 4).

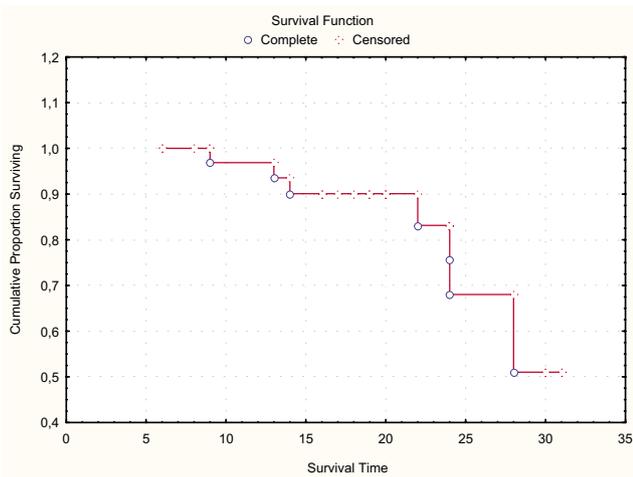


Рис. 4. Время до прогрессии заболевания у больных, получавших леналидомид

Как было показано выше, непосредственные результаты лечения больных в возрастных группах не различались. Мы проанализировали также показатели выживаемости больных, получавших леналидомид, с учетом их возраста ( $\leq 65$  лет и  $> 65$  лет). Группу больных в возрасте до 65 лет составили 23 пациента, а старше 65 лет – 11. Как видно из рис. 5, кривая выживаемости больных до 65 лет в течение

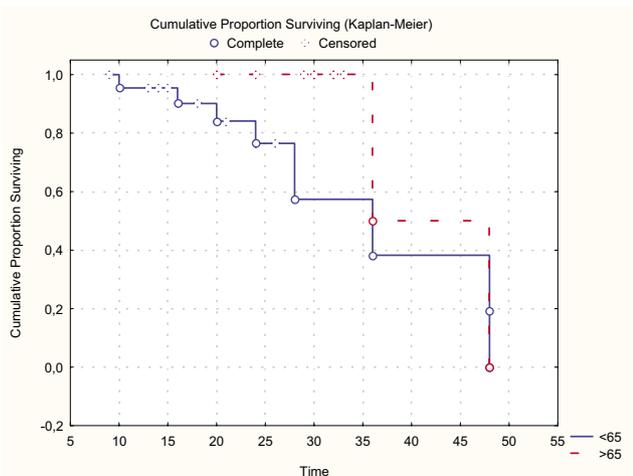


Рис. 5. ОВ больных ММ в возрастных группах, получавших леналидомид

3 лет наблюдения гораздо выше. В эти сроки 72,8 % пожилых пациентов ( $> 65$  лет) оставались в живых, а среди молодых ( $\leq 65$  лет) – 82,6 % ( $p < 0,05$ ). Между тем в последующем обе кривые сходятся, и Ме ОВ больных независимо от возраста составила 36 мес.

Кроме того, мы оценили показатели ОВ по Каплану–Майеру в подгруппах больных с учетом уровня сывороточного  $\beta_2$ -м ( $< 2,5$  мг/л и  $> 2,5$  мг/л). Повышенный уровень  $\beta_2$ -м обнаружен у 18 больных ММ. Как оказалось, Ме ОВ в этих подгруппах не имела существенных различий ( $p = 0,357$ ), т. е. леналидомид преодолевает негативное влияние высокого уровня  $\beta_2$ -м на выживаемость больных ММ (рис. 6).

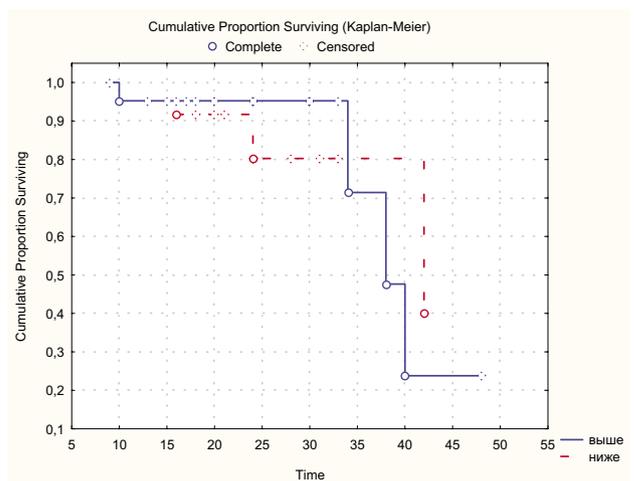


Рис. 6. ОВ больных ММ с учетом уровня  $\beta_2$ -м: выше – уровень сывороточного  $\beta_2$ -м  $> 2,5$  мг/л; ниже – уровень сывороточного  $\beta_2$ -м  $< 2,5$  мг/л

Далее нами произведен расчет показателей выживаемости в группах больных, получавших или не получавших поддерживающую терапию леналидомидом. Как показано на рис. 7, Ме ОВ в группе больных с поддерживающей терапией леналидомидом не достигнута, в то время как без поддерживающей те-

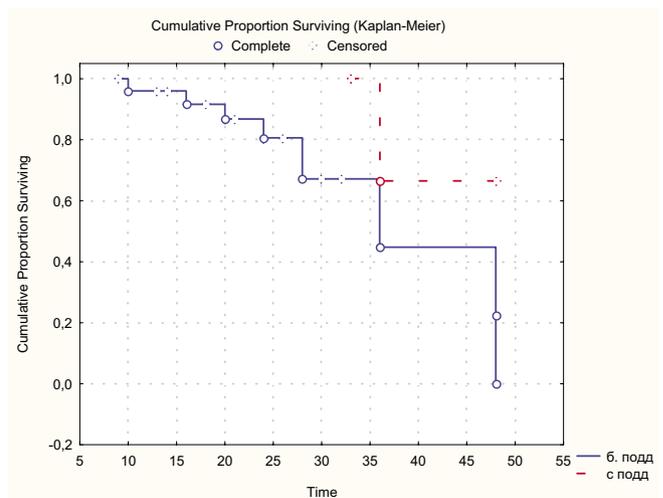


Рис. 7. Кривые ОВ больных ММ с учетом поддерживающей терапии леналидомидом: б. подд – без поддерживающей терапии, с подд – с поддерживающей терапией

рапии она составила 36 мес ( $p < 0,05$ ). Все пациенты, получавшие длительную терапию леналидомидом, на момент оценки результатов лечения живы.

Переносимость леналидомида у всех больных, вошедших в исследование, представлена в табл. 4. Обращала на себя внимание миелосупрессия. Наиболее часто при использовании леналидомида встречалась нейтропения (38,3 %), в преобладающем большинстве случаев III степени тяжести (23,5 %). В назначении колониестимулирующих факторов нуждались 11 (32,4 %) из 34 больных. У 3 пациентов в связи с развитием токсичности IV степени лечение леналидомидом временно приостанавливалось и при увеличении количества нейтрофилов ( $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$ ) возобновлялось с редукцией дозы леналидомида. Реже наблюдалось снижение числа тромбоцитов (23,7 %), при этом III степень развилась у 14,7 %, а IV – у 2 (6 %) больных, что было основанием для кратковременной отмены леналидомида и возобнов-

ления терапии при числе тромбоцитов  $> 30 \times 10^9/\text{л}$ . Однако геморрагических проявлений не наблюдалось, и необходимости в назначении тромбоконцентрата не было. У 11,7 % больных в процессе лечения леналидомидом развилась анемия II–III степени, не потребовавшая трансфузий эритроцитарной массы. Двум больным был назначен рекомбинантный эритропоэтин.

Из негематологических побочных явлений мы наблюдали инфекции, тромбоз глубоких вен нижних конечностей, жидкий стул и боли в костях скелета. Инфекционные осложнения развились у 14,7 % больных – инфекции верхних дыхательных путей, острый бронхит, herpes zoster и реже острая пневмония. Наиболее серьезным осложнением была острая пневмония (в 2 случаях). У 1 пациента, достигшего ПО, в межкурсовом периоде (после 6 циклов терапии) была выявлена очаговая пневмония. Однако это не повлияло на основную терапию. У другого больного с ЧО на леналидомид наблюдалось развитие тяжелой острой плевропневмонии через 2 недели после завершения 7-го цикла лечения леналидомидом. Обращало на себя внимание, что оба пациента имели длительный анамнез заболевания, у них установлена миелома IgA $\lambda$ , III стадия (в 1 случае с высоким уровнем  $\beta_2$ -м и нарушением функции почек), число линий предшествующей комбинированной терапии, включающей бортезомиб, талидомид, мелфалан, – более 3. Использование иммуномодуляторов на фоне существенно сниженных защитных сил организма и иммуносупрессии, по-видимому, было основной причиной развития тяжелых инфекций.

В 11,2 % случаев наблюдался астенический синдром, тяжесть которого не превышала I–II степени. Все больные, несмотря на появление усталости, могли продолжать лечение. У 3 (8,8 %) больных, получавших аспирин, обнаружен тромбоз глубоких вен нижних конечностей. Больным был назначен клексан в терапевтических дозах, а леналидомид отменен. После стабилизации состояния лечение было возобновлено, клексан продолжен в профилактических дозах. Артериальных тромбозов, кардиоваскулярных эпизодов мы не наблюдали. Значительно реже встречались гастроинтестинальные проявления (диарея, боли в животе). Среди больных, получавших трехкомпонентную терапию VRd, в 2 случаях наблюдалась периферическая нейропатия, вероятно, вызванная бортезомибом. Изредка регистрировались гипергликемия, гипертензия или ортостатическая гипотония. На усиление болей в костях скелета жаловались 2 (6 %) больных.

### Обсуждение

Таким образом, наш опыт по применению леналидомида у больных ММ с рецидивом или рефрактерностью к предшествующей терапии обнадеживает. Большинство больных ММ отвечает на терапию

Таблица 4. Побочные эффекты у больных, получавших леналидомид

Побочные эффекты	n = 34 (%)
Нейтропения	13 (38,3)
II степени	2 (6)
III степени	8 (23,5)
IV степени	3 (8,8)
Тромбоцитопения	8 (23,7)
II степени	1 (3)
III степени	5 (14,7)
IV степени	2 (6)
Фебрильная нейтропения	3 (8,8)
Анемия	4 (11,7)
Инфекции (инфекции верхних дыхательных путей, острый бронхит, пневмония, herpes zoster)	5 (14,7)
Тромбоз глубоких вен нижних конечностей	3 (8,8)
Жидкий стул	1 (3)
Боли в костях	2 (6)
Периферическая нейропатия (только среди больных 3-й группы)	2 (18,2) I степени – 1 больной II степени – 1 больной
Астенический синдром (усталость/слабость)	4 (11,2)

леналидомидом. ОО в группах больных, получавших леналидомид в монорежиме или в комбинированной терапии, не имел существенных различий. При использовании леналидомида в монорежиме не удалось добиться ПО, но в 50 % случаев зарегистрирован очЧО. Близкие результаты получены при назначении Rd и VRd. Общий ответ составил 70,5 % и 64 % ( $p > 0,05$ ). Обращало на себя внимание, что во 2-й и 3-й группах больных, в отличие от 1-й группы, ответ более качественный, а именно: удалось достичь ПО. Важное обстоятельство, которое было установлено в нашем исследовании, заключается в том, что лечение талидомидом и леналидомидом в анамнезе не повлияло на ответ (очЧО – 49 %, ЧО – 17 %). Аналогичным образом ответ не зависел от ранее проведенной терапии бортезомибом (ПО – 25 %, очЧО – 18,7 %, ЧО – 25 %). Отчетливый и длительный ответ на леналидомид зарегистрирован также в группе больных с рецидивом после АТПСК. Оценены показатели ОВ и бессобытийной выживаемости больных, вошедших в исследование. Ме ОВ больных составила 48 мес, а бессобытийной – не была достигнута. При этом, как выяснилось, ОВ больных ММ не зависела от выбранной схемы лечения. Однолетняя выживаемость составила 94 %, а 2-летняя – 88,3 %. Время до прогрессирования заболевания также не достигнуто.

Следует отметить, что леналидомид зарекомендовал себя в различных возрастных группах больных ММ ( $\leq 65$  лет и  $> 65$  лет). Получены равнозначные значения ПО (17,4 % и 18,2 % соответственно). Ме ОВ больных независимо от возраста составила 36 мес. Также показано, что леналидомид преодолевает негативное влияние повышенного уровня  $\beta_2$ -м.

Еще одно важное обстоятельство, которое заслуживает внимания, – необходимость длительной терапии леналидомидом. В нашем исследовании была возможность назначить леналидомид в качестве поддерживающей терапии 5 больным. Остальные пациенты поддерживающую терапию не получали. Ме продолжительности ответа в группе больных без поддерживающей терапии составила 10 мес, а с поддерживающей терапией – в 2 раза выше (20 мес;  $p < 0,05$ ). Наглядны результаты расчета показателей выживаемости больных: Ме ОВ в группе больных с поддерживающей терапией не достигнута, в то время как без поддерживающей терапии составила 36 мес.

В целом переносимость леналидомида вполне удовлетворительная. Наиболее часто встречалась нейтропения (38,3 %), причем в преобладающем большинстве случаев III степени тяжести. В 32,4 % случаев это было основанием для использования колониестимулирующих факторов. Однако лишь у 3 пациентов с IV степенью тяжести временно прерывалось лечение леналидомидом. Реже наблюдалась

тромбоцитопения, но без клинических проявлений. Как известно, при использовании иммуномодуляторов (леналидомида, талидомида) существует риск развития тромбоэмболических осложнений, в том числе тромбоэмболии легочной артерии. Причем при назначении больным с впервые выявленной ММ леналидомида в комбинации с высокими дозами дексаметазона частота тромбоэмболизма колеблется от 26 до 67 % [12, 13]. Риск тромбоза снижается до 12 % при назначении низких доз дексаметазона [12]. При резистентных/рецидивирующих формах ММ частота тромбоэмболических осложнений, по результатам многоцентровых исследований ММ-009 и ММ-010, составила 14,7 % и 11,4 % соответственно [2, 3]. В 2008 г. Международной рабочей группой по лечению множественной миеломы разработаны рекомендации по профилактике тромбоэмболизма у больных, получающих талидомид или леналидомид [14]. Предлагается учитывать факторы риска развития тромбозов. К ним относятся: венозные катетеры, химиотерапия, использование доксорубицина, эритропоэтинов, высоких доз дексаметазона, большая масса опухоли, присоединившиеся инфекции, пожилой возраст, предшествующие тромбозы, тромбофилия. Всем больным, получающим талидомид- или леналидомидсодержащие режимы терапии, рекомендуется назначать аспирин (при выявлении не более 1 фактора риска) или низкомолекулярные гепарины (в случае обнаружения  $> 1$  фактора риска). В нашем исследовании все пациенты в соответствии с рекомендациями получали аспирин либо клексан. Только у 3 (8,8 %) больных на фоне терапии леналидомидом развился тромбоз глубоких вен нижних конечностей, послуживший основанием для временной его отмены.

### Заключение

Таким образом, применение леналидомида дает возможность достичь высоких результатов лечения у больных с рецидивом/рефрактерностью к предшествующей терапии. Леналидомид одинаково эффективен у больных, получавших ранее различные программы химиотерапии, высокодозовые режимы, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, бортезомиб, талидомид, леналидомид. Применение леналидомида позволяет получить хорошие результаты как у больных молодого, так и пожилого возраста. Как показало наше исследование, с целью увеличения длительности достигнутого ответа и показателей выживаемости необходимым является применение леналидомида в качестве поддерживающей терапии. Длительное применение леналидомида требует тщательного наблюдения за больными.

Правильное использование леналидомида гематологами расширит их терапевтические возможности и приведет к улучшению помощи больным ММ.

## Л и т е р а т у р а

1. Бессмельцев С.С. Новые противоопухолевые препараты в лечении множественной миеломы. *Вестн гематол* 2006;2(2):27–41.
2. Weber D., Knight R., Chen C. et al. Prolonged overall survival with lenalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood* 2007;110:abstr. 412.
3. Dimopoulos M., Spencer A., Attal M. et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;357:2123–32.
4. Richardson P.G., Weller E., Jagannath S. et al. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5713–9.
5. Rajkumar S.V., Hayman S.R., Lacy M.Q. et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005;106:4050–3.
6. Kumar S.K., Lacy M.Q., Hayman S.R. et al. Lenalidomide, cyclophosphamide and dexamethasone (CRd) for newly diagnosed multiple myeloma: Results from a phase 2 trial. *Am J Hematol* 2011 Apr 18. doi: 10.1002/ajh.22053.
7. Palumbo A., Dimopoulos M.A., Delforge M. et al. A phase III study to determine the efficacy and safety of lenalidomide in combination with melphalan and prednisone (MPR) in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2009;114:253 (abstr. 613).
8. Blade J., Samson D., Reece D. et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998;102:1115–23.
9. Rajkumar S.V., Harousseau J.-L., Durie B. et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. Prepublished online Feb 3, 2011. doi:10.1182/blood-2010-10-299487.
10. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома. Современный взгляд на проблему. Алматы, 2007. 480 с.
11. Kurabayashi H., Kubota K., Tsuchiya J. et al. Prognostic value of morphological classifications and clinical variables in elderly and young patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 1999;78:19–23.
12. Rajkumar S.V., Jacobus S., Callander N.S. et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010;11:29–37.
13. Zonder A.J., Crowley J., Hussein M.A. et al. Lenalidomide and high-dose dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for multiple myeloma: a randomized Southwest Oncology Group trial. *Blood* 2010;116:5838–41.
14. Palumbo A., Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A. et al. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia* 2008;22:414–23.

# Прогнозирование геморрагических осложнений на этапах программного лечения детей со злокачественными новообразованиями и гемобластозами

В.В. Дмитриев, И.А. Дунаев

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

Контакты: Вячеслав Васильевич Дмитриев [dmitrievhaematol@mail.ru](mailto:dmitrievhaematol@mail.ru)

Достижение диагностического порога при уровне тромбоцитов  $< 28,0 \times 10^9/\text{л}$  и активности факторов протромбинового комплекса менее 40 % на фоне клиники системного воспалительного ответа позволяет предположить развитие спонтанного кровотечения в течение ближайших суток на этапах лечения пациента со злокачественным новообразованием или гемобластом. Число тромбоцитов  $> 28,5 \times 10^9/\text{л}$  в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее 40 % и отсутствием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), свидетельствуют о том, что изменения свертывания не могут быть самостоятельной причиной кровотечения и не требуют коррекции.

**Ключевые слова:** острый лейкоз, злокачественные новообразования, дети, нарушения свертывания крови, прогноз кровотечения

## Prediction of hemorrhagic complications during treatment of children with malignant diseases

V.V. Dmitriev, I.A. Dunaev

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus

Achievement of platelet diagnostic threshold less than  $28.0 \times 10^9/\text{l}$  and prothrombin activity less than 40 % with system inflammatory response (SIRS) were considered as high risk for spontaneous bleeding complication development within the next day in cancer patients. If platelets count is more than  $28.5 \times 10^9/\text{l}$  in a combination to prothrombin activity  $\geq 40$  % and absence of SIRS, it is possible to say that coagulations changes cannot be the independent cause of bleeding and does not require correction of coagulation parameters.

**Key words:** acute leukemia, malignant diseases, children, coagulation disorders, bleeding prognosis

### Введение

Геморрагические и инфекционные осложнения занимают одно из первых мест среди причин смерти пациентов со злокачественными новообразованиями и гемобластозами [1, 2]. Изменения функционального состояния свертывания крови, регистрируемые в процессе лечения больных онкологическими заболеваниями, в большинстве случаев обусловлены комбинированным дефектом плазменного звена на фоне тромбоцитопении [3, 4]. Для переливания тромбоконцентрата с профилактической целью пороговое значение числа тромбоцитов в крови пациентов, не имеющих дополнительных факторов риска развития кровотечения, в соответствии с рекомендациями Британского гематологического общества, составляет  $10 \times 10^9/\text{л}$  [5]. При наличии дополнительного фактора риска (мукозит; антикоагулянтная терапия; вероятность снижения уровня тромбоцитов  $< 10 \times 10^9/\text{л}$  к моменту следующего исследования крови и возможность развития кровотечения, обусловленного инфильтрацией опухолью) тромбоконцентрат с профилактической целью вводят при числе тромбоцитов  $< 20 \times 10^9/\text{л}$  [6]. Гиперлейкоцитоз, необходимость проведения индук-

ционной химиотерапии на фоне ДВС-синдрома, инфекционных осложнений характеризуют состояния, при которых показано введение тромбоконцентрата пациентам с уровнем тромбоцитов  $20\text{--}40 \times 10^9/\text{л}$  [5]. Для сочетанных нарушений плазменного и тромбоцитарного звена свертывания крови единых критериев, регламентирующих выбор и пороговые значения ключевых лабораторных показателей для распознавания вероятности кровотечения, не существует [7]. Ряд исследователей ориентированы на увеличение в 2 раза, по сравнению с контролем, активированного парциального тромбопластинового времени и/или протромбинового времени в сочетании со снижением уровня тромбоцитов крови  $< 50 \times 10^9/\text{л}$  [8]. Авторы отдельных публикаций для прогнозирования геморрагических осложнений рекомендуют использовать показатель эндогенного потенциала тромбина по тесту генерации тромбина [9].

**Цель исследования** – разработать систему определения ситуаций, при которых возможно развитие геморрагических осложнений на этапах лечения детей со злокачественными новообразованиями и гемобластозами.

### Материал и методы

Обследована группа детей (191 пациент) в возрасте от 1 года до 17 лет (медиана – 14 лет), находившихся на лечении в РНПЦДОГ с 2007 по 2010 г. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – 78 детей: тип L1 – 22, тип L2 – 56 пациентов. Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – 39 детей: тип M1 – 1 пациент, тип M2 – 9, M3 – 11, тип M4 – 6, M5 – 11 и 1 больной с типом M7. Хронический миелобластный лейкоз – 2. Миелодиспластический синдром – 3, вторичный гемофагоцитарный синдром – 3, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз – 4. Крупноклеточная анапластическая лимфома – 16, лимфома Ходжкина – 8. Солидные злокачественные опухоли имели 38 пациентов: медуллобластома – 16, нейробластома – 8, злокачественная опухоль органов малого таза – 5, гепатобластома – 5, эмбриональная саркома печени – 2, злокачественная опухоль яичка – 2. Мальчиков – 103, девочек – 88. Включено в исследование на этапе индукционной химиотерапии 120 больных, на этапе химиотерапии по поводу рецидива I или II – 29 больных, после аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ) – 33, аутологичной трансплантации периферических стволовых клеток – 9.

Для решения задачи по прогнозированию геморрагических осложнений из числа обследованных пациентов выделены 2 подгруппы: обучающая выборка – 82 ребенка и экзаменационная выборка – 109 детей. Обучающую выборку сформировали по принципу “case-control”: 41 пациент, у которых на день включения в исследование зарегистрировано спонтанно возникшее кровотечение с объемом кровопотери от 5,0 до 10,0 мл/кг массы тела в течение суток, и 41 пациент аналогичного возраста и пола с таким же диагнозом на том же этапе лечения, но без кровотечения (табл. 1). Экзаменационную выборку составили 24 ребенка с кровотечением и 85 детей без кровотечения. Тяжесть клинического состояния большинства пациентов с кровотечением в обеих выборках определяли признаки полиорганной недостаточности. Фебрильная лихорадка, рост уровня С-реактивного протеина (СРП) свыше  $6,4 \times 10^{-2}$  г/л и тахикардия, превышавшая возрастную норму на 20 %, были связаны с системным воспалительным ответом на инфекцию. Среди пациентов обучающей выборки с кровотечением на момент включения в исследование бактериологически доказанный сепсис, вызванный преимущественно грамотрицательной флорой, зарегистрирован у 25 больных, у 10 пациентов с клиникой тяжелого сепсиса не выделен возбудитель из крови. Среди 24 пациентов экзаменационной выборки с кровотечением сепсис был доказан бактериологически у 18 детей. Подавляющее большинство детей обучающей и экзаменационной выборки без геморрагических осложнений не имели клинических признаков синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и полиорганной недостаточности.

Оценка функционального состояния системы свертывания крови включала: регистрацию структурных и хронометрических показателей автоматическими коагулометрами ACL-200 и ACL-9000 (Instrumentation Laboratory, USA) с использованием диагностических наборов фирмы (Instrumentation Laboratory, USA); определение содержания в плазме крови фибриногена, коагулируемого тромбином, методом Claus; определение Д-димеров по тесту агглютинации с латексом (J. Soria et al., 1983) набором D-Dimer kit фирмы Instrumentation Laboratory, USA. Одностадийным клоттинговым методом у всех пациентов регистрировали активность факторов VIII и IX, а также факторов протромбинового комплекса II, V, VII и X с использованием соответствующих диагностических наборов фирмы Instrumentation Laboratory, USA. Качественную реакцию на присутствие растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ) выполняли методом агглютинации лиофилизированных донорских эритроцитов с использованием набора F.M. Test фирмы Diagnostica Stago, France; количественное определение ранних продуктов деградации фибриногена и фибрина (ПДФ) в плазме крови по тесту агглютинации частиц латекса с фиксированными на частицах антителами к ПДФ выполняли набором PDF/PLASMA фирмы Diagnostica Stago, France. Для коагуляционных показателей в качестве контроля использовали нормальную контрольную плазму, входящую в состав диагностических наборов фирмы Instrumentation Laboratory, USA. Представление результатов хронометрических тестов в виде относительной величины (R), равной отношению исследуемого хронометрического показателя к величине соответствующего показателя контрольной плазмы, позволило сравнивать их независимо от времени проведения исследования, активности используемых реагентов, а также без использования в качестве контроля показателей свертывания крови здоровых детей аналогичного возраста. Эндогенный потенциал тромбина (ЭПТ) регистрировали флуоресцентным методом H.C. Hemker [9] на приборе Fluoroskan ascent производства Thermo Electron corporation (Maastricht, Netherlands) с использованием наборов реагентов фирмы Thrombinoscope BV.

Для выполнения гемостазиологического исследования использовали 3,0 мл венозной крови, полученной путем пункции периферической вены без жгута. У пациентов, имевших кровотечение, исследование функционального состояния системы свертывания крови выполняли до начала гемостатической терапии.

Статистический анализ данных выполнен при помощи компьютерного пакета программ Statistica (версия 6.0). Количественные показатели описательной статистики представлены как медиана

Таблица 1. Общая характеристика детей, включенных в исследование по разработке модели прогноза кровотечения

Сравниваемый показатель	Кровотечение			
	Обучающая выборка		Экзаменационная выборка	
	да n = 41	нет n = 41	да n = 24	нет n = 85
Нозологическая структура больных:				
ОЛЛ L1	4	4	2	12
ОЛЛ L2	15	15	6	20
ОМЛ M1	0	0	0	1
ОМЛ M2	2	2	2	3
ОМЛ M3	0	0	1	10
ОМЛ M4	3	3	0	0
ОМЛ M5	2	3	2	4
ОМЛ M7	1	0	0	0
миелодиспластический синдром	1	1	0	1
вторичный гемофагоцитарный синдром	0	0	2	1
хронический миелолейкоз	0	0	1	1
гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз	1	1	1	1
медуллобластома	5	5	1	5
нейробластома	2	2	0	4
крупноклеточная анапластическая лимфома	3	3	3	7
лимфома Ходжкина	0	0	3	5
гепатобластома	0	0	0	5
опухоль малого таза	0	0	0	5
злокачественная опухоль яичка	1	1	0	0
эмбриональная саркома печени	1	1	0	0
Возраст, полных лет, медиана (25-й –75-й процентиля)	15,0 (4,5–17,0)	13,0 (5,0–16,0)	10,0 (3,5–17,0)	10,0 (3,0–15,0)
Мальчики/девочки	20/21	21/20	15/9	47/38
Обследованы на этапе:				
индукционной химиотерапии	25	25	11	59
химиотерапии по поводу рецидива I или II	7	7	7	8
после высокодозной химиотерапии и аллоТКМ	6	6	4	17
после высокодозной химиотерапии и аутотрансплантации периферических стволовых клеток	3	3	2	1
Локализация кровотечения:				
желудочно-кишечный тракт	34	0	22	0
легочное кровотечение	5	0	1	0
гемоторакс	1	0	1	0
кровотечение в области центральной нервной системы	1	0	0	0
Признаки ССВО на момент кровотечения:				
да	35	9	22	25
нет	6	32	2	60
Бактериальный сепсис	7	0	7	5
Бактериально-кандидозный сепсис	18	0	11	2
Сепсис не доказан бактериологически	10	9	4	6
Нет клиники сепсиса	6	32	2	72
<i>Всего</i>	82		109	

(25-й – 75-й процентиля), среднее и среднеквадратичное отклонение. Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по критерию Mann–Whitney (U-test). Значимыми признаны различия для  $p < 0,05$ . Взаимосвязь между анализируемыми событиями оценивали по величине коэффициента ранговой корреляции Gamma (G), значимой признана взаимосвязь для  $p < 0,01$ .

Расчет специфичности (Sp) и чувствительности (Se) лабораторных методов исследования, использованных для распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение, проводили в процессе построения ROC-curve (receiver operator characteristic curve) – характеристических кривых с определением порогового значения показателя.

### Результаты исследования и обсуждение

Удлинение активированного парциального тромбoplastинового времени (АПТВ) в сочетании со снижением активности факторов протромбинового комплекса и тромбоцитопения отличали пациентов обучающей выборки с кровотечением от детей, не имевших кровотечения на день исследования (табл. 2).

Тест на присутствие РКМФ у всех больных – отрицателен. ЭПТ у пациентов с кровотечением  $342,6 \pm 145,7$  нмоль/л мин был в 2,5 раза ниже ( $p = 0,0001$ ), чем у пациентов, не имевших кровотечения на день исследования –  $1254,6 \pm 329,0$  нмоль/л мин. Уровень Д-димеров –  $3,7 \pm 1,6 \times 10^{-3}$  г/л и ПДФ –  $31,0 \pm 19,5 \times 10^{-3}$  г/л в группе больных с кровотечением был выше, чем у пациентов без

Таблица 2. Изменения свертывания у детей, включенных в исследование по разработке модели прогноза кровотечения ( $X \pm SD$ )

Анализируемый показатель	Кровотечение						
	Обучающая выборка			Экзаменационная выборка			
	да $n = 41$	нет $n = 41$	$P$	да $n = 24$	нет $n = 85$	$P$	
АПТВ, с/(R)	$46,5 \pm 23,6$	$31,7 \pm 4,7$	0,0001	$49,7 \pm 18,5$	$32,5 \pm 5,2$	0,04	
	$1,57 \pm 0,8$	$1,07 \pm 0,6$	0,0001	$1,58 \pm 0,8$	$1,16 \pm 0,6$	0,02	
Протромбиновое время, с	$28,6 \pm 15,6$	$13,2 \pm 5,8$	0,0009	$36,8 \pm 21,6$	$16,7 \pm 5,8$	0,002	
	Активность факторов, %	$34,9 \pm 12,5$	$82,7 \pm 21,6$	0,0001	$36,4 \pm 15,7$	$58,8 \pm 22,6$	0,001
	МНО, ед	$2,84 \pm 1,66$	$1,33 \pm 0,87$	0,0006	$2,87 \pm 1,29$	$1,43 \pm 0,87$	0,002
Тромбиновое время, с (R), у. е.	$21,7 \pm 12,6$	$16,6 \pm 4,3$	0,93	$22,5 \pm 9,7$	$19,5 \pm 5,3$	0,9	
	$1,8 \pm 1,14$	$1,28 \pm 0,31$	0,38	$1,5 \pm 0,9$	$1,44 \pm 0,54$	0,8	
Фибриноген крови, г/л	$3,8 \pm 1,9$	$4,1 \pm 1,8$	0,64	$3,5 \pm 2,0$	$3,9 \pm 2,1$	0,5	
Антитромбин III, %	$69,9 \pm 25,7$	$101,4 \pm 22,3$	0,045	$72,4 \pm 33,5$	$82,5 \pm 29,9$	0,14	
Д-димер, $\times 10^{-3}$ г/л	$3,7 \pm 1,6$	$1,37 \pm 1,7$	0,0006	$1,35 \pm 1,4$	$1,4 \pm 1,2$	0,62	
ПДФ, $\times 10^{-3}$ г/л	$31,0 \pm 19,5$	$11,0 \pm 8,5$	0,02	$24,6 \pm 13,8$	$19,1 \pm 13,7$	0,06	
Активность фактора VIII, %	$130,5 \pm 67,2$	$122,4 \pm 33,7$	0,9	$125,0 \pm 30,0$	$133,5 \pm 40,6$	0,9	
Активность фактора IX, %	$85,1 \pm 44,1$	$101,8 \pm 49,5$	0,4	$92,0 \pm 41,0$	$107,5 \pm 66,5$	0,4	
Активность фактора II, %	$44,7 \pm 23,8$	–	–	$56,5 \pm 31,4$	$67,0 \pm 29,6$	0,4	
Активность фактора V, %	$63,5 \pm 44,7$	–	–	$74,4 \pm 43,8$	$66,0 \pm 20,2$	0,2	
Активность фактора VII, %	$30,9 \pm 19,1$	–	–	$37,5 \pm 27,5$	$63,6 \pm 17,6$	0,04	
Активность фактора X, %	$46,2 \pm 27,5$	–	–	$65,3 \pm 39,8$	$59,0 \pm 12,8$	0,15	
ЭПТ, нмоль/л мин	$342,6 \pm 145,7$	$1254,6 \pm 329,0$ $n = 21$	0,0001	$560,8 \pm 249,0$	$1061,6 \pm 416,0$	0,002	
Пик генерации тромбина, нмоль/л	$76,1 \pm 39,6$	$245,0 \pm 96,0$	0,0003	$101,5 \pm 56,1$	$266,5 \pm 91,8$	0,001	
Тромбоциты крови, $10^9$ /л	$21,5 \pm 19,1$	$111,0 \pm 50,3$	0,0001	$30,8 \pm 17,6$	$107,0 \pm 94,3$	0,0001	

$p$  – достоверность различия по критерию Mann–Whitney (U-test) для попарно не связанных вариантов

кровотечения –  $1,37 \pm 1,7 \times 10^{-3}$  г/л и  $11,0 \pm 8,5 \times 10^{-3}$  г/л соответственно.

Выявлена тесная корреляционная взаимосвязь между фактом кровотечения с одной стороны и изменением АПТВ ( $G = 0,57$ ;  $p = 0,0012$ ), активностью факторов протромбинового комплекса ( $G = -0,64$ ;  $p = 0,0001$ ), уровнем ПДФ ( $G = 0,48$ ;  $p = 0,002$ ), степенью тромбоцитопении ( $G = -0,64$ ;  $p = 0,00001$ ), величиной ЭПТ ( $G = -0,59$ ;  $p = 0,0001$ ) с другой стороны. Величина ЭПТ была взаимосвязана с изменением величины большинства структурных и хронометрических показателей, включая АПТВ ( $G = -0,32$ ;  $p = 0,0005$ ), протромбиновое время и активность факторов протромбинового комплекса ( $G = -0,31$ ;  $p = 0,005$  и  $G = 0,35$ ;  $p = 0,004$  соответственно). Не зависели от уровня ЭПТ степень тромбоцитопении ( $G = -0,002$ ;  $p = 0,97$ ) и уровень фибриногена в крови ( $G = -0,02$ ;  $p = 0,78$ ). Среди пациентов, не имевших кровотечения, минимальное значение ЭПТ составило  $> 500$  нмоль/л мин. У большинства больных с кровотечением значения ЭПТ зарегистрированы в диапазоне от 100 до 500 нмоль/л/мин. При уровне ЭПТ  $> 1100$  нмоль/л/мин ни один пациент не имел кровотечения. В диапазоне от 500 до 1100 нмоль/л/мин были представлены пациенты как с кровотечением, так и без кровотечения, что определило понятие «зона неопределенности».

Для определения чувствительности и специфичности ряда коагуляционных показателей, привлекаемых для распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение, были построены характеристические кривые. Наибольшая чувствительность ( $Se$ ) при максимальной специфичности ( $Sp$ ) была характерна для активности факторов протромбинового комплекса ( $Se = 98\%$  и  $Sp = 94\%$ ;  $p = 3,7 \times 10^{-14}$ ) и числа тромбоцитов в периферической крови ( $Se = 95\%$  и  $Sp = 86\%$ ;  $p = 3,7 \times 10^{-10}$ ). Чувствительность и специфичность показателя ЭПТ ( $Se = 95\%$  и  $Sp = 80\%$ ;  $p = 6,5 \times 10^{-8}$ ) несколько уступали аналогичным параметрам показателя активности факторов протромбинового комплекса. Специфичность и чувствительность других коагуляционных показателей были значительно ниже. Это определило выбор наиболее информативных и независимых друг от друга показателей свертывания, таких как число тромбоцитов и активность факторов протромбинового комплекса, привлекаемых для распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение. Учитывая наличие тесной взаимосвязи между величинами активности факторов протромбинового комплекса и ЭПТ, уступавшего по своей чувствительности и специфичности производному протромбинового времени, последний не был привлечен для последующего анализа.

Для пациентов, имевших кровотечение, были характерны: клиника ССВО на инфекцию, тромбоцитопения в диапазоне  $2,0-55,0 \times 10^9$ /л и снижение активности факторов протромбинового комплекса в диапазоне  $6,5-59\%$ . Большинство пациентов без

клиники системного воспалительного ответа с уровнем тромбоцитов  $> 50,0 \times 10^9$ /л и активностью факторов протромбинового комплекса более  $50\%$  не имели кровотечения. В каждой из подгрупп обучающей выборки присутствовали пациенты, у которых значения активности факторов протромбинового комплекса и уровня тромбоцитов соответствовали «зоне неопределенности». Поэтому ориентируясь на любой из 3 перечисленных признаков, дать правильный ответ о возможности кровотечения не представляется возможным. Данное обстоятельство стало поводом для построения дерева принятия решения с использованием 3 перечисленных признаков. Для этого были использованы результаты обучающей выборки по 41 паре пациентов (см. рисунок).

В соответствии с предлагаемым решением из 38 пациентов, не имевших клинику ССВО, кровотечение возникло у 6 детей с уровнем тромбоцитов  $< 16,5 \times 10^9$ /л. При уровне тромбоцитов  $> 16,5 \times 10^9$ /л и отсутствии признаков ССВО у 31 ребенка кровотечения не было. Снижение уровня активности факторов протромбинового комплекса менее  $40\%$  у 18 пациентов с клиникой ССВО сопровождалось кровотечением на день исследования.

Пациенты с клиникой ССВО, у которых активность факторов протромбинового комплекса превышала  $40\%$ , имели кровотечение в случае снижения уровня тромбоцитов в крови  $< 28,0 \times 10^9$ /л ( $\chi^2 = 11,0$ ;  $p = 0,009$ ).

Выявленные изменения позволили сформулировать важнейшее правило для принятия решения о возможности возникновения кровотечения на различных этапах химиотерапии у детей с гемобластозами и злокачественными новообразованиями:

1. Если нет клинических признаков ССВО, то кровотечение возможно при снижении уровня тромбоцитов  $< 16,5 \times 10^9$ /л.

2. Если число тромбоцитов  $< 28,5 \times 10^9$ /л в сочетании со снижением активности факторов протромбинового комплекса менее  $40\%$  на фоне доказанного ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания могут сопровождаться кровотечением. Пациент нуждается в неотложной ситуационной коррекции свертывания крови.

3. Если число тромбоцитов  $> 28,5 \times 10^9$ /л в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее  $40\%$  и отсутствием клинику ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания крови не могут быть самостоятельной причиной кровотечения. Пациент не нуждается в неотложной ситуационной коррекции свертывания крови.

4. Если один или два из 3 названных признаков достигают (или не достигают) диагностического порога (доказанный ССВО, активность факторов протромбинового комплекса менее  $40\%$  и содержание тромбоцитов крови  $< 28,5 \times 10^9$ /л), то имеющейся



40 % у пациентов с клиникой доказанного системного воспалительного ответа на генерализацию инфекционного процесса позволяет высказать предположение о развитии геморрагических осложнений в течение ближайших суток. Если нет признаков ССВО, ассоциированного с инфекцией, то кровотечение возможно при снижении уровня тромбоцитов

$< 16,5 \times 10^9/\text{л}$ . Если число тромбоцитов  $> 28,5 \times 10^9/\text{л}$  в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее 40 % и отсутствием ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания не могут быть самостоятельной причиной кровотечения, а пациент не нуждается в неотложной ситуационной гемостатической терапии.

## Л и т е р а т у р а

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. М.: Медпрактика-М, 2006. 504 с.
2. Rickles F.R., Falanga A., Montesinos P. et al. Bleeding and thrombosis in acute leukemia: What does the future of therapy look like? *Thromb Res* 2007;120(Suppl 2):99–106.
3. Hongo T., Okada S., Ohzeki T. et al. Low plasma levels of hemostatic proteins during the induction phase in children with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study by the JACLS. *Japan Association of Childhood Leukemia Study. Pediatr Int* 2002;44:293–9.
4. Дмитриев В.В., Дунаев И.А. Селективная коррекция нарушений гемостаза у детей с острым лейкозом и злокачественными новообразованиями. *Онкогематол* 2009;4:22–6.
5. Gibson B.E., Todd F., Roberts I. et al. Transfusion guidelines for neonates and older children. British Committee for standards in Haematology Transfusion Task Force: Writing group. *Br J Haematol* 2004;124(4):433–53.
6. Варфоломеева С.Р., Качанов Д.Ю., Шнейдер М.М. и соавт. Диспансерное наблюдение детей и подростков с онкогематологическими заболеваниями педиатром общей практики. *Онкогематол* 2008;1–2:63–7.
7. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Клиническая трансфузиология. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1988. 575 с.
8. Vigna P.D., Monfardini L., Bonomo G. et al. Coagulation disorders in patients with cancer: nontunneled central venous catheter placement with US guidance – a single institution retrospective analysis. *Radiology* 2009;253(1):249–52.
9. Hemker H.C., Dieri R.A., Smedt E.D., Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb hemost* 2006;96:553–61.

## Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов

Л.В. Мовчан

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

Контакты: Людмила Викторовна Мовчан [movchan-l@mail.ru](mailto:movchan-l@mail.ru)

Для возможности мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) методом проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) важным является выбор оптимальной комбинации моноклональных антител (МКА), основанный на четком представлении об иммунофенотипических особенностях лейкоэмических клеток, позволяющих отличить их от нормальных костномозговых аналогов.

Согласно полученным данным установлено, что лейкоэмические бласты при ОЛЛ из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) демонстрируют многочисленные иммунофенотипические aberrации. На опухолевых клетках более чем в 50 % случаев встречается асинхронная экспрессия дифференцировочных антигенов, в 42,6 % случаев ВП ОЛЛ наблюдается aberrантная экспрессия миелоидных маркеров. Основные отличия опухолевых клеток от нормальных костномозговых аналогов выражаются в интенсивности экспрессии таких маркеров, как CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58.

Таким образом, особенности интенсивности экспрессии антигенов CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58 опухолевыми клетками ВП ОЛЛ по сравнению с нормальными предшественниками В-лимфоцитов позволяют использовать эти маркеры в комбинации для мониторинга МОБ с целью прогнозирования исхода заболевания.

**Ключевые слова:** дети, острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, лейкоз-ассоциированный иммунофенотип, проточная цитофлуориметрия

### Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia

L. V. Movchan

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus

To allow minimal residual disease (MRD) monitoring using flow cytometry it is needed the optimal combination of monoclonal antibodies (MA), based on a precise knowledge of leukemic cells immunophenotypic features.

Multiple immunophenotypic aberrations in leukemic blasts of B-precursors ALL (BII ALL) were revealed. Asynchronous expression of differentiation antigens on tumor cells occurs in more than 50 % cases. Aberrant myeloid markers expression in 42.6 % BII ALL cases was observed. The main differences between tumor and normal bone marrow cells are the expression intensity of CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34 and CD58.

Thus, expression intensity pattern of CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58 on tumor cells compared with normal B-lymphocyte precursors allow to use these markers combination to MRD monitoring.

**Key words:** children, acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, leukemia-associated immunophenotype, flow cytometry

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) — наиболее часто встречаемая в детском возрасте опухоль, морфологическим субстратом которой являются незрелые клетки, коммитированные в В-линейном направлении. На сегодняшний день благодаря привлечению новейших диагностических средств и использованию современных протоколов лечения общая 5-летняя выживаемость пациентов составляет более 75 %. Основной проблемой, влияющей на бессобытийную выживаемость при ОЛЛ, в настоящее время остаются рецидивы заболевания. Исход рецидива крайне неблагоприятный как при проведении полихимиотерапии, так и при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [1–3].

В основе возникновения рецидивов лежит персистенция остаточных лейкоэмических клеток или минимальная остаточная болезнь (МОБ). Определение содержания остаточных опухолевых клеток возможно только с применением высокочувствительных методов исследования. Одним из таких методов определения МОБ является метод многопараметрической проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) с использованием моноклональных антител (МКА). Данный метод основан на идентификации лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток на момент диагностики и затем отслеживании клеток с установленными характеристиками на этапах противоопухолевой терапии среди нормальных костномозговых предшественников [4–6]. Таким образом, для возможности

мониторинга МОБ методом ПЦФ необходимо выбрать оптимальную комбинацию МКА, основываясь на четком знании иммунофенотипических особенностей лейкоэмических клеток, позволяющих отличить их от нормальных костномозговых аналогов.

**Целью данной работы** была оценка особенностей лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ВП ОЛЛ, включающих асинхронную экспрессию дифференцировочных маркеров, aberrантную экспрессию миелоидных/Т-линейных маркеров, а также изменения интенсивности экспрессии специфических маркеров для мониторинга МОБ.

#### Пациенты и методы

В исследование включены 286 детей в возрасте 0–18 лет (медиана 4 года) (154 мальчика и 132 девочки) с первичным ВП ОЛЛ, диагностированным в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Беларусь) в период с 2005 по 2011 г. Диагноз Про-В-ОЛЛ, Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ был установлен в соответствии с классификацией ВОЗ и на основании оценки иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток (EGIL-95) [7].

Анализ иммунофенотипических характеристик опухолевых клеток, полученных из костного мозга

(КМ) пациентов, выполняли методом многопараметрической ПЦФ. Для этого с использованием градиента плотности (Histopaque-1077 (Sigma)) из полученного после диагностической пункции образца КМ выделяли мононуклеарное кольцо, отбирали полученные клетки, проводили лизирование эритроцитов и дважды отмывали в растворе фосфатного буфера (Phosphate buffered saline – PBS). Затем полученную суспензию клеток в концентрации 1 млн/мл вносили в сухие пробирки (по 100 мкл) и добавляли МКА в количестве, указанном фирмой-производителем в инструкции по применению. Для диагностического иммунофенотипирования использовали панель МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, PE-Cy5 (табл. 1).

Для оценки интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity – MFI) маркеров CD10, CD20, CD34, CD38, CD58, CD45, CD19 и CD11a использовали следующую панель МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками PE, ECD, PE-Cy5 и PE-Cy7 (см. табл. 1). Анализ интенсивности флуоресценции маркеров проводили на лейкоэмических клетках 32 пациентов с ВП ОЛЛ до начала противоопухолевой терапии и для сравнения на нормальных предшественниках В-лимфоцитов КМ 14 здоровых доноров (доноры КМ для аллогенной трансплантации).

**Таблица 1.** Панели моноклональных антител для иммунофенотипической диагностики ОЛЛ

Для диагностического иммунофенотипирования FITC/PE/PC5	Для оценки интенсивности флуоресценции FITC/PE/ECD/PE-Cy5/PE-Cy7
IgG1(mouse) / IgG2a(mouse) / CD45	Syto16 / CD20 / CD45 / CD10 / CD19
CD45 / CD14 / –	Syto16 / CD58 / CD45 / CD10 / CD19
CD4 / CD8 / CD45	Syto16 / CD34 / CD45 / CD10 / CD19
CD3 / HLA-DR / CD45	Syto16 / CD11a / CD45 / CD10 / CD19
CD20 / CD5 / CD45	Syto16 / CD38 / CD45 / CD10 / CD19
CD7 / CD13 / CD45	
CD10 / CD117 / CD45	
CD19 / CD33 / CD45	
CD34 / CD22 / CD45	
CD2 / CD1a / CD45	
CD15 / CD11b / CD45	
sIgM / – / CD45	
CD65 / CD56 / CD45	
cyIgG1(mouse) / cyIgG2(mouse) / CD45	
cyIgM / – / CD45	
Tdt / cyCD79a / CD45	
cyMPO / – / CD45	
cyCD3 / – / CD45	

Все моноклональные антитела фирмы Beckman Coulter

Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин (согласно инструкции по применению фирмы-производителя). Для определения внутриклеточных антигенов дополнительно применяли состав реагентов для фиксации и пермеабиллизации (Becton Dickinson). После инкубации клетки однократно отмывали в растворе PBS с последующей фиксацией 1 % раствором параформальдегида. Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter) в программе СХР.

Критерием позитивности считали наличие экспрессии маркера на поверхности более чем 20 % лейкоэмических клеток. Для цитоплазматических антигенов лимит позитивности снижен до 10 % [7].

### Статистическая обработка результатов

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программу Statistica 6.0.

Результаты исследований интенсивности флуоресценции маркеров на лейкоэмических и нормальных предшественниках представлены в виде значений медианы и диапазона данных (25–75-й перцентили). Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с использованием теста Манна–Уитни. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Согласно рекомендациям EGIL-95 ВП ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия на поверхности опухолевых клеток специфичных маркеров разделяются на 3 подтипа: Про-В-ОЛЛ, Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ [7]. Иммунофенотипический диагноз ВП ОЛЛ ставится на основании экспрессии лейкоэмическими клетками 2 и более специфичных В-линейных маркеров: CD19, и/или CD79a, и/или CD22, кроме того, в большинстве случаев на лимфобластах присутствует экспрессия антигенов гистосовместимости II класса – HLA-DR и цитоплазматически выявляется фермент – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT). Иммунофенотипической особенностью Про-В-ОЛЛ, помимо наличия основных линейно-специфичных маркеров, является отсутствие на поверхности опухолевых клеток экспрессии антигена CD10 и цитоплазматического (су) IgM. Для Common В-ОЛЛ диагностическим критерием служит обязательное присутствие на лейкоэмических клетках маркера CD10 при условии отсутствия экспрессии су IgM, тогда как для Пре-В-ОЛЛ обязательным является выявление су IgM.

При анализе собственных данных мы определили, что у пациентов с ОЛЛ 90,5 % случаев приходится на долю ВП ОЛЛ, из которых 78,7 % составляют Common В-ОЛЛ, 12,9 % – Пре-В-ОЛЛ и 8,4 % – Про-В-ОЛЛ.

Иммунологическая классификация ВП ОЛЛ основана на представлении об экспрессии линейно-

специфичных и стадийно-специфичных антигенов на поверхности клеток в ходе нормальных этапов дифференцировки В-лимфоцитов (гематопонов). Однако в настоящее время установлено, что лейкоэмические бласты при ВП ОЛЛ демонстрируют многочисленные иммунофенотипические aberrации по сравнению с их нормальными гемопоэтическими аналогами [8]. Такие особенности определяют лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ) опухолевых клеток, который, в свою очередь, играет важную роль в диагностике ОЛЛ и мониторинге МОБ на этапах терапии заболевания.

Понятие ЛАИФ при ВП ОЛЛ включает в себя асинхронную экспрессию дифференцировочных маркеров; aberrантную экспрессию (коэкспрессию) миелоидных/Т-линейных маркеров; увеличение/снижение интенсивности экспрессии специфичных маркеров [8–11].

Хорошо известно, что в ходе нормального гемопоэза для каждого этапа созревания В-лимфоцитов характерен определенный спектр экспрессии антигенов. На самой ранней стадии (стадия Про-В лимфоцитов) В-предшественники экспрессируют CD34 и TdT, наблюдается низкая интенсивность экспрессии CD10, при этом отмечается полное отсутствие антигена CD20. По мере созревания клеток происходит постепенная потеря таких маркеров, как CD34 и TdT, и становится более выраженной экспрессия CD10 (стадия Пре-Пре-В-лимфоцитов). На следующей стадии постепенно появляется экспрессия CD20, внутриклеточного IgM и отмечается слабое проявление поверхностного IgM (стадия Пре-В-лимфоцитов). На этих стадиях клетки умеренно экспрессируют CD22, а также выявляется выраженная экспрессия антигена CD38. При переходе на стадию зрелых В-лимфоцитов происходит потеря экспрессии CD10, CD38, увеличивается уровень экспрессии маркера CD22. На поверхности зрелых клеток экспрессируется высокий уровень IgM. Умеренная экспрессия CD45 наблюдается на самой ранней стадии дифференцировки и увеличивается по мере созревания клеток. Такие маркеры, как CD19, CD79a и HLA-DR, позитивны на протяжении всех этапов дифференцировки В-лимфоцитов [8].

В результате нашей работы было установлено, что во всех случаях заболевания в той или иной степени выраженности встречаются иммунофенотипические aberrации, не свойственные нормальным гемопоэтическим предшественникам. Асинхронная экспрессия дифференцировочных маркеров наблюдалась в большинстве случаев ВП ОЛЛ (табл. 2А). Наличие экспрессии антигена CD34 было выявлено в 74 % ВП ОЛЛ, причем в 75,4 % случаев Common-В ОЛЛ и в 62,1 % – Пре-В ОЛЛ, которые соответствуют более зрелым стадиям нормального гемопоэза. Тогда как в 21,8 % случаев Про-В ОЛЛ экспрессия этого маркера не отмечена. Аналогичным образом

Таблица 2. Особенности экспрессии антигенов при ВП ОЛЛ

Маркер	Про-В ОЛЛ n (%)	Common-В ОЛЛ n (%)	Пре-В ОЛЛ n (%)	ВП ОЛЛ n (%)
<b>А</b>				
<b>CD10</b> (n = 24/225/37/286)				
Негативная экспрессия	24 (100)	0 (0)	3 (8,1)	27 (9,4)
Гетерогенная экспрессия	0 (0)	16 (7,1)	1 (2,7)	17 (5,9)
Гомогенная экспрессия	0 (0)	209 (92,9)	33 (89,6)	242 (84,6)
<b>CD20</b> (n = 24/224/36/284)				
Негативная экспрессия	23 (95,8)	135 (60,2)	16 (44,5)	174 (61,3)
Позитивная экспрессия	1 (4,2)	89 (39,8)	20 (55,5)	<b>110 (38,7)</b>
<b>CD34</b> (n = 24/224/37/285)				
Негативная экспрессия	5 (20,8)	55 (24,5)	14 (37,8)	74 (26)
Позитивная экспрессия	19 (79,2)	169 (75,4)	23 (62,1)	211 (74)
<b>TdT</b> (n = 20/162/34/216)				
Негативная экспрессия	5 (25)	6 (3,7)	4 (11,8)	15 (6,9)
Позитивная экспрессия	15 (75)	156 (96,3)	30 (88,2)	201 (93,1)
<b>CD34<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup></b> коэкспрессия	1 (4,2)	56 (25,1)	12 (33,3)	<b>69 (24,4)</b>
<b>CD45<sup>-</sup></b> (n = 23/222/36/286)	0 (0)	103 (46,4)	14 (38,9)	<b>117 (41,6)</b>
<b>Б</b>				
<b>Миелоидный антиген<sup>+</sup> (*)</b> (n = 24/212/36/272)	14 (58,3)	90 (42,4)	12 (33,3)	<b>116 (42,6)</b>
<b>CD13<sup>+</sup></b> (n = 24/222/36/282)	8 (33,3)	66 (29,7)	5 (13,9)	<b>79 (28)</b>
<b>CD33<sup>+</sup></b> (n = 24/220/35/279)	7 (29,2)	37 (16,8)	4 (11,4)	<b>48 (17,2)</b>
<b>CD15<sup>+</sup></b> (n = 23/208/35/266)	6 (26,1)	12 (5,8)	4 (11,4)	<b>22 (8,27)</b>
<b>CD117<sup>+</sup></b> (n = 23/216/36/276)	0 (0)	3 (1,4)	0 (0)	3 (1,1)
<b>В</b>				
<b>CD2<sup>+</sup></b> (n = 24/223/36/283)	1 (4,2)	7 (3,1)	2 (5,6)	10 (3,5)
<b>CD3<sup>+</sup></b> (n = 24/224/35/283)	0 (0)	2 (0,9)	0 (0)	2 (0,7)
<b>CD5<sup>+</sup></b> (n = 24/223/36/283)	1 (4,2)	5 (2,2)	0 (0)	6 (2,1)
<b>CD1a<sup>+</sup></b> (n = 24/217/35/276)	0 (0)	2 (0,9)	1 (2,9)	3 (1,1)
<b>CD7<sup>+</sup></b> (n = 24/224/36/284)	2 (8,3)	3 (1,3)	2 (5,6)	7 (2,5)
<b>CD4<sup>+</sup></b> (n = 24/223/36/283)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	1 (0,4)
<b>CD8<sup>+</sup></b> (n = 24/223/36/283)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(\*) – экспрессия хотя бы 1 миелоидного антигена.

наблюдалась нетипичная для соответствующих этапов нормальной дифференцировки экспрессия фермента TdT. В 25% случаев Про-В ОЛЛ данный антиген не выявлялся, в то время как у 96,3% пациентов с Common-В и у 88,2% с Пре-В ОЛЛ на опухолевых клетках отмечалась экспрессия TdT. Экспрессия маркера CD20, появление которого характерно для более поздней стадии гемопоэза В-лимфоцитов, наблюдалась в 1 (4,2%) случае из 23 Про-В ОЛЛ и в 89 (39,8%) случаях из 224 Common-В ОЛЛ, тогда как у 16 (44,5%) пациентов из 37 с Пре-В ОЛЛ экспрессия данного маркера была отрицательной. У 69 (24,4%) из 210 детей выявлена одномоментная

коэкспрессия маркеров разных стадий дифференцировки CD34<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>, причем данная aberrация чаще встречалась при Пре-В подтипе ОЛЛ (33,3%), в 25,1% случаев Common-В ОЛЛ и в 4,2% Про-В ОЛЛ соответственно. Отсутствие экспрессии антигена CD45 было выявлено у 117 (41,6%) из 286 пациентов. Однако во всех случаях Про-В ОЛЛ экспрессия данного маркера была позитивной.

Коэкспрессия миелоидных маркеров на поверхности опухолевых клеток была часто встречаемой aberrацией у пациентов с ВП ОЛЛ и наблюдалась в 116 (42,6%) из 272 случаев (табл. 2Б). Было установлено, что на лейкоэмических лимфобластах с раз-

личной частотой и интенсивностью экспрессируются такие миелоидные антигены, как CD13, CD117, CD15 и CD33. Наиболее часто, у 79 (28 %) из 282 пациентов, среди миелоидной коэкспрессии встречалась aberrантная экспрессия маркера CD13. С меньшей частотой была отмечена коэкспрессия маркеров CD33, CD15, CD117, что составляло 17,2 %; 8,27 % и 1,1 % случаев соответственно.

Экспрессия Т-линейных маркеров на лейкомиических клетках ВП ОЛЛ наблюдалась в редких случаях (табл. 2В). Так, коэкспрессия антигена CD2 была выявлена в 3,5 %, CD7 – в 2,5 %. Еще реже встречалась экспрессия таких маркеров, как CD5, CD1a, CD3 и CD4.

С учетом того, что aberrантная экспрессия антигенов других линий дифференцировки определялась менее чем в 50 % случаев ВП ОЛЛ, данные маркеры нецелесообразно включать в панель МКА для мониторинга МОБ.

Метод ПЦФ позволяет определить как процент клеток, экспрессирующих исследуемый маркер, так и интенсивность его флуоресценции (MFI), которая выражается в условных единицах (у. е.), соответствующих среднему каналу максимального свечения маркера. Показатели интенсивности флуоресценции отражают количество экспрессируемых антигенных молекул клетки.

Далее мы сравнивали интенсивность экспрессии значимых для диагностики ВП ОЛЛ антигенов CD45, CD19, CD10, CD20, CD34, CD11a, CD58, CD38 опухолевыми клетками у 32 пациентов до начала лечения и нормальными предшественниками В-лимфоцитов КМ у 14 здоровых доноров. Анализ полученных данных показал, что спектр MFI исследуемых маркеров на опухолевых клетках существенно отличается от их нормальных гемопоэтических аналогов (см. табл. 3 и рисунок).

Как представлено на рисунке, схема А, интенсивность экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 на лейкомиических клетках статистически значимо ниже по сравнению с нормальными предшественниками В-лимфоцитов. Так, медиана средней интенсивности флуоресценции данного маркера на опухолевых клетках составляла 3 (1–5) у. е. и 22 (19–24) у. е. на нормальных клетках соответственно ( $p < 0,0001$ ). Такая же тенденция была характерна относительно специфичного для В-лимфоцитов антигена CD19 (рисунок, схема Б). Медиана уровня экспрессии на лейкомиических клетках составляла 9 (5,5–12) у. е., тогда как на поверхности нормальных В-лимфоцитов – 14 (13–17) у. е. ( $p = 0,0005$ ). В противоположность предыдущим маркерам наблюдался достоверно высокий уровень интенсивности экспрессии на клетках ВП ОЛЛ таких антигенов, как CD10 и CD34 (рисунок, схемы В, Г). Медиана интенсивности экспрессии этих маркеров на опухолевых клетках была равна 19,5 (12,7–32,7)

и 7,5 (2,5–13,3) у. е., тогда как на нормальных клетках – 11,9 (10,4–13) и 2 (1,5–2) у. е. соответственно ( $p = 0,002$  и  $p = 0,0004$  соответственно). Выраженное различие в интенсивности флуоресценции было отмечено относительно антигена CD38 (рисунок, схема Д). Достоверно низкая экспрессия данного маркера наблюдалась на клетках пациентов с ВП ОЛЛ и составляла 11,5 (6–20) у. е., тогда как на нормальных В-предшественниках медиана его экспрессии была равна 43 (42–52) у. е. ( $p < 0,0001$ ). Согласно данным, представленным на рисунке, схемы Е и Ж, увеличение MFI на лейкомиических клетках было характерно для таких маркеров, как CD58 и CD11a. Так, на поверхности лейкомиических клеток медиана уровня экспрессии этих маркеров составляла 8,9 (6,9–11) и 0,6 (0,5–1) у. е., тогда как на нормальных предшественниках – 6 (5–7) и 0,5 (0,3–0,8) у. е. соответственно ( $p = 0,008$  и  $p = 0,04$  соответственно). Снижение уровня экспрессии в анализируемых образцах КМ пациентов с ВП ОЛЛ было отмечено для антигена CD20, но оно не имело статистической достоверности (рисунок, схема З). Так, медиана интенсивности флуоресценции на опухолевых клетках составляла 1,25 (0,7–3) у. е. и 2,5 (1,1–5) у. е. на нормальных предшественниках В-лимфоцитов соответственно ( $p = 0,06$ ).

Согласно полученным данным, очевидно, что лейкомиические бласты при ВП ОЛЛ имеют многочисленные иммунофенотипические aberrации по сравнению с их нормальными гемопоэтическими аналогами. На опухолевых клетках более чем в 50 % случаев встречается асинхронная экспрессия дифференцировочных антигенов, в 42,6 % ВП ОЛЛ наблюдается aberrантная экспрессия миелоидных маркеров. Однако основного внимания заслуживают различия уровней экспрессии таких маркеров, как CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58, на опухолевых клетках по сравнению с их нормальными костномозговыми аналогами, которые в той или иной степени наблюдаются в исследуемых образцах КМ пациентов с ВП ОЛЛ. Соответственно использование комбинации этих маркеров для мониторинга МОБ позволит с высокой специфичностью идентифицировать опухолевые клетки среди нормальных гемопоэтических предшественников КМ, как на этапе диагностики, так и в ходе противоопухолевой терапии, и тем самым идентифицировать пациентов с высокой вероятностью развития рецидива.

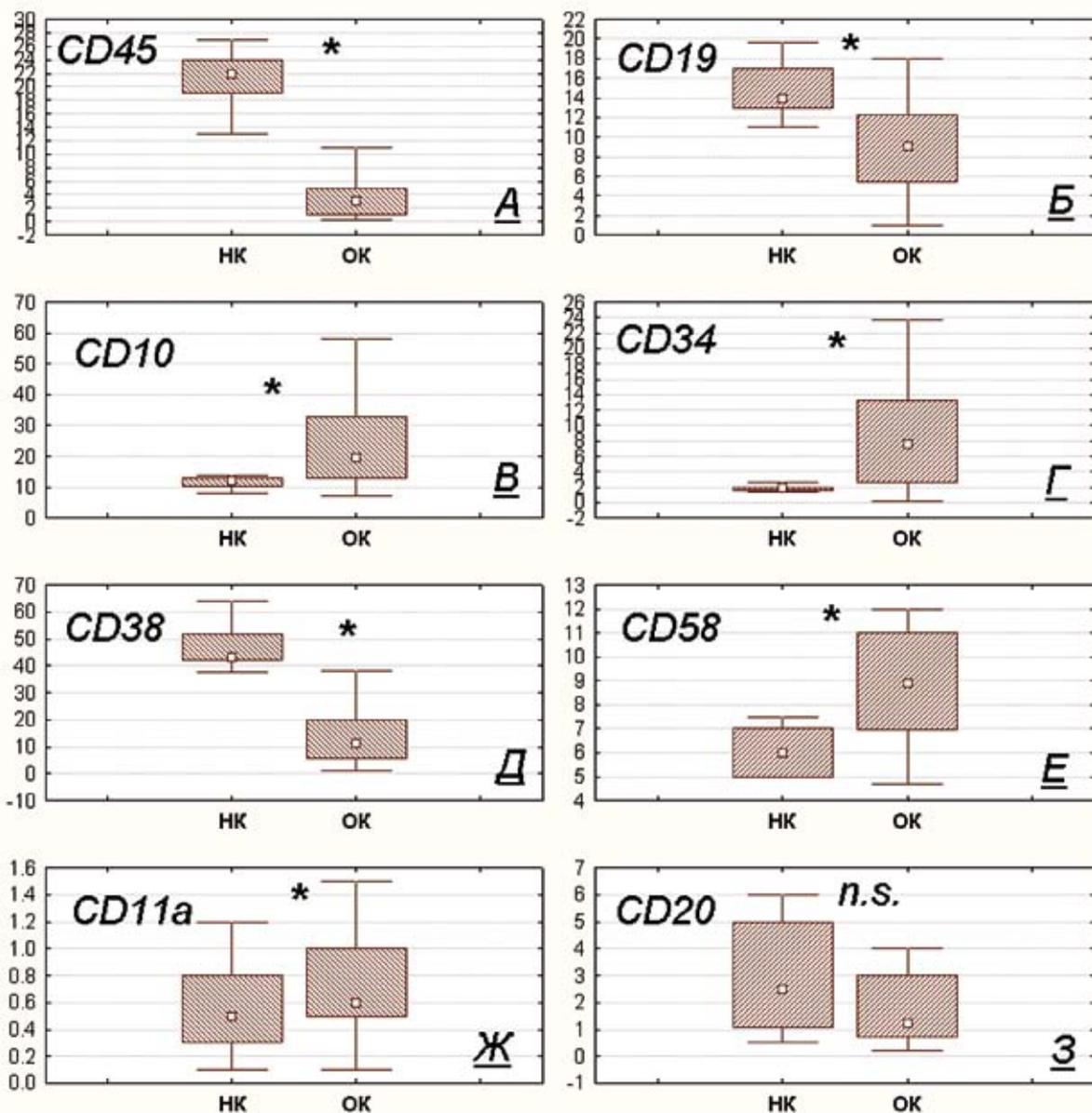
### Заключение

Различия в интенсивности экспрессии антигенов CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58 между опухолевыми клетками ВП ОЛЛ и нормальными предшественниками В-лимфоцитов позволяют использовать комбинацию этих маркеров для мониторинга МОБ с целью прогнозирования исхода заболевания.

Таблица 3. MFI опухолевых клеток и нормальных предшественников

Маркер	ОК ВП ОЛЛ, n = 32 Med (min–max)	В-предшественники, n = 14 Med (min–max)	p
CD45	3 (0,2–27)	22 (13–43)	0,000001
CD19	9 (1–41,8)	14 (11–19,7)	0,0005
CD10	19,5 (7–77)	11,9 (8–18)	0,002
CD34	7,5 (0,2–30)	2 (1,4–3)	0,00039
CD38	11,5 (1–54)	43 (37,7–64)	0,00000
CD58	8,9 (4,7–27)	6 (5–11)	0,008
CD11a	0,6 (0,1–2)	0,5 (0,1–1,2)	0,04
CD20	1,25 (0,2–11)	2,5 (0,5–12)	0,06

ОК – опухолевые клетки; достоверность  $p \leq 0,05$ .



Сравнение уровня экспрессии иммунофенотипических маркеров опухолевыми клетками ВП ОЛЛ и нормальными предшественниками В-лимфоцитов  
 НК – нормальные предшественники В-лимфоцитов; ОК – опухолевые клетки ВП ОЛЛ; ось Y – MFI;  
 \* –  $p < 0,05$ ; n.s. –  $p > 0,05$

## Л и т е р а т у р а

1. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691–6.
2. Moppet J., Burke G.A., Steward C.G. et al. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003;3:249–53.
3. Савва Н.Н. Актуальность и перспективы определения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе у детей. *Онкол журн* 2009;Т. 3;1(9):72–7.
4. van Dongen J.J., Seriu T., Panzer-Grümayer E.R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731–8.
5. Dworzak M.N., Fröschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952–8.
6. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111:5477–85.
7. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9:1783–6.
8. Seegmiller A.C., Kroft S.H., Karandikar N.J., McKenna R.W. et al. Characterization of Immunophenotypic Aberrancies in 200 Cases of B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;132(6):940–9.
9. Chen W., Karandikar N.J., McKenna R.W., Kroft S.H. Stability of leukemia-associated immunophenotypes in precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: a single institution experience. *Am J Clin Pathol* 2007;127(1):39–46.
10. McKenna R.W., Asplund S.L., Kroft S.H. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 2004;45:277–85.
11. Iwamoto S., Deguchi T., Ohta H. et al. Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2011;94:185–92.

## Использование ромиплостима в терапии тромбоцитопений после аллогенной трансплантации костного мозга

И.А. Лисуков, О.С. Успенская, А.Д. Кулагин, С.Н. Бондаренко,  
Т.А. Рудакова, О.А. Слесарчук, Б.В. Афанасьев

ГБОУ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
Минздравоохранения России; Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой

Контакты: Игорь Андреевич Лисуков igor\_lisukov@mail.ru

Персистирующая тромбоцитопения является частым осложнением после аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ). Основные причины развития тромбоцитопении включают повышенную деструкцию тромбоцитов антитромбоцитарными антителами, развитие микроангиопатий, вирусные инфекции, токсичность лекарственных препаратов, гипофункцию трансплантата с недостаточной продукцией тромбоцитов мегакариоцитами. Мы оценивали эффективность агониста тромбопоэтина (ТПО)-рецептора ромиплостима у 3 пациентов с рефрактерной тромбоцитопенией после аллогенной ТКМ.

Первому пациенту (30 лет) с резистентным рецидивом острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) была проведена гаплоидентичная ТКМ. У пациента развилась гипофункция трансплантата с геморрагическим синдромом, уровнем тромбоцитов  $5 \times 10^9/\text{л}$  на фоне течения цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции, острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП). Пациенту была проведена дополнительная инфузия донорского костного мозга, начата терапия ромиплостимом еженедельно 1 мкг/кг в течение 2 недель и 4 мкг/кг в течение следующих 2 недель. После достижения количества тромбоцитов  $50 \times 10^9/\text{л}$  терапия ромиплостимом была остановлена, однако уровень тромбоцитов снизился до  $5-7 \times 10^9/\text{л}$ . Терапия ромиплостимом была возобновлена в дозе 4 мкг/кг еженедельно в течение 5 недель. Уровень тромбоцитов достиг  $150 \times 10^9/\text{л}$ . При дальнейшем наблюдении у пациента тромбоцитопения не отмечалась. Второму пациенту (19 лет) была проведена гаплоидентичная ТКМ с целью консолидации второй ремиссии ОМЛ. У пациента была отмечена тромбоцитопения  $10 \times 10^9/\text{л}$  на фоне развития ЦМВ-инфекции и тяжелой ТТП. Ромиплостим был назначен еженедельно в дозе 4 мкг/кг в течение 5 недель. Уровень тромбоцитов превысил  $50 \times 10^9/\text{л}$ . Терапия ромиплостимом позволила избежать развития геморрагических осложнений и трансфузионной зависимости. Третьему пациенту (18 лет) была проведена аллогенная ТКМ от совместимого неродственного донора с целью консолидации второй ремиссии острого лимфобластного лейкоза. У пациента была документирована тромбоцитопения ( $5 \times 10^9/\text{л}$ ) с тяжелым геморрагическим синдромом и рефрактерностью к трансфузиям тромбоцитов на фоне развития ТТП и острой РТПХ. Пациент получил 1 введение ромиплостима в дозе 1 мкг/кг и 2 введения препарата в дозе 3 мкг/кг 1 раз в неделю. Геморрагический синдром был купирован, количество тромбоцитов составило  $20 \times 10^9/\text{л}$ . Терапия ромиплостимом была продолжена в дозе 5 мкг/кг в неделю в течение 2 недель с достижением стабильного уровня тромбоцитов более  $30 \times 10^9/\text{л}$ .

Эффективность ромиплостима у данных пациентов позволяет использовать агонисты ТПО-рецептора у пациентов после аллогенной ТКМ для лечения тяжелых тромбоцитопений, связанных с развитием ТТП, острой РТПХ, ЦМВ-инфекций и других посттрансплантационных осложнений.

**Ключевые слова:** ромиплостим, тромбоцитопения, аллогенная трансплантация костного мозга

### Romiplostim in thrombocytopenia treatment after allogeneic bone marrow transplantation

I.A. Lisukov, O.S. Uspenskaya, A.D. Kulagin, S.N. Bondarenko, T.A. Rudakova, O.A. Slesarchuk, B.V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Hematology and Transplantation, Pavlov State Medical University of St.-Petersburg

Persistent thrombocytopenia is a frequent complication after allogeneic bone marrow transplantation (BMT). The major causes of thrombocytopenia include accelerated platelet destruction by antiplatelet antibodies, microangiopathy, viral infection, drug toxicity, graft's hypofunction with insufficient production of platelets from megakaryocytes. We have evaluated an efficacy of TPO-receptor agonist romiplostim in treatment of 3 patients with refractory thrombocytopenia after allogeneic BMT.

The first 30 years old patient received haploidentical allogeneic stem cell transplantation for refractory AML relapse. He developed graft hypofunction due to CMV infection, acute GVHD and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) with platelet counts  $5 \times 10^9/\text{l}$  and bleeding complications. After bone marrow "boost" the patient received romiplostim 1 mkg/kg weekly during 2 weeks and 4 mkg/kg during another 2 weeks. Upon reaching platelet counts  $50 \times 10^9/\text{l}$  the romiplostim was stopped, but platelet count decreased to  $5-7 \times 10^9/\text{l}$  and romiplostim was administered in dose of 4 mkg/kg weekly during 5 weeks. Platelet counts have achieved  $150 \times 10^9/\text{l}$  and thrombocytopenia during further follow-up was not revealed.

The second 19 years old AML patient received haploidentical allogeneic stem cell transplantation for second remission consolidation. He developed thrombocytopenia ( $10 \times 10^9/\text{l}$ ) due to CMV infection and severe TTP. He received romiplostim 4 mkg/kg weekly and 5 weeks later platelet counts was  $50 \times 10^9/\text{l}$ . The administration of romiplostim was allowed to avoid bleeding complications and transfusion dependency. The third 18 years old ALL patient received MUD allogeneic stem cell transplantation for second remission consolidation. He developed profound thrombocytopenia ( $5 \times 10^9/\text{l}$ ) with severe hemorrhagic complications and platelet transfusions refractory due to TTP and acute GVHD. He received one dose of romiplostim 1 mkg/kg and two doses of 3 mkg/kg weekly with completion of hemorrhagic syndromes and

achieving  $20 \times 10^9/l$  blood platelet counts. Romiplostim was continued in dose 5 mkg/kg/wk during 2 weeks and stable platelet counts  $> 30 \times 10^9/l$  was achieved.

The romiplostim efficacy in these patients supports the use of TPO-agonists in patients after allogeneic BMT who developed severe thrombocytopenia due to TTP, CMV infections, acute GVHD and other posttransplant complications.

**Key words:** romiplostim, thrombocytopenia, allogeneic bone marrow transplantation

### Введение

Длительная персистирующая тромбоцитопения является достаточно частым осложнением после аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ). Тяжелая тромбоцитопения требует постоянной трансфузионной поддержки для профилактики и купирования кровотечений и оказывает непосредственное влияние на эффективность и исходы ТКМ. В исследовании D. Kim [1] было показано, что пролонгированная тяжелая тромбоцитопения, сохраняющаяся более 60 суток после аллогенной ТКМ, является независимым фактором риска плохого прогноза (снижение выживаемости, увеличение инфекционных осложнений). Согласно данным других авторов, плохой прогноз может быть обусловлен тромбоцитопенией, персистирующей более 90 дней после ТКМ [2, 3].

Причины посттрансплантационной тромбоцитопении достаточно разнообразны – гипофункция трансплантата, микроангиопатия, образование анти-тромбоцитарных и антимагакариоцитарных антител, токсическое влияние лекарств, рецидив основного заболевания [4]. При посттрансплантационных микроангиопатиях (тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТПП), гемолитико-уремический синдром) отмечается относительно низкая концентрация тромбопоэтина (ТПО) в сыворотке крови [5, 6], что также характерно для иммунной тромбоцитопении (ИТП) [7]. По данным ряда авторов [8, 9], важными факторами, влияющими на развитие длительной тромбоцитопении после ТКМ, служат количество трансплантированных CD34<sup>+</sup>-клеток и развитие цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции, при этом назначение ганцикловира

также может приводить к усугублению тромбоцитопении [10]. В работе X. Zhang [11] было выявлено, что длительная изолированная тромбоцитопения и медленное приживление тромбоцитарного ростка после аллогенной ТКМ в основном связаны с неэффективным мегакариопоэзом – снижением плоидности и незрелостью мегакариоцитов.

Таким образом, можно предположить, что независимо от причины длительно персистирующей тромбоцитопении после ТКМ, для коррекции данного синдрома могут быть эффективны терапевтические воздействия, стимулирующие созревание, пролиферацию, дифференцировку мегакариоцитов и продукцию тромбоцитов, – агонисты рецепторов ТПО. Ромиплостим и элтромбопаг являются наиболее изученными стимуляторами тромбоцитопоэза, прошедшими клинические исследования III фазы. Данные препараты эффективно стимулируют продукцию тромбоцитов у здоровых людей [12], пациентов с ИТП [13], миелодиспластическим синдромом [14], HCV-инфекцией [15]. Ниже представлено описание 3 клинических случаев использования ромиплостима для коррекции персистирующей тромбоцитопении после аллогенной ТКМ.

### Описание клинических случаев

**Клинический случай № 1.** Пациент А., 30 лет, диагноз ОМЛ, М0-вариант, трансформация из миелодиспластического синдрома. Первый ранний костно-мозговой рецидив. Вторичная химиорезистентность.

Пациенту выполнена гаплоидентичная ТКМ. Характеристика трансплантата представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика трансплантата

№	Диагноз	Вид ТКМ	Источник трансплантата	Клеточность трансплантата, CD34 <sup>+</sup> × 10 <sup>6</sup> /кг	Пол донора	АВО-совместимость	CMV-статус пациента	CMV-статус донора
1	ОМЛ, 2-й резистентный рецидив	гаплоТКМ	Костный мозг + ПСКК	2,8 × 10 <sup>6</sup> /кг + 4,2 × 10 <sup>6</sup> /кг	Жен.	Полная	Положит.	Отрицат.
2	ОМЛ, 2-я ремиссия	гаплоТКМ	Костный мозг + ПСКК	1,2 × 10 <sup>6</sup> /кг + 2,8 × 10 <sup>6</sup> /кг	Жен.	Полная	Положит.	Отрицат.
3	Острый лимфобластный лейкоз, 2-я ремиссия	Неродств. аллоТКМ	ПСКК	8,3 × 10 <sup>6</sup> /кг	Жен.	Полная	Положит.	Отрицат.

Режим кондиционирования включал немиелоаблативные дозы флударабина и бусульфана, для профилактики РТПХ использовали такролимус  $0,03$  мг/кг с дня (Д)+1 и циклофосфан в дозе  $50$  мг/кг в Д+3 и Д+4.

В табл. 2 представлены данные, характеризующие восстановление гемопоэза. С момента приживления трансплантата достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия заболевания и полный донорский химеризм, сохранявшиеся весь период наблюдения.

Таблица 2. Характеристика приживления трансплантата

№	Нейтрофилы более $0,5 \times 10^9$ /л	Тромбоциты более $20 \times 10^9$ /л	Тромбоциты более $100 \times 10^9$ /л
1	Д+12	Д+13	Д+21
2	Д+18	Д+19	Д+27
3	Д+21	Д+12	Д+25

В Д+23 была диагностирована бессимптомная реактивация ЦМВ-инфекции с максимальным титром вируса в крови  $5,62 \times 10^4$ /мл, что потребовало проведения терапии ганцикловиром в дозе  $5$  мг/кг/день с последующим переводом на прием валганцикловира в дозе  $900$  мг/день.

В Д+38 в связи с увеличением в гемограмме количества шизоцитов ( $4\%$ ), ретикулоцитозом  $26\%$ , нарастающей тромбоцитопенией  $3-4 \times 10^9$ /л с появлением кожного геморрагического синдрома, рецидивирующих носовых кровотечений и трансфузионной зависимости, повышением уровня лактатдегидрогеназы ( $892$  Ед/л), развитием общезлобовой симптоматики и азотемии была диагностирована ТТП. Остановлен прием такролимуса, проведен короткий курс терапии метилпреднизолоном в дозе  $1$  мг/кг/день в течение  $7$  дней, достигнуто купирование общезлобовой симптоматики, нормализация функции почек, однако уровень тромбоцитов оставался крайне низким, сохранялась трансфузионная зависимость.

Д+63: у пациента отмечено развитие острой РТПХ кожи II степени, возобновлена терапия метилпреднизолоном в дозе  $1$  мг/кг и базовая иммуносупрессия такролимусом.

После Д+100 у пациента стали отмечаться признаки гипофункции трансплантата.

В Д+146 в связи с нарастающей цитопенией (лейкоциты  $1,0 \times 10^9$ /л, тромбоциты  $5 \times 10^9$ /л), резистентной к терапии гранулоцитарным колоние-стимулирующим фактором и эритропоэтином, присоединением геморрагического синдрома была выполнена дополнительная трансфузия донорского костного мозга (CD34<sup>+</sup>;  $1,2 \times 10^6$ /кг веса пациента).

В Д+146 была начата терапия ромиплостимом в начальной дозе  $1$  мкг/кг подкожно  $1$  раз в неделю. После  $2$  недель лечения была достигнута стабилизация

уровня тромбоцитов более  $10 \times 10^9$ /л с купированием геморрагического синдрома. С 3-й недели терапии доза препарата была увеличена до  $4$  мкг/кг, выполнено  $2$  введения с интервалом  $7$  дней.

В Д+180 тромбоциты достигли уровня  $50 \times 10^9$ /л. Терапия ромиплостимом была остановлена, однако в дальнейшем было отмечено углубление тромбоцитопении до  $5-7 \times 10^9$ /л с возобновлением кожного геморрагического синдрома, потребовавшего трансфузий тромбоцитов. В Д+180 выполнена трепанобиопсия костного мозга, выявлено резкое сужение мегакариоцитопоэза и снижение функциональной активности мегакариоцитов на фоне нормальных показателей миелоидного и эритроидного ростков кроветворения.

Введение ромиплостима возобновлено с Д+221 в дозе  $4$  мкг/кг. После  $2$  недель терапии была достигнута стабилизация числа тромбоцитов более  $15 \times 10^9$ /л с купированием геморрагического синдрома. Терапия была продолжена в прежней дозе в течение  $5$  недель с достижением дальнейшего роста числа тромбоцитов более  $50 \times 10^9$ /л и  $150 \times 10^9$ /л соответственно в Д+255 и Д+270. При дальнейшем наблюдении уровень тромбоцитов оставался стабильным.

**Клинический случай № 2.** Пациент Б.,  $19$  лет, диагноз ОМЛ, М5-вариант. Первый ранний костномозговой рецидив. Вторая полная клинико-гематологическая ремиссия.

Родственных и неродственных совместимых доноров у пациента не было. С целью консолидации ремиссии пациенту было предложено проведение гаплоидентичной аллогенной ТКМ (см. табл. 1). Режим кондиционирования включал немиелоаблативные дозы флударабина и бусульфана, для профилактики РТПХ использовали циклоспорин  $3$  мг/кг/день с Д+1 и циклофосфан в дозе  $50$  мг/кг в Д+3 и Д+4.

Полный донорский химеризм достигнут в Д+21, данные по восстановлению показателей периферической крови представлены в табл. 2.

Д+35: диагностирована реактивация ЦМВ-инфекции, что потребовало назначения противовирусной терапии (валганциклоvir  $900$  мг/сут с последующим переводом на терапию ганцикловиром в дозе  $10$  мг/кг/день в связи с нарастанием титра вируса в крови).

Д+49: геморрагический цистит вирусной этиологии (ЦМВ + ВК-вирус (полиомавирус)), к противовирусной терапии добавлен внутривенный иммуноглобулин в дозе  $0,3$  г/кг/день в течение  $7$  дней.

В Д+62 диагностирована ТТП (общезлобовая симптоматика, артериальная гипертензия, нарастающая почечная и печеночная недостаточность, шизоциты  $8\%$ , ретикулоцитоз  $56\%$ , быстро нарастающая тромбоцитопения  $30 \times 10^9$ /л, увеличение уровня лактатдегидрогеназы ( $1800$  Ед/л)). Остановлена терапия циклоспорином А, начата терапия метилпреднизолоном в дозе  $1$  мг/кг/день. В течение недели достигнуто разрешение полиорганной недостаточности, купиро-

вание общемозговой симптоматики, однако уровень тромбоцитов продолжал прогрессивно снижаться ( $10 \times 10^9/\text{л}$ ) в Д+76.

Д+78: пациенту начата терапия ромиплостимом в дозе 4 мкг/кг, всего было выполнено 5 еженедельных введений без эскалации дозы препарата. В течение первых 2 недель терапии отмечена стабилизация уровня тромбоцитов, что позволило избежать развития трансфузионной зависимости и геморрагических осложнений. С 3-й недели отмечен постепенный рост числа тромбоцитов до  $25 \times 10^9/\text{л}$ ,  $35 \times 10^9/\text{л}$  и  $45 \times 10^9/\text{л}$  соответственно в Д+92, Д+100 и Д+108.

После прекращения введения ромиплостима уровень тромбоцитов оставался стабильным (более  $50 \times 10^9/\text{л}$ ).

**Клинический случай № 3.** Пациент С., 18 лет, диагноз острый лимфобластный лейкоз, ВП вариант. Первый поздний изолированный костномозговой рецидив. Вторая клинико-гематологическая ремиссия.

Пациенту была выполнена аллогенная ТКМ от полностью совместимого неродственного донора (табл. 1). Режим кондиционирования включал немиелоаблативные дозы флударабина и бусульфана, для профилактики РТПХ использовали алемтузумаб 30 мг Д+1, такролимус 0,03 мг/кг/день с Д+7, микофенолата мофетил 30 мг/кг/день с Д+7.

Приживление трансплантата было документировано в Д+21. Данные миелограммы подтвердили сохранение ремиссии заболевания и наличие полного донорского химеризма. Отмечалось быстрое восстановление числа тромбоцитов (табл. 2).

С момента приживления трансплантата документирована реактивация ЦМВ-инфекции с максимальным титром вируса в крови  $6,28 \times 10^5/\text{мл}$ . Несмотря на проводимую терапию ганцикловиром в дозе 10 мг/кг/день, персистенция вируса сохранялась, что привело к развитию ЦМВ-ассоциированного геморрагического цистита в Д+31, а также тяжелой двусторонней пневмонии смешанного генеза (ЦМВ + аспергиллез). Проводилась этиотропная терапия: ганцикловир 10 мг/кг, вориконазол 400 мг/сут.

В Д+28 диагностирована острая РТПХ с поражением кожи II степени. Была начата терапия метилпреднизолоном в дозе 1 мг/кг/день с положительным эффектом, снижение дозы препарата начато через 2 недели с полной отменой в Д+60.

Д+80: рецидив РТПХ кожи II степени и одновременно быстрое нарастание общемозговой неврологической симптоматики, почечной недостаточности и лабораторных изменений (в гемограмме: шизоциты 10 %, ретикулоциты 30 %, тромбоциты  $31 \times 10^9/\text{л}$ , лактатдегидрогеназа 950 Ед/л). Диагностирована ТТП, отменен такролимус, возобновлена терапия метилпреднизолоном в дозе 1 мг/кг/день.

На этом фоне был достигнут быстрый регресс проявлений органной недостаточности и РТПХ, однако сохранялась стойкая тенденция к нарастанию тромбоцитопении до  $10 \times 10^9/\text{л}$  с развитием выражен-

ного геморрагического синдрома (кожные геморрагии, носовые кровотечения). Отмечена резистентность к трансфузиям тромбоцитов.

Д+83: усилена терапия ТТП, начато введение ритуксимаба в дозе 375 мг/м<sup>2</sup>. После 2 введений препарата с интервалом в 7 дней улучшения не достигнуто. Сохранялась глубокая тромбоцитопения  $5 \times 10^9/\text{л}$ , прогрессировал геморрагический синдром (рецидивирующие носовые кровотечения, кровоизлияния в конъюнктиву глаз, обширные кожные геморрагии). Сохранялась резистентность к трансфузиям тромбоцитов. Кроме того, у пациента был диагностирован инвазивный аспергиллез с поражением придаточных пазух носа, вследствие чего доза вориконазола была увеличена до 600 мг/сутки.

Учитывая крайне высокий риск развития неконтролируемой инфекции на фоне продолжения терапии ритуксимабом, отсутствие эффекта от проводимой терапии, дальнейшее введение препарата остановлено.

В Д+132 начато введение ромиплостима в начальной дозе 1 мкг/кг. В течение 7 дней отмечено отсутствие прогрессии геморрагического синдрома, стабилизация тромбоцитов на уровне  $15 \times 10^9/\text{л}$ . Доза препарата увеличена до 3 мкг/кг/день в Д+139 и Д+146. Отмечен рост числа тромбоцитов более  $20 \times 10^9/\text{л}$ . В дальнейшем выполнено еще 2 введения ромиплостима в дозе 5 мкг/кг с интервалом в 1 неделю, что позволило добиться стабилизации уровня тромбоцитов более  $30 \times 10^9/\text{л}$ . Дальнейшие введения ромиплостима не проводились. Необходимо отметить, что у пациента сохранялась длительная персистенция ЦМВ в крови в высоком титре, что требовало постоянной терапии противовирусными препаратами, при этом количество тромбоцитов сохранялось стабильным, показаний для трансфузий тромбоцитов у больного не было.

### Обсуждение

Ромиплостим является тромбоцитопоэз-стимулирующим фактором роста, состоящим из 2 IgGFc-доменов и 4 белковых молекул ТПО-миметика. Механизм действия ромиплостима аналогичен эндогенному ТПО, при этом препарат ему не гомологичен и не вызывает выработку блокирующих антител [16].

В литературе имеются единичные публикации об использовании ромиплостима для коррекции тромбоцитопении после ТКМ. S. Gangatharan представил клиническое наблюдение, свидетельствующее об эффективности ромиплостима для коррекции персистирующей ИТП после аутологичной ТКМ у ВИЧ-инфицированного пациента с ОМЛ. В посттрансплантационном периоде у больного развилась тяжелая ИТП, резистентная к преднизолону (100 мг/день). Внутривенное введение больших доз (60 г) иммуноглобулинов и назначение ритуксимаба (375 мг/м<sup>2</sup>) оказались неэффективны. В Д+80 был назначен ромиплостим (375 мкг в неделю). В Д+111

количество тромбоцитов превысило  $20 \times 10^9/\text{л}$ , а в Д+130 –  $100 \times 10^9/\text{л}$ . В течение последующих 2 недель препарат был отменен [17].

Еще одна публикация свидетельствует об эффективности ромиплостима для купирования резистентной ИТП, развившейся у 4-летнего ребенка с X-связанной адренолейкодистрофией после аллогенной ТКМ. Тромбоцитопения оказалась рефрактерна к введению внутривенных иммуноглобулинов (1 г/кг/день в течение 2 дней), анти Rho(D) иммуноглобулина (35 мкг/кг), метилпреднизолона (2 мг/кг в день в течение 4 дней), винкристина (1 мг/кг) в сочетании с дексаметазоном (40 мг/м<sup>2</sup> в день в течение 4 дней), ритуксимаба (375 мг/м<sup>2</sup> – 4 инфузии). На фоне данной терапии количество тромбоцитов не превышало  $10 \times 10^9/\text{л}$ , в Д+73 у пациента было диагностировано кровоизлияние в головной мозг. В Д+83 был назначен ромиплостим в дозе 1 мкг/кг в неделю с последующей эскалацией дозы до 3 мкг/кг в неделю. После 4-го введения ромиплостима количество тромбоцитов превысило  $50 \times 10^9/\text{л}$  и препарат был отменен. Через 2 недели количество тромбоцитов достигло  $150 \times 10^9/\text{л}$  [18].

Данные клинические наблюдения свидетельствуют об эффективности ромиплостима при развитии ИТП после ТКМ. Во всех представленных нами клинических случаях у пациентов были сочетанные причины для длительной персистирующей тромбоцитопении – реактивация вирусной инфекции, назначение ганцикловира, развитие ТТП и РТПХ. Кроме того, у первого пациента с трансформацией миелодиспластического синдрома в ОМЛ была диагностирована гипофункция трансплантата, потребовавшая дополнительного введения донорского костного мозга. Также необходимо отметить достаточно глубокую тромбоцитопению у всех больных (менее  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), клинически значимый геморрагический синдром и развитие рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов в первом и третьем наблюдении.

Тем не менее использование ромиплостима оказалось эффективным у всех наших больных, при этом «безопасный» уровень тромбоцитов достигался в течение 2–3 недель терапии с использованием относительно небольших доз препарата (1–3 мкг/кг). У 2-го пациента более раннее назначение ромиплостима позволило избежать развития геморрагического синдрома и трансфузионной зависимости.

У всех пациентов были клинико-лабораторные признаки развития ТТП, в патогенезе которой, как и при ИТП, отмечается относительно низкая продукция ТПО [5, 6]. Вероятно, использование агонистов ТПО-рецептора после аллогенных ТКМ особенно оправданно при развитии таких осложнений, как ТТП.

В опубликованных клинических исследованиях ромиплостим дозозависимо стимулировал тромбоцитопоз с пиком подъема количества тромбоцитов на 12–16-й день. Время до начала ответа в среднем составило от 1 до 4 недель [19]. Создается впечатление, что назначение агонистов ТПО-рецептора может быть недостаточным при неотложных ситуациях, связанных с критической тромбоцитопенией. В связи с этим представляется целесообразным более раннее включение ТПО-миметиков в комбинированную терапию персистирующих тромбоцитопений после аллогенных ТКМ для профилактики развития жизнеугрожающих геморрагических осложнений и трансфузионной зависимости, что было достигнуто у нашего 2-го пациента.

Наиболее частыми побочными эффектами при назначении ромиплостима, судя по публикациям результатов клинических исследований, были умеренные головные боли и боль в горле. Мы не отмечали каких-либо побочных эффектов при применении данного препарата нашими больными.

Таким образом, литературные данные и наш первый клинический опыт показывает, что агонисты ТПО-рецептора могут быть высокоэффективны в комбинированной терапии персистирующих тромбоцитопений после аллогенной ТКМ.

## Л и т е р а т у р а

1. Kim D., Sohn S., Jeon S. et al. Prognostic significance of platelet recovery pattern after allogeneic HLA-identical sibling transplantation and its association with severe acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:101–8.
2. Bolwell B., Pohlman B., Sobecks R. et al. Prognostic importance of the platelet count 100 days post allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:419–23.
3. First L., Smith B., Lipton J. et al. Isolated thrombocytopenia after allogeneic bone marrow transplantation: existence of transient and chronic thrombocytopenic syndromes. *Blood* 1985;65:368–74.
4. Yamazaki R., Kuwana M., Mori T. et al. Prolonged thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: associations with impaired platelet production and increased platelet turnover. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:377–84.
5. Hijiya K., Wada H., Shimura M. et al. Increased serum levels of thrombopoietin in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura? Idiopathic thrombocytopenic purpura, or disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997;8(6):345–9.
6. Usui K., Tahara T., Iki S. et al. Serum thrombopoietin level in various hematological diseases. *Stem Cells* 1996;14(5):558–65.
7. Aledort L., Hayward C., Chen M. et al. Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. *Am J Hematol* 2004;76(3):205–13.
8. Keever-Taylor C., Klein J., Eastwood D. et al. Factors affecting neutrophil and platelet reconstitution following T cell-depleted bone marrow transplantation: differential effects of growth factor type and role of CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:791–800.
9. Singhal S., Powles R., Treleaven J. et al. A low CD34+ cell dose results in high mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should  $2 \times 10^6$  CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant* 2000;26:489–96.
10. Verdonck L., de Gast G., van Heugten H. et al. Cytomegalovirus infection causes delayed platelet recovery after bone marrow transplantation. *Blood* 1991;78:844–8.
11. Zhang X., Fu H., Xu L. et al. Prolonged thrombocytopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with a reduction in ploidy and an immaturation of megakaryocytic. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:274–80.
12. Wang B., Nichol J., Sullivan J. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of AMG 531, a novel thrombopoietin receptor ligand. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:628–38.
13. Bussel J., Kuter D., George R. et al. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *N Engl J Med* 2006;255:1672–81.
14. Steensma D. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 2011;38(5):635–47.
15. Panzer S. Eltrombopag in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and HCV-related thrombocytopenia. *Drugs Today* 2009;45(2):93–9.
16. Bussel J., Kuter D., George J. et al. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *N Engl J Med* 2006;335:1672–81.
17. Gangatharan S., Cooney J. Persistent thrombocytopenia post auto-SCT for AML treated with romiplostim in a patient with HIV. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(9):1280–1.
18. Beck J., Burke M., Tolar J. Response of refractory immune thrombocytopenia after bone marrow transplantation to romiplostim. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:490–1.
19. Rank A., Weigert O., Stermann H. Management of chronic immune thrombocytopenic purpura: targeting insufficient megakaryopoiesis as a novel therapeutic principle. *Biologics: Targets & Therapy* 2010;4:139–45.

## **Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (обзор литературы)**

**Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев**

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева  
Минздравоохранения России, Москва

**Контакты:** Татьяна Викторовна Шаманская totti111@list.ru

*Пуповинная кровь (ПК) в настоящее время является привлекательным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для трансплантации в детской практике и у взрослых пациентов с различными злокачественными и незлокачественными заболеваниями. Однако ее применение в клинике ограничено низким количеством клеток в трансплантате, что коррелирует с отсроченным приживлением, удлинением времени до восстановления тромбоцитов и нейтрофилов, развитием инфекционных осложнений. Для решения этой проблемы было предпринято несколько попыток, одна из которых – получение достаточного количества гемопоэтических клеток-предшественников путем ex vivo экспансии. В данной статье проведен обзор литературы, посвященный особенностям экспансии ГСК ПК.*

**Ключевые слова:** пуповинная кровь, ex vivo экспансия, цитокины

### **Umbilical cord bloods hematopoietic stem cells ex vivo expansion (the literature review)**

**T.V. Shamanskaya, E.Yu. Osipova, S.A. Roumiantsev**

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

*Umbilical cord blood (CB) is now an attractive source of hematopoietic stem cells (HSCs) for transplantation in pediatric and adult patients with various malignant and non-malignant diseases. However, its clinical application is limited by low cells numbers in graft, which correlates with delayed engraftment, an extension of time to platelets and neutrophils recovery and increasing risk of infectious complications. Several strategies have been suggested to overcome this limitation, one of which is obtaining a sufficient number of hematopoietic progenitor cells by ex vivo expansion. Literature review about CB HSCs expansion in given article is presented.*

**Key words:** cord blood, ex vivo expansion, cytokines

#### **Введение**

С тех пор как S. Knudtson в 70-х годах XX века в своей работе описал наличие стволовых клеток в пуповинной крови (ПК), а в 80-х годах была выполнена первая трансплантация ПК от сиблинга пациенту с анемией Фанкони, ПК стала привлекать все большее внимание как источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для проведения аутогенных и аллогенных трансплантаций [1]. Преимуществами ГСК, полученных из ПК, по сравнению с ГСК костного мозга (КМ) являются аутокринная продукция ряда гемопоэтических ростовых факторов, более длинные участки теломер, высокий пролиферативный потенциал [2, 3].

В настоящее время существует более 70 заболеваний, при которых используется трансплантация ГСК ПК. Это и заболевания крови, и иммунодефицитные состояния, болезни обмена и др. Однако ввиду небольшого количества клеток-предшественников в единице ПК ее применение для трансплантации было ограничено в основном использованием в детской практике (при расчете числа ядросодержащих клеток (ЯСК) не менее  $2,5 \times 10^7$ /кг веса реципиента). Недостаточное количество ГСК в транспланта-

те приводит к удлинению времени до приживления нейтрофилов и тромбоцитов, ведет к увеличению количества тяжелых осложнений, летальности, повышению стоимости лечения в связи с более длительным пребыванием больного в стационаре необходимости назначения дополнительных препаратов (антибактериальных, противогрибковых, противовирусных и др. средств) и длительной инфузии компонентов крови. Поэтому применение ПК как источника ГСК для трансплантации у взрослых ограничено.

Для улучшения результатов трансплантации ПК (ускорения времени приживления нейтрофилов и тромбоцитов) используется несколько стратегий, таких как трансплантация 2 единиц ПК, ко-трансплантация CD34<sup>+</sup>- или CD133<sup>+</sup>-селектированной периферической крови от третьего лица и ГСК ПК [4, 5]. В качестве попытки преодоления низкого числа клеток-предшественников в ПК было предложено применение ex vivo экспансии клеток в жидкой среде с/без добавления сыворотки и коктейля из ростовых факторов. Поможет ли этот метод получить достаточное количество клеток для трансплантации, уменьшит ли это время до приживления, улучшит

ли результаты трансплантации – еще предстоит решить. В настоящее время используется несколько стратегий по экспансии и применению ГСК ПК. Это экспансия целой единицы ПК, либо экспансия ее части (1/2 или 1/3), которая пересаживается в тот же день, что и неманипулированная часть ПК или спустя какое-то время (обычно на день +14).

Важной является проблема дифференцировки ГСК, которая происходит при экспансии этих клеток.

#### Метод изоляции ГСК ПК для экспансии

Существует 2 стратегии выбора ГСК ПК для экспансии – это использование неселектированной моноклеарной (MNC) фракции ПК и проведение селекции клеток.

В экспериментальных исследованиях было показано, что при экспансии селектированной CD34<sup>+</sup>-фракции удается добиться лучших результатов экспансии ПК, чем при экспансии MNC-фракции (увеличение общего числа клеток в 113 раз при селекции, против увеличения в 1,4 раза при выборе моноклеарной фракции ПК) [6]. Однако в других работах по экспансии ГСК КМ было показано, что при проведении селекции часть ГСК, клеток-предшественников теряется [7].

Существует как минимум 2 маркера для селекции ГСК ПК – это CD34 и CD133.

CD34 – гликопротеин, который экспрессируется на эндотелиальных клетках и ГСК. CD133 – это гликопротеин, ранее называвшийся AC133. Он экспрессируется на незрелых гемопоэтических клетках и клетках-предшественниках.

В основе селекции CD34<sup>+</sup>- и CD133<sup>+</sup>-клеток лежит магнитно-активируемый клеточный сортинг (magnetic activated cell sorting – MACS), основанный на использовании антитела, связанного с микрочастицами, сделанными из железодекстранового комплекса, например, с использованием систем Miltenyi MACS system (Biotec, Inc., Auburn, CA, USA) или Baxter Isolex device (Baxter Deerfield, IL, USA) и др. При этом удается добиться чистоты селекции CD34<sup>+</sup>- или CD133<sup>+</sup>-клеток в пределах 90 % [8–10]. Ряд фенотипических и функциональных исследований показал, что CD133<sup>+</sup>-фракция ПК содержит большее количество ранних гемопоэтических клеток-предшественников, чем CD34<sup>+</sup>-фракция [11, 12]. И возможно, именно CD133<sup>+</sup>-клетки играют главную роль в лимитировании апоптоза, за счет межклеточного взаимодействия или выделения растворимых факторов [13–15].

Кроме того, для изоляции клеток-предшественников был предложен альтернативный путь, основанный не на фенотипе, а на функциональной активности клеток. Считают, что этот метод является более важным для уменьшения количества дифференцированных клеток в результате экспан-

сии. В его основе лежит селекция клеток на основе определения активности альдегиддегидрогеназы (aldehyde dehydrogenase – ALDH). Это метод легко воспроизводим, не токсичен для клеток человека и не изменяет их репопулирующую функцию. Дальнейшие исследования должны подтвердить выполнимость селекции клеток на основе определения активности альдегиддегидрогеназы для клинического применения [16].

При выборе метода изоляции ГСК для экспансии следует исходить из объема ПК, подвергающегося селекции, его клеточности, стоимости самой процедуры и общего числа клеток, которое необходимо получить для трансплантации.

#### Выбор питательной среды

Одной из важных основ для выполнения экспансии ГСК ПК является выбор питательных сред. Питательные среды должны быть максимально подобраны по своему составу, содержанию питательных субстанций, осмотической резистентности и pH для определенного типа клеток. Для экспансии ГСК возможно использование целого ряда питательных сред, таких как DMEM, Alpha-MEM, X-Vivo-10, QBSF-60, StemSpan SFEM, RPMI, CellGro и др.

IMDM является основной и наиболее часто используемой питательной средой. Это модифицированная версия питательной среды DMEM, которая дополнительно содержит аминокислоты, биотин, витамины (B<sub>12</sub>) и селен [17].

Животная сыворотка традиционно включается в протоколы экспансии как источник факторов роста. Но при ее применении возможно развитие аллергических реакций, вирусной контаминации, а также необходимо учитывать ее вариабельность от партии к партии. Поэтому в протоколах для клинического применения стараются использовать бессывороточные питательные среды. Но такие среды слишком дороги и не всегда свободны от продуктов животного происхождения. Многие рекомбинантные цитокины и факторы роста получают из клеточных культур, выращенных на питательных средах с добавлением животной сыворотки. Кроме того, эти среды всегда подкреплены инсулином, трансферрином и альбумином, которые имеют рекомбинантное или аллогенное происхождение.

Относительно применения бессывороточных питательных сред существуют противоречивые данные. Ряд зарубежных и отечественных авторов показывают, что использование некоторых бессывороточных сред (QBSF-60 или StemSpan SFEM) позволяет получить несколько большее количество ранних предшественников (CD34<sup>+</sup>- и CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-клеток), чем при использовании стандартной среды IMDM с добавлением животной сыворотки [18]. Ученым из Республики Беларусь удалось добиться увеличения CD34<sup>+</sup>-клеток ПК более чем в 200 раз при культивировании

в бессывороточной питательной среде StemSpan при использовании цитокинов IL-3, IL-6, CSF, FLt-3. Добавление к культурам мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из КМ, способствовало дополнительному увеличению CD34<sup>+</sup>-клеток более чем в 700 раз [19].

В качестве альтернативы животной сыворотке возможно использование аутологичной сыворотки ПК. Допустимо замораживание плазмы уже при первичной заготовке единицы ПК. Однако в ряде исследований показано, что ее добавление к питательным средам приводит к значительному снижению ранних предшественников CD34<sup>+</sup>- и CD34<sup>+</sup>CD38-клеток. Это происходит в результате того, что человеческая плазма содержит факторы, способствующие созреванию клеток [20]. Кроме того, заготовка и хранение аутологичной плазмы ПК приведет к дополнительным финансовым затратам для Банков ПК.

На клеточный выход в результате экспансии оказывает свое влияние и плотность пассажа. Особо важное значение это имеет для ПК ввиду потенциального ограничения клеток для экспансии и высокой вариабельности от донора к донору. Оптимальной является плотность пассажа 1×10<sup>4</sup>–1×10<sup>6</sup> клеток/мл. Следует учитывать, что если среда содержит сыворотку, то плотность клеток при пассаже может быть меньше. И это может быть связано с эндогенной продукцией клетками ростовых факторов [21]. Если же используется бессывороточная среда, то большее количество клеток используется для пассажа. Особенно это имеет значение при культивировании в перфузионных культуральных системах.

### Цитокины

С начала 1980-х годов XX века исследователи стали использовать разные комбинации цитокинов и ростовых факторов для экспансии ГСК, стремясь выбрать не только более эффективную комбинацию, но и наиболее пригодную для клинического применения. На настоящий момент идентифицировано и выделено более 30 факторов, которые влияют на пролиферацию и дифференцировку ГСК [22]. Среди них эритропоэтин (erythropoietin – EPO), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-SCF), фактор стволовых клеток (stem cell factor – SCF), тромбопоэтин (thrombopoietin – TPO), FLt-3 лиганд (FLt-3/FLt-2 ligand – FL), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor – Fgf), интерлейкины-1, 3, 6, 11 (interleukin – IL-1, IL-3, IL-6/sIL-6R, IL-11) [23–26].

Наиболее важным фактором, влияющим на выживаемость клеток-предшественников даже при отсутствии их деления, является SCF [27]. SCF – лиганд для тирозинкиназных рецепторов *c-kit*, которые

экспрессируются на ранних и зрелых гемопоэтических клетках-предшественниках. Использование для экспансии только одного SCF не дает существенного увеличения количества клеток [25]. В сочетании же с другими ростовыми факторами он влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток миелоидной, лимфоидной, эритроидной и мегакариоцитарной линий и потенцирует действие других ростовых факторов [28].

TPO – самый активный фактор в отношении стимуляции мультипотентных стволовых клеток и клеток тромбоцитарного ряда. Он является активатором пролиферации и дифференцировки незрелых мегакариоцитов [29].

Считается, что TPO и FL предотвращают деградацию теломера, а SCF и IL-6 увеличивают пролиферативный потенциал ГСК. FL в комбинации с другими ростовыми факторами значительно усиливает клоногенную активность клеток-предшественников [30–32].

Описано влияние FL на адгезивность ГСК к микроокружению КМ за счет изменения степени экспрессии и функциональных свойств β-1-интегринов. Это оказывает важное влияние на хоуминг ГСК при трансплантации [33].

В комбинации с IL-3 и IL-6 TPO оказывает потенцирующее действие на колониформирующую активность мегакариоцитов (colony-forming unit megakaryocytic – FU-Meg) [34]. Однако он влияет и на клетки миелоидной и эритроидной линий дифференцировки [35].

IL-6, взаимодействуя с рецептором (IL-6-R), приводит к гомодимеризации молекулы gp130, которая в свою очередь запускает внутриклеточные сигнальные пути и играет важную роль в гемопоэзе. Однако как и другие ростовые факторы, он не оказывает одиночного влияния на экспансию ГСК, а проявляет свое действие совместно с другими цитокинами. Уже только добавление в среду с IL-6 SCF приводит к усилению пролиферации человеческих гемопоэтических клеток-предшественников *in vitro* [35].

Различные комбинации ростовых факторов оказывают разное действие на степень пролиферации и апоптоза клеток-предшественников. Так, использование комбинации TPO, FL дает увеличение числа CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>-клеток периферической крови при наличии наиболее низкого числа апоптотических клеток, чем при использовании комбинации IL-3, IL-6 и лейкоз-ингибирующего фактора (LIF), при которой отмечено даже снижение количества экспансируемых клеток [36].

Различные доклинические и клинические протоколы могут включать в себя и различные комбинации ростовых факторов: SCF, IL-3, IL-6 и G-CSF; SCF, TPO и G-CSF; FL, SCF, IL-3, IL-6 и G-CSF.

При подборе наиболее оптимальной комбинации ростовых факторов в доклинических исследова-

ниях было показано, что наибольшее число CD34<sup>+</sup>-клеток при экспансии может быть получено при использовании такой группы цитокинов, как TPO + SCF + FL + IL-6. Однако эти результаты зависели и от выбора питательной среды. Наибольшее количество экспансированных клеток было получено на бессывороточных питательных средах с данной комбинацией цитокинов, по сравнению со стандартной питательной средой и добавлением животной сыворотки и этим же коктейлем цитокинов [18].

Многофакторные исследования показали всю важность влияния различных комбинаций ростовых факторов и выбора их концентрации на результаты экспансии. Однако вопрос об оптимальном соотношении ростовых факторов все еще остается открытым.

В одной из наиболее ранних клинических работ, выполненной в 1992 г., была показана возможность экспансии достаточного количества клеток КМ, необходимого для трансплантации, и безопасность их применения. Часть клеток КМ инкубировалась в среде RPMI с человеческой сывороткой и добавлением GM-CSF, IL-3. У больных, получивших неманипулированную и дополнительно экспансированную часть КМ, отмечалось более быстрое восстановление числа тромбоцитов [37].

В другой работе в качестве источника клеток-предшественников брали периферическую кровь. Экспансию проводили в среде RPMI с добавлением аутологичной сыворотки и ростовых факторов SCF, IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 и EPO. В ходе исследования было получено увеличение ЯСК в среднем в 62 раза, медиана составила  $11,8 \times 10^6$ /кг веса пациента. Была показана безопасность данного метода, который для проведения экспансии требует маленького объема периферической крови, что снижает риск загрязнения трансплантата опухолевыми клетками и необходимость дополнительного проведения лейкофереза у больных [38].

Аналогичное исследование с таким же набором ростовых факторов для экспансии показало возможность расширения *ex vivo* клеток-предшественников периферической крови после криоконсервации. При этом, количество клеток в среднем увеличивалось в 21 раз. Это исследование показало, что CD34<sup>+</sup>-клетки могут быть успешно культивированы из криозамороженных материалов и в дальнейшем безопасны для применения у пациентов [39].

S.F. Williams et al. были предприняты попытки экспансии клеток периферической крови с использованием бессывороточной среды X-VIVO с человеческим сывороточным альбумином и PIXY321 (GM-CSF/IL-3 химерный белок). При этом среднее число клеток увеличилось в 26 раз. И хотя инфузия экспансированных клеток хорошо переносилась, клинического эффекта получено не было [40].

В работе R.A. Briddell et al. была показана возможность экспансии клеток, выделенных из другого

источника, – ПК: культивирование их в различных питательных средах с добавлением цитокинов (SCF, G-CSF, TPO). При этом наилучших результатов удалось добиться при культивировании селектированной CD34<sup>+</sup>-фракции ПК (увеличение общего числа клеток в 113 раз, против 1,4 раза при культивировании неселектированной фракции ПК) [6]. Этими и другими исследователями показана осуществимость применения данного продукта в клинической практике, где не было отмечено каких-либо токсических реакций [41–43]. Однако никакого значительного влияния на ускорение восстановления нейтрофилов и тромбоцитов у реципиентов получено не было.

Полная оценка влияния различных комбинаций ростовых факторов на проведение экспансии ГСК затруднена из-за ограниченного выпуска разрешенных для клинического применения препаратов.

В настоящее время клинических результатов по применению в трансплантации экспансированной части ПК недостаточно. Основные исследования представлены в таблице. Эти исследования достаточно разнообразны, и они включают как культивирование в статических условиях, так и с применением перфузионных систем, с добавлением стромальных элементов к ростовым факторам и т. д. Большинство протоколов для экспансии включали в себя SCF и TPO в комбинации с другими ростовыми факторами. Эти исследования показали безопасность данного метода. Но в большинстве случаев не было отмечено значимого влияния на приживление трансплантата. Необходим дальнейший набор пациентов для более полной оценки влияния экспансии ГСК на результаты проведения трансплантации ПК.

Кроме стандартного набора цитокинов для экспансии в лабораторных исследованиях была показана роль различных ионов (железа, кальция, магния, цинка) на рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. Учитывая значительные клинические изменения, возникающие при дефиците ионов меди в организме человека (анемия, нейтропения, тромбоцитопения), было изучено их влияние на изменение основных клеточных функций.

Так, например, было показано, что хелатор меди (copper chelator tetraethylenepentamine – ТЕРА) оказывает ингибирующее влияние на процессы дифференцировки клеток-предшественников, а также увеличивает процессы самовозобновления клеток, улучшая приживление трансплантата у иммунодефицитных мышей. Эти процессы происходят в результате изменения клеточных концентраций меди [44, 45].

При проведении предклинических исследований был разработан протокол экспансии клеток-предшественников ПК с использованием основных цитокинов (TPO, IL-6, SCF и FL) и хелаторного комплекса меди – ТЕРА, который привел к увеличению CD34<sup>+</sup>-клеток в 86 раз. В дальнейшем протокол экспансии, основанный на полученных данных, был

Клинические исследования по применению *ex vivo* экспансии ПК

	Число пациентов, включенных в исследование	Среда для культивирования / селекция клеток	Сыворотка / ростовые факторы	Результаты исследования	Кратность экспансии ЯСК	Кратность экспансии CD34 <sup>+</sup>
Перфузионная система Aastrom/Replicell system (Jaroscak, 2003)	28	Iscove modified Dulbecco medium	10 % бычьей сыворотка, PIXY321 – 5 ng/mL; EPO – 0.1 U/mL;flt-3 ligand – 25 ng/mL	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	в 2,4 раза	0,5
Жидкая суспензионная система (Shpall, 2002)	37	CD34 <sup>+</sup> -селекция	SCF – 100 ng/mL; G-CSF – 100 ng/mL; MGDF – 100 ng/mL	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	56	4
University of Texas MD Anderson Cancer Center (de Lima and Shpall, 2008)	10	Среда aMEM; CD133 <sup>+</sup> -селекция	10 % FBS SCF, FL, IL-6, TPO и ТЕРА	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	219	6
Жидкая суспензионная система (Delaney et al., 2010)	10	CD34 <sup>+</sup> -селекция; бессывороточная среда	Notch ligand d-1, SCF, FL, IL-6, TPO, IL-3	Доказанная безопасность и выполнимость; время до восстановления нейтрофилов – 16 дней	562	164
Экспансия со стромальными клетками (de Lima and Shpall, 2009)	6		SCF, TPO, G-CSF	Доказанная безопасность и выполнимость; время до восстановления нейтрофилов – 14,5 дней	12	12

рекомендован для проведения клинических испытаний при проведении трансплантации ПК у больных со злокачественными онкогематологическими заболеваниями [46].

Были проведены клинические испытания I/II фазы препарата StemEx, содержащего экспансированную часть единицы ПК, культивированную в течение 21 дня в среде с содержанием коктейля цитокинов (SCF, FL, IL-6, TPO – 50 нг/мл) и хелатора меди ТЕРА. Число ЯСК в среднем увеличилось в 219 (2–620) раз и CD 34<sup>+</sup>-клеток в среднем в 6 раз (по содержанию CD34<sup>+</sup>-клеток во всей единице ПК). Экспансированные клетки были пересажены без каких-либо трансфузионных осложнений. Время до приживления нейтрофилов составило 30 дней, тромбоцитов – 48 дней, что сопоставимо с данными при использовании неманипулированной ПК. Также не было отмечено увеличения количества случаев острой реакции «трансплантат против хозяина» [47]. В настоящее время проводится набор больных для проведения III фазы клинических испытаний с включением нескольких центров.

В Университете Техаса, США (MD Anderson Cancer Center) также было показано отсутствие ток-

сичности при проведении больным с продвинутыми стадиями гемобластозов трансплантации экспансированной части ПК (среда aMEM с 10 % FBS и SCF, FL, IL-6, TPO с добавлением ТЕРА), экспансия выполнена на части ПК.

Таким образом, была показана клиническая доступность и безопасность препарата для экспансии ГСК на основе хелаторного комплекса меди [48].

В качестве еще одной добавки для проведения экспансии ГСК ПК китайскими учеными из Chinese University (Гонконг) было предложено использование лектина, связывающего манозу (mannose-binding lectin – NTL), полученного из китайского нарцисса *Narcissus tazetta var. Chinensis*, для пролонгированного поддержания и экспансии CD34<sup>+</sup>-клеток ПК [49].

Лектины (от лат. legere – собирать) – это класс углеводов-специфических белков. Они выполняют множество функций в организме, например, участвуют в регуляции клеточной адгезии, синтеза гликопротеинов и др. Лектины использовались в исследованиях агглютинации эритроцитов, для диагностики групп крови, и на субпопуляциях лимфоцитов [50].

Однако до конца их механизм действия на гемопоэтические клетки-предшественники не изучен.

### Строма

В последнее время особое внимание уделяется совместному культивированию ГСК со стромальными элементами. Эффект влияния стромальных клеток сводится, во-первых, к прямому межклеточному взаимодействию и передаче сигнальной информации, а во-вторых, к выделению регулирующих белков: цитокинов, хемокинов (таких как GM-CSF, IL-3, IL-6, SCF, FL, TPO) [51, 52]. Стромальные клетки оказывают влияние на самовозобновление, пролиферацию, а также тормозят созревание и дифференцировку ГСК [22, 53–55].

Доклинические исследования продемонстрировали способность МСК поддерживать экспансию CD34<sup>+</sup>-клеток при совместном культивировании с ГСК. Кроме того, ряд исследователей показали, что в качестве альтернативного источника МСК можно использовать плаценту, а совместное культивирование CD34<sup>+</sup>-фракции ПК и МСК, полученных из плаценты, приводит к увеличению CD34<sup>+</sup>-клеток в 14,89 раза [47, 56–58]. Одним из преимуществ использования совместного культивирования ПК и МСК является возможный отказ от селекции CD34<sup>+</sup>, при которой теряется определенный процент клеток [59]. Кроме того, неманипулированную ПК можно культивировать только в перфузионных культуральных системах. А культивирование нефракционированной ПК или выделение только моноклеарной фракции ПК в статических средах не приводило к желаемым результатам экспансии [6].

I. McNiece в своем исследовании показал, что совместное культивирование моноклеарной фракции ПК и МСК в среде с добавлением рекомбинантных ростовых факторов приводит к 10-20-кратному увеличению ЯСК, в то время как без добавления МСК количество клеток после 13 дней культивирования было таким же, как в день 0. Он выдвигает гипотезу, что, возможно, МСК защищают клетки-предшественники от действия ингибирующих факторов или сами выделяют ряд факторов, стимулирующих рост клеток-предшественников [60].

Кроме того, было показано, что МСК, полученные на ранних пассажах, способствуют не только пролиферации ГСК, но и сохранению ими примитивного иммунофенотипа CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> или CD133<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, тем самым способствуя задержке дифференцировки ГСК к более высокому числу клеточных делений [61].

Однако остается вопрос, смогут ли поддержать экспансию ГСК только стромальные клетки при культивировании в среде, не содержащей цитокины [52].

Кроме того, при совместном культивировании с МСК возникает вопрос о защите конечного про-

дукта экспансии от контаминации инфекционными агентами, и не приведет ли совместное культивирование к росту числа случаев иммунологической реакции отторжения.

### Длительность экспансии

По данным разных авторов длительность культивирования ГСК ПК в среднем составляет от 7-10 до 14 дней. Поскольку клетки ПК являются более интенсивно пролиферирующими, чем клетки КМ, возможно, для их экспансии потребуется меньше времени. И в то же время, так как клетки ПК более примитивны, то для достижения ими оптимальной стадии роста может потребоваться больше времени.

Укорочение времени экспансии может иметь преимущества при планировании сроков проведения химиотерапии и трансплантации.

В ходе проведения работ по экспансии возможно использование одноступенчатой системы, например, в течение 10 дней использование определенной питательной среды с добавлением SCF, TPO и G-CSF [41]. Применение данной комбинации ростовых факторов показало увеличение ЯСК в 56 раз и CD34<sup>+</sup>-клеток в 4 раза.

I. McNiece предложил использовать двухступенчатый протокол, который привел к увеличению ЯСК более чем в 400 раз, а CD34<sup>+</sup>-клеток – в 29 раз. При использовании двухступенчатого протокола первые 7 дней клетки культивировались в тефлоновых мешках объемом 100 мл с применением 50 мл среды, SCF, G-CSF и MGDF (100 ng/mL), затем клетки пересаживались в мешки большего объема (на 1000 мл), количество среды увеличивалось до 1 литра с добавлением тех же ростовых факторов [62].

В лабораторных исследованиях культивирование ГСК проводится статическим способом, используя вентилируемые пластиковые флаконы или мешки. Для промышленного применения необходимо в результате экспансии получить большое число клеток, достаточное для выполнения трансплантации. Для этого было предложено использовать биореакторы.

Существует несколько видов биореакторов.

Во-первых, перфузионные биореакторы. В ходе I фазы клинических испытаний по трансплантации ГСК ПК, полученных в результате экспансии в перфузионной системе AastromReplicell System с использованием стандартной питательной среды, 10 % животной сывороткой и набора цитокинов PIXY321, EPO, FL, было получено увеличение общего числа ЯСК в 2,4 раза. При инфузии реципиентам побочных реакций отмечено не было [43]. Подобные результаты были показаны и в других работах [63].

Во-вторых, биореактор с фиксированной твердой фазой (fixed bed bioreactor). Применение этого биореактора было основано на положительном влиянии стромальных клеток на результаты экспансии ГСК. При этом стромальные клетки захватываются

в фиксированную подложку, через которую циркулируют питательная среда и ГСК [64].

В-третьих, перемешивающий биореактор (stirred bioreactor). При сравнительном культивировании в питательной среде с низкими дозами цитокинов лучшие результаты экспансии были получены при использовании биореактора, чем при культивировании во флаконах [65].

За последнее время было проведено много экспериментальных работ по экспансии ГСК, которые привели к клиническим испытаниям трансплантации *ex vivo*-расширенных клеток у пациентов. Однако это требует разработки доступных и стандартизированных протоколов экспансии ГСК, наиболее пригодных для клинического применения.

Дальнейший прогресс в области экспансии ГСК будет тесно связан с пониманием клеточных и молекулярных механизмов самообновления, пролиферации и дифференцировки этих клеток. Сюда относятся и регуляция факторов транскрипции семейства HOX, Myb, PU.1, GATA, изучение механизмов регуляции клеточного цикла и теломеразной активности, модификация хроматина.

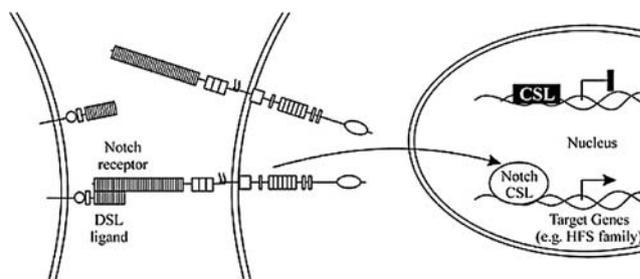
HOX-гены кодируют большое семейство транскрипционных факторов. У млекопитающих есть 4 главных семейства HOX-факторов (A, B, C и D). HOXB4 является одним из главных регуляторов самовозобновления ГСК у млекопитающих. У HOXB4-дефицитных мышей снижена способность к пролиферации ГСК, но с сохранением их дифференцировки и линейности [66, 67]. Эктопией экспрессии HOXB4 удастся добиться значительной экспансии ГСК и мышей, и человека [68].

В исследовательских работах было показано регулирующее влияние ядерного фактора NF- $\Upsilon$  на индукцию гена HOXB4 в гемопоэтических клетках [69].

Применение трансдукции TAT-NF- $\Upsilon$  в ГСК ПК оказывало влияние на результаты экспансии через различные проводящие пути (в том числе через Notch-1). Однако эффекты этого влияния еще необходимо обсудить на мышинных моделях и в I фазе клинических испытаний.

Знания в области сигнальных путей, которые отвечают за самоподдержание и дифференцировку, являются важной проблемой в понимании биологии стволовой клетки. В последние годы были открыты внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за регуляцию самоподдержания ГСК, такие как Notch (см. рисунок), Wnt/b-catenin, рецептор тирозинкиназы Tie2, морфогенетический протеин кости (bone morphogenetic proteins – BMP) в комбинации с транскрипционным фактором Bmi-1 [70, 71].

В исследовании A. Duncan et al. было показано, что передача сигналов Notch является активной в гемопоэтических клетках и особенно важной на самых ранних стадиях гемопоэтического развития. Ингибирование этого сигнального пути приводит



Схематическое изображение сигнального пути Notch (Mumm, Kopan, 2000)

к дифференцировке ГСК *in vitro* и истощению *in vivo* [72]. Сигналы Notch играют важную роль в клеточной дифференцировке, апоптозе, адгезии, пролиферации, эпителиально-мезенхимальной трансформации. У млекопитающих выделено 5 Notch-лиганд: Jagged-1/2 и Delta-1/3/4. Сигналы, поступающие в межклеточное пространство в виде секретируемых молекул лигандов Delta, воспринимаются близлежащими окружающими клетками. На клеточной поверхности воспринимающих сигнал и экспрессирующих рецептор клеток происходит взаимодействие внеклеточного домена лиганда Delta и трансмембранного рецепторного белка Notch. Белок рецептора состоит из 3 доменов: внеклеточного, связывающегося с лигандом и подавляющего активность в отсутствие лиганда, внутримембранного и внутриклеточного, способного передавать сигнал к генам-мишеням. В результате этого взаимодействия происходит расщепление и высвобождение внутриклеточного домена Notch-рецептора, связанного с мембранно-ассоциированным протеазным комплексом. Внутриклеточный домен Notch транспортируется в ядро, и собранный ядерный комплекс регулирует транскрипцию нескольких Notch-эффекторных генов [73].

Еще в 1998 г. В. Varnum-Finney показала, что Notch-лиганд Jagged-1 при проведении экспансии приводит к 2- и 3-кратному увеличению примитивных клеток-предшественников в культуре [74]. Это было подтверждено и в других исследованиях. Jagged-1 имел небольшое влияние на пролиферацию зрелых клеток-предшественников, однако на моделях ксенотрансплантатов у иммунодефицитных мышей было показано, что он способствует поддержанию и экспансии примитивных клеток-предшественников *in vivo* с сохранением их способности к мультилинейной реконституции без потери клеток-предшественников [75].

На результаты экспансии оказывает влияние и концентрация Notch-лиганд на поверхности клеток. Низкие концентрации Delta-1 приводили к увеличению числа CD34<sup>+</sup>-клеток пуповинной крови, в отличие от этого высокие концентрации, наоборот, приводили к апоптозу [76]. Кроме того, концентрация оказывает влияние на пути дифференцировки

клеток. При различной концентрации дифференцировка может идти либо по лимфоидному пути, либо по миелоидному. В зависимости от формы лиганда, он может оказывать и отличное влияние. Растворимая форма Delta-1 способна действовать как активатор только лишь в том случае, если молекула иммобилизована на клеточной мембране или культуральном пластике. Кроме того, иммобилизованные формы Delta-1 показали свое преимущество по сравнению с растворимыми или трансмембранными формами [77].

Недавно С. Delaney et al. сообщили о применении для экспансии ПК коктейля из цитокинов и ростовых факторов (IL-3, IL-6, TPO, FL, SCF) с добавлением Delta-like-1, что приводило к 160-кратному увеличению CD34<sup>+</sup>-клеток. Была проведена I фаза клинических испытаний на 10 пациентах с двойной трансплантацией ПК, показавшая более быстрое приживание и восстановление нейтрофилов у реципиентов, получивших экспансированную часть ПК [78].

Wnt-сигнальный путь является для клеток сигналом к более медленному разрушению их белков, более длительному их сохранению, так как они могут быть необходимы для регулирования функции клеток, например таких, как самоподдержание. Начинается процесс с присоединения лиганда Wnt к рецепторам клеточной поверхности генов семейства frizzled/LRP. Это ведет к накоплению  $\beta$ -catenin в цитоплазме и его транслокации в ядро. Результатом таких реакций становится инициация транскрипции в ядре и включение целого ряда факторов, определяющих процессы дифференцировки и самоподдержания. Как средство для воздействия на Wnt-сигнальный путь *in vivo* был использован ингибитор гликоген синтазы киназы-3 (glycogen synthase kinase-3 – GSK-3) 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO), который улучшал нейтрофильное и мегакариоцитарное восстановление у мышей после трансплантации, приводя к усилению поддержания длительной репопуляции [79].

Состояние покоя является необходимым свойством для поддержания ГСК. Оно может обеспечиваться при участии сигнального пути тирозинкиназы Tie2/лиганд ангиопоэтин-1 (Ang-1). ГСК с длительным самоподдержанием, которые экспрессируют рецептор тирозинкиназы Tie2, находятся в состоянии покоя и прилипают к остеобластам КМ. Ang-1, экспрессируемый клетками-остеобластами, активирует Tie2-сигнальный путь, и это ограничивает ГСК в состоянии покоя и защищает от апоптоза [80].

Усовершенствуя протоколы экспансии ГСК ПК, в настоящее время все-таки не удается получить оптимального количества клеток, необходимых для трансплантации с сохранением их стволовости. Однако немаловажную роль в приживлении трансплантата играет хоуминг ГСК. В настоящее время изучены механизмы, с помощью которых можно оказывать влияние на хоуминг ГСК. Хорошо изученным фактором хоуминга стволовых клеток и клеток-предшественников КМ является белок SDF-1/CXCL12, относящийся к хемокинам. SDF-1 оказывает влияние на клетки, ингибируя апоптоз, стимулируя пролиферацию, усиливая адгезию и подвижность клеток, а также влияет на процессы хемотаксиса и миграции. Ряд исследований посвящен влиянию малых белковых молекул (С3а, гиалуроновая кислота, фибронектин, фибриноген) на чувствительность SDF-1/CXCL12 и опосредованно на хоуминг ГСК ПК при трансплантации. Предварительная обработка ПК малыми молекулами перед трансплантацией поможет улучшить приживание [81].

Клиническое использование культивированных гемопоэтических клеток, начатое с 1990-х годов, показало техническую возможность выполнения этого метода для получения достаточно большого количества клеток, необходимых для трансплантации, безопасность применения полученного продукта при введении больным и некоторую тенденцию к ускорению гемопоэтического восстановления после их введения. Однако учитывая, что клетки-предшественники ПК, по всей видимости, отличаются по их способности к экспансии по сравнению с другими источниками стволовых клеток (периферическая кровь, КМ), клинический интерес будет сохраняться именно в отношении экспансии клеток ПК и применения их для дальнейшей трансплантации, особенно во взрослой практике.

Кроме того, используя различные культуральные технологии возможно получить такие клеточные субпопуляции ПК, как Т-клетки и НК-клетки и использовать их в дальнейшем для иммунотерапии [82, 83].

В последнее время немало внимания уделяется экспансии и генной инженерии, экспансии и дифференцировке ГСК в зрелые клетки, например, эритроциты. В результате ступенчатого протокола экспансии удалось получить зрелые эритроциты, которые могут быть использованы в качестве аутогемотрансфузии при некоторых формах анемии (например серповидно-клеточной) и при хронической кровопотере [84].

Л и т е р а т у р а

1. Knudtson S. *In vitro* growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43(3):357–61.
2. Mayani H., Lansdorp P.M. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83(9):2410–7.
3. Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C. et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(21):9857–60.
4. Barker J.N., Weisdorf D., Wagner J. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344:1871.
5. Magro E., Regidor C., Cabrera R. et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica* 2006;91:640–8.
6. Briddell R.A., Kern B.P., Zilm K.L. et al. Purification of CD34<sup>+</sup> cells is essential for optimal *ex vivo* expansion of umbilical cord blood cells. *J Hematother* 1997;6(2):145–50.
7. Koller M., Manchel I., Newsom B. et al. Bioreactor expansion of human bone marrow: comparison of unprocessed, density-separated, and CD34-enriched cells. *J Hematother* 1995;4(3):159–69.
8. Madkaikar M., Ghosh K., Gupta M. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta Haematol* 2007;118(3):153–9.
9. McNiece I. Delivering cellular therapies: Lessons learned from *ex vivo* culture and clinical applications of hematopoietic cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18(6):839–45.
10. Purdy M.H., Hogan C.J., Hami L. et al. Large volume *ex vivo* expansion of CD34-positive hematopoietic progenitor cells for transplantation. *J Hematother* 1995;4(6):515–25.
11. De Wynter E.A., Buck D., Hart C. et al. CD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup> cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998;16(6):387–96.
12. Forraz N., Pettengell R., Deglesne P.A., McGuckin C.P. AC133+ umbilical cord blood progenitors demonstrate rapid self-renewal and low apoptosis. *Br J Haematol* 2002;119(2):516–24.
13. McNiece I., Briddell R. *Ex vivo* expansion of haemopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol* 2001;29(1):3–11.
14. Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M. et al. Isolation and characterization of human CD34(–)Lin(–) and CD34(+)Lin(–) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000;95(9):2813–20.
15. Hofmeister C.C., Zhang J., Knight K.L. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: Growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(1):11–23.
16. Hess D.A., Meyerrose T.E., Wirthlin L. et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2004;104(6):1648–55.
17. Koestenbauer S., Zisch A., Dohr G., Zech N.H. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant* 2009;18(10):1059–68.
18. Lam A.C., Li K., Zhang X. B. et al. Preclinical *ex vivo* expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion* 2001;41(12):1567–76.
19. Потапнев М.П., Петевка Н.В., Гончарова Н.В. и др. Пуповинная кровь как источник гемопоэтических и негемопоэтических клеток человека. Материалы междunarодного симпозиума «Актуальные вопросы донорского и персонального хранения стволовых клеток». *Клетт трансплантол и ткан инж* 2009;IV(3):14.
20. Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al. Cord blood plasmamediated *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:347–53.
21. Koller M.R., Manchel I., Maher R.J. et al. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(7):653–63.
22. Hai-Jiang W., Xin-Na D., Hui-Jun D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Am J Hematol* 2008;83(12):922–6.
23. Brandt J., Briddell R.A., Srour E.F. et al. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;79(3):634–41.
24. Srour E.F., Brandt J.E., Briddell R.A. et al. Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1993;81(3):661–9.
25. Brugger W., Mocklin W., Heimfeld S. et al. *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34-progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 1993;81(10):2579–84.
26. Shapiro F., Yao T.J., Raptis G. et al. Optimization of conditions for *ex vivo* expansion of CD34-cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood* 1994;84(10):3567–74.
27. Keller J.R., Ortiz M., Ruscetti F.W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* 1995;86:1757–64.
28. McNiece I., Briddell R. Stem cell factor. *J Leukoc Biol* 1995;58(1):14–22.
29. Sitnicka E., Lin N., Priestley G.V. et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87:4998–5005.
30. Shah A.J., Smogorzewska E.M., Hannum C., Crooks G.M. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup> CD38– cells and maintains progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996;87:3563–70.
31. Yonemura Y., Ku H., Lyman S.D., Ogawa M. *In vitro* expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* 1997;89:1915–21.
32. Rusten L.S., Lyman S.D., Veiby O.P., Jacobsen S.E. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996;87:1317–25.
33. Solanilla A., Grosset C., Duchez P. et al. FLT3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)–4- and VLA–5-dependent mechanism. *J Haematol* 2003;120(5):782–6.
34. Broudy V.C., Lin N.L., Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood* 1995;85:1719–26.
35. Sui X., Tsuji K., Tanaka R., Tajima S. et al. gp130 and c-Kit signalings synergize for *ex vivo* expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2859–63.
36. Murray L.J., Young J.C., Osborne L.J. et al. Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. *Exp Hematol* 1999;27(6):1019–28.
37. Naparstek E., Hardan Y., Ben-Shahar M. et al. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992;80(7):1673–8.
38. Brugger W., Heimfeld S., Беренсон R.J. et al. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *ex vivo*. *N Engl J Med* 1995;333(5):283–7.
39. Alcorn M.J., Holyoake T.L., Richmond L. et al. CD34-positiv cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded *ex vivo* and used for transplantation with little or toxicity. *J Clin Oncol* 1996;14(6):1839–47.
40. Williams S.F., Lee W.J., Bender J.G. et al. Selection and expansion of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 1996;87(5):1687–91.
41. Spall E., Quinones R., Giller R. et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368–76.

42. Pecora A., Stiff P., Jennis A. et al. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using *ex vivo* expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:797–9.
43. Jaroscak J., Goltry K., Smith A. et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo* expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom Replicell System. *Blood* 2003;101:5061–67.
44. Peled T., Landau E., Prus E. et al. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34<sup>+</sup> cells. *Br J Haematol* 2002;116:655–61.
45. Peled T., Gluckman E., Hasson N. et al. Chelatable cellular copper modulates differentiation and self-renewal of cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2005;33:1092–1100.
46. Peled T., Mande J. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded *ex vivo* with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy* 2004;6(4):344–55.
47. De Lima M., McMannis J., Gee A., et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2006;41(9):771–8.
48. Robinson S., Niu T., de Lima M. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2005;7(3):243–50.
49. Li K., Ooi V.E., Chuen C.K. The plant mannose-binding lectin NTL preserves cord blood haematopoietic stem/progenitor cells in long-term culture and enhances their *ex vivo* expansion. *Br J Haematol* 2008;140(1):90–8.
50. Gabius H.J., Gabius S., Zemlyanukhina T.V. et al. Reverse lectin histochemistry: design and application of glycoligands for detection of cell and tissue lectins. *Histol & Histopathol* 1993;8:369–83.
51. Chivu M., Diaconu C.C., Bleotu C. et al. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med* 2004;8(2):223–31.
52. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H. et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006;85:212–25.
53. Moreau I., Duvert V., Caux C. et al. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood* 1993;82:2396–405.
54. Cherry, Yasumizu R., Toki J. et al. Production of hematopoietic stem cell-chemotactic factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 1994;83:964–71.
55. Guerriero A., Worford L., Holland H.K. et al. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* 1997;90:3444–55.
56. Zhang Y., Li C., Jiang X. et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *Exp Hematol* 2004;32:657–64.
57. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–42.
58. Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S. et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:581–8.
59. Ye Z.Q., Burkholder J.K., Qiu P. et al. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12140–4.
60. McNiece I., Harrington J., Turney J. et al. *Ex vivo* expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004;6:311–7.
61. Walenda T., Bork S., Horn P. et al. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2010;14(1–2):337–50.
62. McNiece I., Kubegov D., Kerzic P. et al. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Exp Hematol* 2000;28(10):1181–6.
63. Pecora A.L., Stiff P., LeMaistre C.F. et al. A phase II trial evaluating the safety and effectiveness of the AastromReplicell system for augmentation of low-dose blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(30):295–303.
64. Meissner P., Herfurth C., Schroder B., Biselli M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Cytotechnology* 1999;30(1–3):227–34.
65. Liu Y., Liu T., Fan X. et al. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *J Biotechnol* 2006;124(3):592–601.
66. Bjornsson J.M., Larsson N., Brun A.C. et al. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in *Hoxb3* and *Hoxb4*. *Mol Cell Biol* 2003;23:3872–83.
67. Miyake N., Brun A.C., Magnusson M. et al. *HOXB4*-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells* 2006;24(3):653–61.
68. Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C.J. et al. Overexpression of *HOXB4* in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev* 1995;9:1753–65.
69. Zhu J., Gianolla D., Zhang Y. et al. NFYa, b, c interacts with USF1/2 to activate the *HOXB4* promoter in human hematopoietic cells and repress granulopoiesis. *Blood* 2003;102:2420–7.
70. Stier S., Cheng T., Dombkowski D. et al. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 2002;99(7):2369–78.
71. Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423(6938):409–14.
72. Duncan A.W., Rattis F.M., DiMascio L.N. et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 2005;6(3):314–22.
73. Zhou S., Hayward S.D. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol* 2001;21:6222–32.
74. Varnum-Finney B., Purton L.E., Yu M. et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 1998;91(11):4084–91.
75. Karanu F.M., Murdoch B. The Notch Ligand Jagged-1 Represents a Novel Growth Factor of Human Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med* 2000;192(9):1365–72.
76. Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K. et al. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on *ex vivo* differentiation and *in vivo* marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood* 2005;106(8):2693–9.
77. Varnum-Finney B., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101(5):1784–9.
78. Delaney C., Heimfeld C., Brashem-Stein C. et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010;16:232–6.
79. Trowbridge J.J., Xenocostas A., Moon R.T., Bhatia M. Glycogen synthase kinase-3 is an *in vivo* regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nat Med* 2006;12(1):89–98.
80. Arai F., Hirao A., Ohmura M. et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118(2):149–61.
81. Delaney C., Ratajczak M.Z., Laughlin M.J. Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. *Expert Rev Hematol* 2010;3(3):273–83.
82. Mazur M.A., Davis C.C., Szabolcs P. *Ex vivo* expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(10):1190–6.
83. Boissel L., Tuncer H.H., Betancur M. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(10):1031–8.
84. Neildez-Nguyen T.M., Wajzman H., Marden M.C. et al. Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002;20(5):467–72.

## ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



Удивительные открытия в области молекулярной генетики, которые казались столь далекими от проблем практической медицины, в последнее 10-летие привнесли совершенно новое понимание сути многих заболеваний, недавно считавшихся фатальными, и что особенно важно – новые возможности их лечения. Стало очевидно, что на этом пути откроются удивительные перспективы и ждут неожиданные открытия. Знание конкретных событий, которые лежат в основе биологических процессов и глубинных событий патогенеза ряда заболеваний, уже привело к созданию принципов целенаправленной (таргетной) терапии, суть которой состоит в поражении конкретных целей, являющихся ключевыми в развитии патологического процесса. Первой демонстрацией реальности такого, почти фантастического события стали открытия молекулярно-генетической сути патогенеза хронического миелоидного лейкоза и его лечения ингибиторами тирозинкиназ. Последовал шквал создания препаратов с разными механизмами действия, но общей идеей – максимально точного поражения цели, основанного на знании нарушений в жизнедеятельности клеток и на путях их регуляции на молекулярно-генетическом уровне. Есть основания полагать, что именно в этом направлении нас ожидают дальнейшие успехи развития медицинской науки и практики. К сожалению, эта важная область знаний не заняла пока достойного места в системе медицинского образования.

Мы были рады уникальной возможности представить цикл лекций Д.А. Домнинского по основам молекулярно-генетических механизмов лейкозогенеза. Завершая его, редакция надеется, что читатели получили возможность убедиться в необходимости научиться понимать сложные процессы развития и течения тех болезней, которые мы не всегда успешно пытаемся предотвратить и лечить.

Редакция планирует продолжить публиковать материалы по этой тематике. Ждем ваших писем и отзывов и впредь всегда будем рады предоставить страницы журнала «Онкогематология» для ваших оригинальных статей и обзоров.

# Молекулярные механизмы лейкогенеза

## Лекция № 5 Основы таргетной терапии

Д.А. Домнинский

ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

### Molecular mechanisms of leukemogenesis 5. Overview of targeted therapy

D.A. Domninskiy

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

#### Предисловие

В предыдущих лекциях были рассмотрены ключевые генетические нарушения, которые индуцируют развитие гемобластозов миелоидного или лимфоидного происхождения [1–4]. Существенный прогресс в понимании молекулярных процессов онкогенеза, достигнутый в последние два 10-летия, позволил выявить основные типы генов, которые ча-

сто становятся мишенями лейкогенных aberrаций. Это, в свою очередь, сделало возможным разработку лекарств, которые целенаправленно воздействуют на онкогенные белки, что привело к возникновению опухоли-специфичной таргетной терапии (от англ. *target* – мишень). В настоящее время одобрено к применению несколько десятков таргетных препаратов (некоторые из них приведены в таблице), а несколько

Таргетные препараты, обладающие наибольшей эффективностью против опухолей, несущих определенные генетические повреждения [5, 6] \*

Лекарство	Опухоли	Гены	Генетические повреждения
Иматиниб (imatinib mesylate)	ХМЛ ОЛЛ GIST MD/MPD	<i>BCR-ABL</i> <i>BCR-ABL</i> <i>KIT</i> , <i>PDGFR</i> <i>PDGFR</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11) Активирующие мутации Хромосомные транслокации
Дазатиниб (dasatinib)	ХМЛ ОЛЛ	<i>BCR-ABL</i> <i>BCR-ABL</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11)
Нилотиниб (nilotinib)	ХМЛ	<i>BCR-ABL</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11)
Трастузумаб (trastuzumab)	Рак груди	<i>HER2</i>	Повышенная экспрессия или амплификация
Лапатиниб (lapatinib)	Рак груди	<i>HER2</i>	Повышенная экспрессия или амплификация
Гефитиниб (gefitinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Эрлотиниб (erlotinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Кризотиниб (crizotinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Цетуксимаб (cetuximab)	CRC	<i>EGFR</i> ± <i>K-RAS</i>	Активирующие мутации <i>EGFR</i> и/или <i>K-RAS</i>
Вемурафениб (vemurafenib)	Меланома	<i>B-RAF</i>	Активирующие мутации

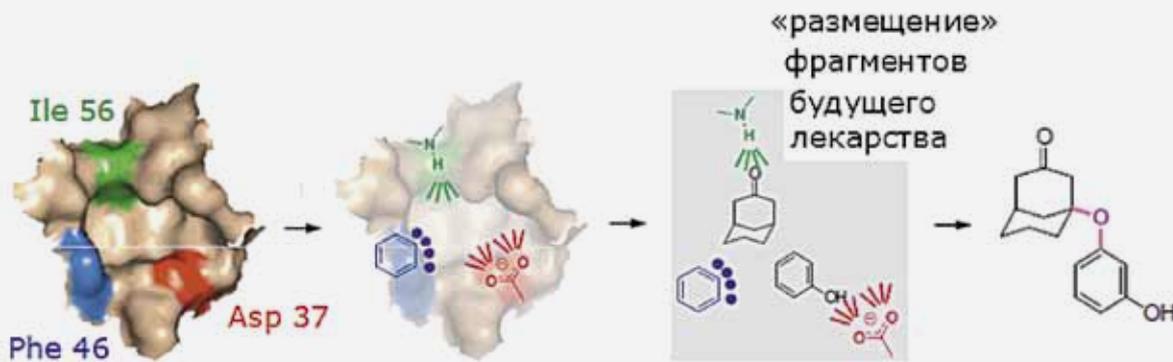
\* Окончание в названии препарата характеризует его природу: окончание «маб» присутствует у моноклональных антител («*tab*», *monoclonal antibody*), а «ниб» – у ингибиторов протеинкиназ («*nib*», *tyrosine kinase inhibitors*).

Аббревиатуры: ОЛЛ – острый лимфолейкоз; ХМЛ – хронический миелолейкоз; *B-RAF* – *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog, type B*; CRC – colorectal cancer; *EGFR* – epidermal growth factor receptor; GIST – gastrointestinal stromal tumor; *HER2* – human epidermal growth factor receptor 2 (также известен как CD340 и *EGFR2*); *KIT* – *v-kit feline sarcoma viral oncogene homolog* (также известен как CD117 и *SCFR, stem cell factor receptor*); MD/MPD – myelodysplasia-myeloproliferative disease; NSCLC – non-small-cell lung cancer; *PDGFR* – platelet-derived growth factor receptor; Ph – филадельфийская хромосома (22q-), возникающая при t(9;22)(q34;q11) хромосомной транслокации.

## Приложение 1. Современные методы создания новых лекарств (часть 1)



Поиск новых лекарственных препаратов еще недавно являлся чрезвычайно длительным процессом. Чтобы выявить соединение, обладающее биологической активностью, необходимо было почти наугад протестировать огромное число новых синтезированных химических молекул. Такое тестирование проводили на животных, оно было очень дорогим, требовало большого количества испытываемых соединений и затягивалось на много лет. Бурное развитие в последние 10-летия молекулярной биологии и геной инженерии, а также теоретических методов анализа свойств «структура–функция» биологических молекул привело к коренному изменению методологии поиска лекарственных соединений. Было не только выявлено огромное число потенциальных «мишеней» (биомолекул, на которые могут воздействовать лекарства), но также стало возможно выделять их в чистом виде и в неограниченных количествах. В подавляющем большинстве случаев мишенями для лекарств являются белки (обычно рецепторы, ферменты или факторы транскрипции), но ими также могут быть другие важные биологические макромолекулы. В современном процессе конструирования новых лекарств, который принято называть «драг-дизайн» (от англ. *drug* – лекарство и *design* – проектирование), можно выделить несколько основных этапов [32, 33]. Во-первых, это процедуры установления основных структурных особенностей соединений, которые могут обладать нужной биологической активностью. На рис. 1 показан пример конструирования потенциально активного соединения (прототипа будущего лекарства), в основе которого лежит знание структуры участка фермента, ответственного за его связывание с субстратом. Такого типа манипуляции, известные как «молекулярный докинг» (от англ. *docking* – стыковка), являются ключевой процедурой методов «виртуального скрининга» – автоматизированного просмотра баз данных химических соединений и отбора среди них тех, которые обладают желаемыми свойствами. В основе виртуального скрининга может быть не только информация о пространственном строении активных участков белка-мишени, но также знание структуры субстрата (лиганда), взаимодействующего с данной мишенью. Так, например, для разработки многих ингибиторов протеинкиназы в качестве прототипа будущего лекарства использовалась структура АТФ, взаимодействующего с АТФ-связывающим участком активного центра фермента.



**Рис. 1.** Пример принципа конструирования соединений, способных связываться с активным центром фермента. Экспериментальным или теоретическим путем была установлена структура активного центра белка (слева). Этот участок, обычно представляющий собой углубление на белковой молекуле и называемый «карманом» связывания (*binding pocket*), содержит, в данном случае, несколько потенциально активных аминокислотных остатков – аспарагиновой кислоты (Asp37), фенилаланина (Phe46) и изолейцина (Ile56), определяющих специфичность взаимодействия фермента с субстратом. При этом Phe46 отвечает за липофильные взаимодействия, Asp37 является акцептором, а Ile56 – донором водородных связей (в центре слева). В процессе виртуального скрининга для данного «кармана» было подобрано несколько соответствующих ему соединений («строительных блоков», один из вариантов скрининга показан на рисунке), которые наиболее оптимально размещаются в пространстве «кармана» и взаимодействуют с функциональными аминокислотными остатками (в центре справа). Заключительным этапом является соединение «состыкованных» с активным центром белка фрагментов будущего лекарства в единую молекулу с помощью различных химических группировок (показано розовым цветом), что осуществляется в процессе синтеза (справа). Рисунок адаптирован из статьи G. Schneider & U. Fechner [34].

Процесс виртуального скрининга напоминает детский конструктор «Лего», в котором используется огромное число «строительных блоков» (*building block*), в данном случае – небольших органических молекул. Для осуществления синтеза лекарственных препаратов с заданными свойствами при таком подходе требуется не только информация о структуре очень большого числа химических соединений, но и сами эти соединения. Поэтому такой способ разработки новых таргетных препаратов под силу только крупным фармацевтическим компаниям, обладающим коллекциями, содержащими несколько миллионов различных органических молекул, из которых впоследствии будут «собраны» новые лекарства.

сотен подобных лекарств находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний [5–7]. Окончание работ по расшифровке генома человека позволяет сегодня осуществлять масштабный поиск генов-мишеней, которые критичны в патологии различных заболеваний человека – так называемый «druggable», т. е. геномные локусы, кодирующие белки или белковые домены, способные быть мишенью для лекарств [8]. В последнее время наиболее продуктивными «druggable»

мишенями для лекарств стали протеинкиназы (рецепторные и цитоплазматические), ионные каналы, протеазы, G-белковые рецепторы и некоторые другие типы белков. С другой стороны, прогресс в понимании структуры и механизмов действия многих белков в норме и при патологии позволил кардинально изменить методологию и технологию получения новых лекарственных препаратов, что существенно ускорило процесс их разработки (см. Приложения 1 и 2).

## Приложение 2. Современные методы создания новых лекарств (часть 2)

Поэзия – та же добыча радия. В грамм добыча, в год труды.  
Изводишь единого слова ради тысячи тонн словесной руды.  
Владимир Маяковский

В процессе виртуального скрининга обычно отбирается большое число различных вариантов структур, обладающих потенциальной активностью по отношению к белку-мишени. Поэтому двумя другими важнейшими этапами драг-дизайна являются высокопроизводительные методы синтеза из «строительных блоков» необходимых соединений и отбора (скрининга) среди них наиболее активных.

Для получения большого количества новых органических соединений около 20 лет назад были разработаны новые технологии органического синтеза на основе так называемой комбинаторной химии. Принципы комбинаторного синтеза во многом были позаимствованы у генной инженерии: 1) получение тотальных «библиотек», содержащих огромное число уникальных клонов, несущих амплифицированные копии различных фрагментов геномной ДНК; 2) применение эффективного скрининга для изоляции из этих «библиотек» последовательности ДНК любого гена. Такой подход, в конечном счете, предопределил последующий прогресс во многих дисциплинах, в том числе и в молекулярной онкологии. Аналогичный принцип применительно к органической химии позволяет быстро синтезировать обширные «библиотеки», содержащие огромное число химических соединений, обладающих схожей структурой и потенциально способных быть активными по отношению к определенным биологическим мишеням. На практике комбинаторный синтез представляет собой одновременное получение большого числа соединений (сотен и даже тысяч), используя для этого многочисленные сочетания различных «строительных блоков». Синтез проводят в специальных блоках (microfluidic chips) с большим числом ячеек, этот процесс роботизирован, так же как и процедура скрининга синтезированных соединений [35]. Все члены определенной «библиотеки» химических соединений, как правило, имеют одинаковую базовую структуру (аналог фармакофора – молекулярного «остова», играющего важную роль в биологической активности лекарства), но отличаются между собой комбинациями различных дополнительных элементов (рис. II). Определенное сочетание таких элементов существенно для многих характеристик лекарственного препарата. Например, оно может влиять на сродство (аффинность) к мишени, что очень важно для лекарств, так как эффективность их связывания с мишенью должна быть значительно выше, чем у природных субстратов или лигандов.

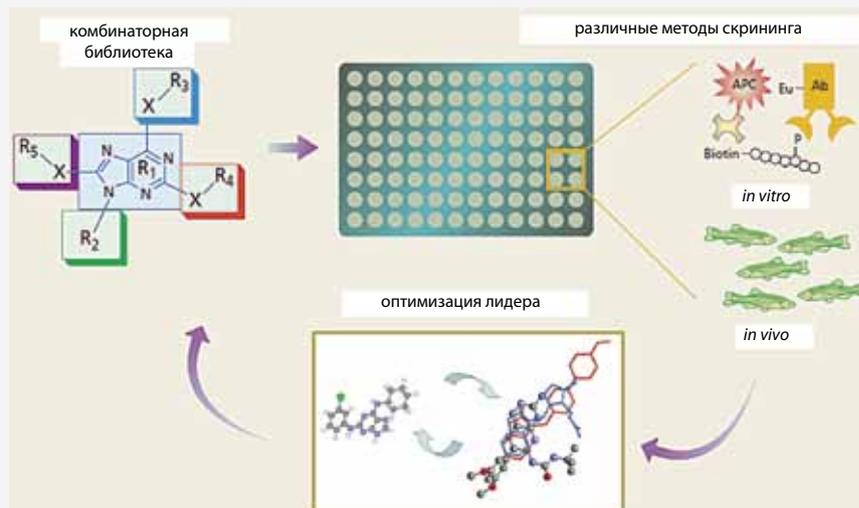


Рис. II. Схема получения лекарства из комбинаторной «библиотеки»

Слева схематично представлена комбинаторная «библиотека», включающая в себя набор синтезированных соединений, имеющих общий базовый элемент – аналог фармакофора (в центре, выделен голубым фоном) и отличающихся сочетаниями различных дополнительных группировок (показаны разными цветами). В центре вверху показан 96-луночный блок с тест-системой для анализа *in vitro* биологической активности различных соединений из «библиотеки». В результате масштабного скрининга *in vitro* идентифицируются несколько соединений, обладающих нужной активностью (хиты, от англ. *hit* – попадание). Дополнительный *in vitro* и/или *in vivo* скрининг хит-соединений позволяет отобрать структурный прототип будущего лекарства – соединение-лидер (справа). Процесс оптимизации «лидера» происходит путем получения на его основе дополнительной комбинаторной «библиотеки» и нового цикла скрининга полученных модификаций лидера по их активности и другим характеристикам. В результате отбираются лекарства-кандидаты, которые подвергаются клиническим испытаниям. Рисунок адаптирован из статьи S. Ding & P. Schultz [36].

Прогресс в выявлении молекулярных клеточных мишеней привел к созданию на их основе тестовых систем, которые можно использовать для быстрого *in vitro* анализа активности соединений в качестве лекарств-кандидатов. Эти тестовые системы могут представлять собой, например, анализируемый белок-мишень с его субстратом, причем последний модифицирован таким образом, что это дает возможность легко определять активность белка (скажем, по изменению окраски). Такая технология фармакологических испытаний получила название «высокопроизводительный скрининг» (HTS, *high throughput screening*). HTS позволяет очень быстро и достаточно дешево отбирать из сотен тысяч и даже из миллионов соединений молекулы, которые обладают активностью против определенных клеточных мишеней.

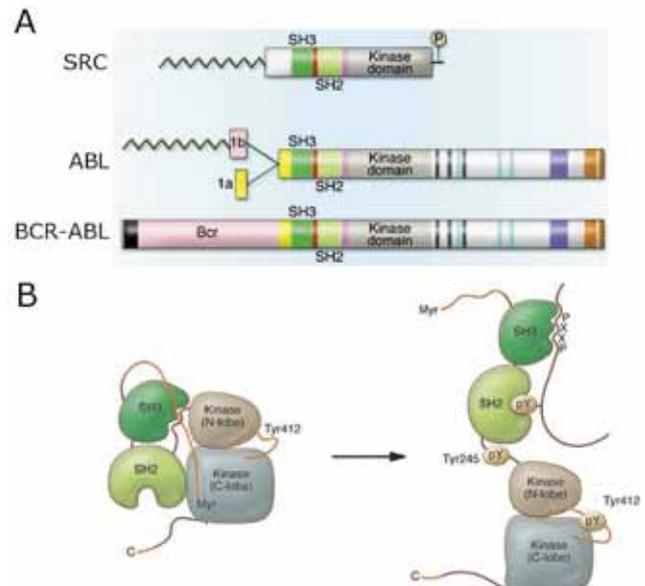
После проведения скрининга «библиотеки» из нее обычно отбирается несколько соединений, так называемых соединений-лидеров (*lead compounds*), которые обладают заметной активностью по отношению к данной мишени. Для улучшения биологической активности и других фармацевтических характеристик (например, доступности или токсичности) выявленного соединения-лидера (оптимизация лидера) также используется комбинаторный синтез, который позволяет проводить быструю и разнообразную модификацию лидера [32].

Кроме классических таргетных препаратов, которые целенаправленно синтезируются в качестве агентов, способных специфично связываться с определенными функциональными доменами патогенных белков, к этой группе лекарств можно отнести и некоторые другие соединения. Например, препараты, которые нацелены на молекулы, участвующие в формировании определенного клеточного фенотипа. К таким лекарствам относится, в частности, моноклональное антитело ритуксимаб (rituximab), мишенью которого является CD20 антиген поверхности В-клеток, и которое применяют для лечения В-клеточных неходжкинских лимфом (В-НХЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и некоторых других заболеваний [9]. К таргетным препаратам можно также отнести и полностью трансретиноевую кислоту (**all-trans retinoic acid**, ATRA), которую применяют при терапии острого промиелоцитарного лейкоза. В данном случае ATRA в терапевтической концентрации, которая значительно превышает физиологический уровень, вызывает переключение активности онкогенного PML-RAR-белка, возникающего при хромосомной транслокации t(15;17)(q22;q21), от репрессии к активации транскрипции генов-мишеней нормального ядерного рецептора ретиноевой кислоты – RAR $\alpha$ . Такое переключение приводит к дифференцировке злокачественных промиелоцитов и ремиссии заболевания [10].

Более подробно технология драг-дизайна таргетных препаратов (см. Приложения 1 и 2) будет рассмотрена на примере самого успешного их применения, а именно на примере ингибиторов цитоплазматической тирозинкиназы BCR-ABL, являющейся триггером развития хронического миелолейкоза (ХМЛ) и Ph<sup>+</sup> острых лейкозов (см. таблицу).

### Ингибиторы связывания тирозинкиназы BCR-ABL с аденозинтрифосфатом

Хромосомная транслокация t(9;22)(q34;q11), сопровождающаяся генерацией так называемой филадельфийской хромосомы (Ph, 22q-), а также продукты этой транслокации (химерные гены и белки BCR-ABL) являются излюбленными объектами многих гематологов и молекулярных онкологов. С этой патологией связаны многие фундаментальные открытия, которые существенно продвинули нас в понимании молекулярных процессов, происходящих в клетках при их опухолевой трансформации. Проблемам, так или иначе связанным с молекулярными аспектами биологии ХМЛ и Ph<sup>+</sup> острых лейкозов, посвящено множество обзоров, поэтому не будем повторяться, а направим читателя к некоторым из них [11–15]. На рис. 1 приведена основная информация о структуре белков ABL и BCR-ABL, которая будет необходима для рассмотрения процессов создания и применения таргетных препаратов, направленных против этих белков. Некоторые важные моменты, касающиеся активных и автоингибирующих



**Рис. 1.** Доменная структура SRC, ABL и BCR-ABL протеинкиназ (A) и схема неактивной и активной конформации ABL (B)

(A) SRC- и ABL-киназы имеют участки с высокой гомологией (~ 50 %, выделены более темным общим фоном), которые включают тирозинкиназный домен (kinase domain), SRC гомологичный 2 (SH2, SRC homology) и SH3-домены (см. [2], рис. 3). Две изоформы ABL продуцируются в результате альтернативного сплайсинга с включением в белок одного из двух первых ABL-экзонов (1a или 1b). Изоформа ABL1b содержит на N-конце сайт миристилирования (Myr, см. [2], Приложение 1), что предопределяет клеточную локализацию разных изоформ белка: модифицированный миристалом (показан волнистой линией) ABL1b изоформа белка может связываться с мембранами, и локализована преимущественно в цитоплазме, а ABL1a изоформа – в ядре. ABL в отличие от белков SRC-семейства имеет протяженный C-конец, на котором локализовано много функциональных доменов и мотивов: 3 пролин-богатые области (PxxP, показаны серыми полосками) являются стыковочными сайтами для SH3-доменов других белков; 3 сигнала ядерной локализации (NLS, nuclear localisation signals, голубые полоски); домен связывания с ДНК (фиолетовая полоска) и домены связывания с G- и F-актином (коричневые полосы), разделенные сигналом экспорта из ядра (NES, nuclear export signal, белая полоска). На N-конце BCR-ABL-белка расположен домен димеризации, привнесенный в химерный белок BCR (черная полоска). (B) Схема автоингибирующей (слева) и активной (справа) конформации ABL-киназы (подробности см. [2], рис. 3). Миристалм участвует в поддержании автоингибирующей конформации, связываясь с аллостерическим сайтом в C-половине киназного домена. Сближение белка с миристалм-специфичными мембранными микродоменами («плотиками», см. [2], Приложение 1) приводит к связыванию Myr с мембраной и дестабилизации конформации автоингибирования. Рисунок адаптирован из статьи Т. Hunter [15].

конформаций протеинкиназ, а также их функционирования в клетке в норме и при гемобластозах, были рассмотрены в предыдущих лекциях [2, 3].

Лечение ХМЛ в хронической фазе с помощью специфичных таргетных препаратов, которые являлись конкурентными ингибиторами связывания аденозинтрифосфата (АТФ) с онкогенной тирозинкиназой BCR-ABL, стало ключевым моментом в медицине последних 10-летий, что привело, с одной стороны, к появлению надежды на возможность успешно противодействовать не только онкологическим, но и другим тяжелым заболеваниям человека, а с другой стороны, породило

целую индустрию разработки новых лекарств для таргетной терапии. Однако сегодня можно сказать, что многие ожидания не оправдались, а массированное изготовление и клинические испытания таргетных препаратов, направленных против различных онкогенных белков-мишеней, поставили больше вопросов, нежели дали приемлемые положительные результаты. На некоторые из этих вопросов мы попытаемся ответить в этой лекции.

Было показано, что первый из препаратов этого ряда, разрешенный для клинического использования, иматиниб, давал очень хорошие результаты у больных в хронической фазе ХМЛ, но уже в фазе акселерации, и тем более в фазе бластного криза его эффект был практически идентичен традиционным методам химиотерапии. Возможный ответ на этот парадокс кроется в особенностях течения и эволюции ХМЛ, а также в некоторых исключительных качествах BCR-ABL-белка, являющегося триггером опухолевой трансформации при этом заболевании.

Действительно, сравнение структур 2 потенциально опухолеродных цитоплазматических тирозинкиназ SRC и ABL показывает, что они существенно различаются (рис. 1). Белок ABL по сравнению с белками SRC-семейства имеет очень протяженный С-конец, который содержит большое число различных функциональных доменов и мотивов. Эта особенность ABL-белка позволяет ему связываться и активировать (фосфорилировать) значительно большее количество разнообразных белков-мишеней. Причем это будут не только эффекторные белки путей сигнальной трансдукции (наиболее обычные мишени для SRC), но и белки, участвующие в клеточном ответе на повреждения ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза, белки-эффекторы клеточной адгезии и миграции. Все эти многочисленные функции ABL тонко регулируются в клетке не только с помощью традиционных для протеинкиназ конформационных ограничений [3], но и с помощью контроля генной транскрипции, в результате которого могут синтезироваться 2 изоформы белка (ABL1a и ABL1b), локализующиеся в разных клеточных компартментах и выполняющие разные функции (рис. 1) [16]. Такая широкая палитра активностей позволяет ABL в случае его конститутивной активации самостоятельно индуцировать в клетке процессы малигнизации. Это делает ХМЛ, во всяком случае на первичных этапах своего развития (хроническая фаза), классическим примером опухоли, обладающей свойствами «онкогенной зависимости» (oncogene addiction) (см. Приложение 3) [17–19]. В онкоген-зависимом состоянии опухолевые клетки крайне чувствительны к препаратам, которые ингибируют активность онкогена, контролирующего основные клеточные пути пролиферации и/или выживания в этих клетках. Быстрая и эффективная инактивация онкобелка во время таргетной терапии приводит клетки опухоли в состояние «онкогенного шока» (oncogenic shock), вызывая их гибель в результате необратимого

апоптоза. Таким образом, складывается впечатление, что наличие у опухоли онкогенной зависимости является ее ахиллесовой пятой и важным обоснованием применения целенаправленной молекулярной терапии. Поэтому тестирование опухолей на наличие таких свойств – важный этап исследований больного, необходимый для повышения эффективности разрабатываемых сегодня новых методов лечения [18].

Лейкозные клетки при ХМЛ, как и клетки других неоплазий, в процессе развития опухоли могут приобретать дополнительные мутации [20], которые увеличивают их генетическую пластичность – клетки быстрее накапливают новые геномные aberrации, активируют иные, «резервные» сигнальные пути выживания, что, в свою очередь, приводит к утрате их онкогенной зависимости. Все эти процессы, разворачивающиеся на терминальных стадиях эволюции опухоли (фаза бластного криза при ХМЛ), приводят к существенному повышению резистентности лейкозных клеток к таргетной терапии, направленной против активности белка BCR-ABL. С этой точки зрения нет ничего неожиданного в том, что при ХМЛ на стадиях акселерации и бластного криза ответ на терапию иматинибом чаще всего был очень слабым.

Другой неожиданностью применения иматиниба для лечения ХМЛ стали результаты анализа случаев рецидивов заболевания после курса терапии. Рецидивные опухоли почти всегда приобретали устойчивость к иматинибу, и в большинстве случаев эта резистентность была результатом мутаций в киназном домене BCR-ABL, которые приводили к уменьшению эффективности связывания ингибитора с активным центром фермента [11, 21]. Мутациям подвергались в основном кодоны, которые кодировали аминокислотные остатки, формирующие АТФ-связывающий «карман» или Р-петлю в активном центре BCR-ABL [3]. К наиболее драматичному снижению (более чем в 20 раз) констант ингибирования (рис. 2B) иматинибом BCR-ABL приводили мутации T315I (замена треонина на изолейцин в 315 аминокислотном остатке) в АТФ-связывающем «кармане», а также Y253H (замена тирозина на гистидин) и E255V (замена глутамина на валин) в Р-петле активного центра тирозинкиназы. В рамках дарвинизма объяснить такое «целенаправленное» мутирование в определенном геномном локусе довольно трудно, тем более что общий уровень мутагенеза в резистентных к иматинибу лейкозных субклонах не был существенно выше, чем в других лейкозных клетках. Обычно такого рода феномены объясняют так – в опухолевой популяции еще до курса терапии могли существовать клетки, несущие мутации данного типа, из которых впоследствии и сформировался рецидивный, устойчивый к ингибитору лейкозный субклон. Однако следует отметить, что прямых экспериментальных доказательств наличия в первичных ДНК-пробах (взятых до начала лечения) мутаций, придающих резистентность к иматинибу, пока не получено...

Приложение 3. Онкогенная зависимость

В течение всей своей жизни клетка получает из окружающей среды и генерирует сама многочисленные сигналы, побуждающие ее к различному поведению – размножению, росту, покою, старению и даже смерти. Такое балансирование клеток между жизнью и смертью лучше всего иллюстрируется состоянием В-клеток в герминативных центрах, где в условиях постоянной внешней индукции процессов апоптоза, осуществляемой цитотоксическими Т-киллерами, выживают только В-клетки с высокой авидностью, которая позволяет им генерировать повышенный уровень BCR-сигнализации (см. [4], Приложение 2). В процессе развития опухоли ее клетки приобретают большое число различных геномных aberrаций, многие из которых дают им преимущество в росте и выживаемости по сравнению не только с нормальными клетками организма, но и с другими клетками опухоли. Чаще всего мутациям подвергаются протоонкогены и гены-супрессоры опухоли, причем в каждой опухоли в процессе ее эволюции формируется уникальный спектр активированных и инактивированных с помощью разных механизмов онкогенов и генов-супрессоров соответственно [1, 20]. Однако клетки некоторых опухолей могут длительное время существовать в состоянии, когда их жизнедеятельность во многом определяется конститутивной активацией одного онкогена, приводящей, в свою очередь, к аномально высокому уровню сигнализации какого-то одного пути выживания. Такое состояние опухолевых клеток называется «онкогенной зависимостью» (oncogene addiction) и оно характеризуется тем, что инактивация каким-либо образом данного онкогена в этих клетках неминуемо приведет к их гибели (рис. III) [17–19].

Явление «онкогенной зависимости» было подтверждено для нескольких онкогенов на мышиных моделях и опухолевых клетках человека. К таким онкогенам относятся c-MYC (неходжкинские лимфомы, Т-ОЛЛ, ОМЛ и остеогенная саркома), BCR-ABL (Ph<sup>+</sup> лейкозы), H-RAS (меланома), K-RAS (рак легких) и HER2 (рак груди) [18, 19]. Для всех этих опухолевых моделей показано, что инактивация индуцирующих развитие опухоли онкогенов или ингибирование синтезирующихся с них онкобелков приводили к гибели опухолевых клеток или к их реверсии в сторону нормального фенотипа. Кроме того, появляется все больше данных, которые подтверждают, что наличие или отсутствие статуса «онкогенной зависимости» у опухоли может играть решающую роль в эффективности применения таргетных препаратов при антираковой терапии.

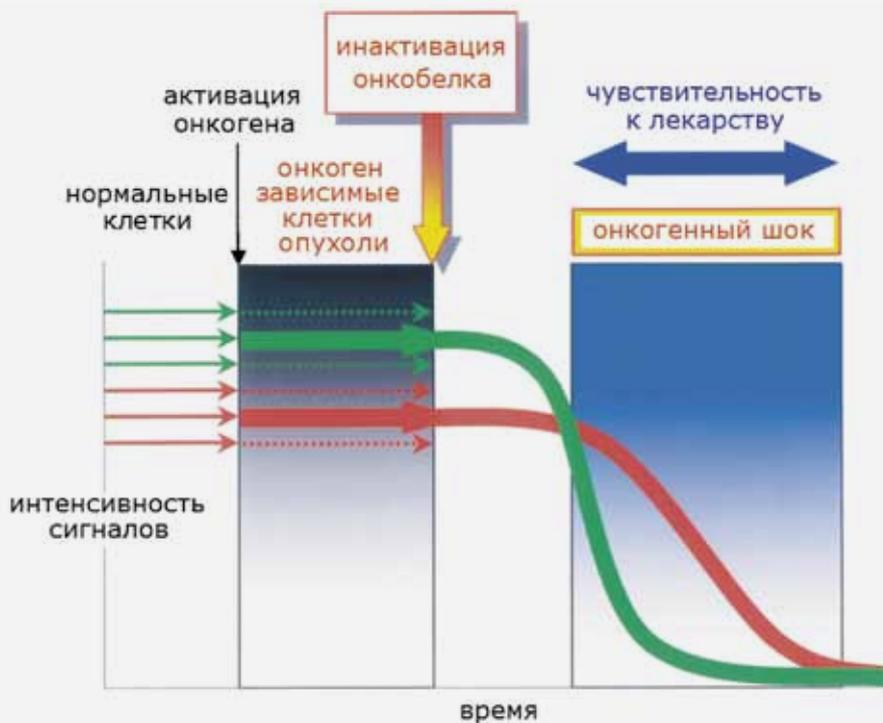
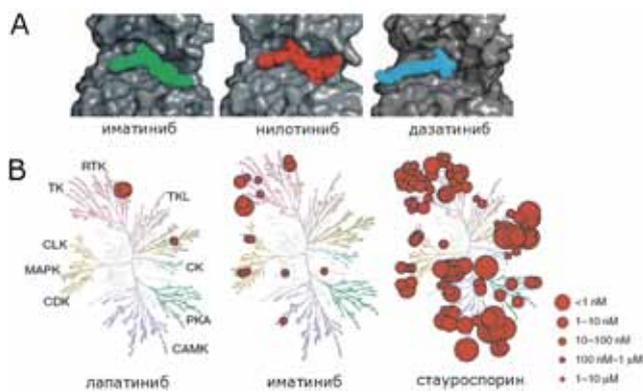


Рис. III. Схема, показывающая соотношение между онкогенной зависимостью и онкогенным шоком

В нормальных клетках многочисленные сигналы выживания (зеленые стрелки) преобладают над различными проапоптотическими стимулами (красные стрелки). В раковых клетках активация онкогена может приводить к аномальной активации одного из сигнальных путей выживания. Такое доминирующее положение одного из сигнальных путей (толстая зеленая стрелка) может привести к постепенной атрофии других путей выживания (пунктирные зеленые стрелки) и формированию состояния «онкогенной зависимости». В клетках существуют компенсационные механизмы сигналов смерти (пунктирные красные стрелки), а в онкогенно-зависимых клетках, вероятно, один из таких сигнальных путей (в норме уравновешивающий доминирующий в них сигнал выживания) может быть усилен (толстая красная стрелка). В состоянии онкогенной зависимости активированный путь выживания, контролируемый онкогенным белком, преобладает над проапоптотическими стимулами. При быстрой инактивации онкогенного белка, например с помощью эффективной таргетной терапии, возникает состояние «онкогенного шока» (oncogenic shock), при котором резкое затухание доминирующих сигналов выживания приводит к гибели клеток. Это связано с тем, что реакция проапоптотических клеточных путей на неожиданно сильное ослабление сигналов выживания будет более инертной. Таким образом, в течение определенного времени «уязвимости» (обозначено синей двусторонней стрелкой) проапоптотические сигналы будут преобладать над сигналами выживания и индуцировать необратимый апоптоз опухолевых клеток. Рисунок адаптирован из статьи S. Sharma & J. Settleman [37].



**Рис. 2.** Структура активного центра *ABL*-киназы в комплексе с различными ингибиторами (А) и селективность некоторых ингибиторов киназ (В)

(А) Показана поверхность кристаллических структур *ABL*-киназы в комплексе с иматинибом (зеленый), нилотинибом (красный) и дазатинибом (синий). Аминокислотные остатки *P*-петли и петли активации не показаны (см. также [3], глава 2, рис. 1).

(В) Различная селективность ингибиторов киназ показана на дендрограмме киназ — так называемой «киноме» (*kinome*), которая представляет собой условное изображение всех протеинкиназ человека, сгруппированных по родственному белковому семейству («ветки» киномого «дерева»). Справа — графическое изображение констант ингибирования ( $IC_{50}$  представляет собой концентрацию лекарства, которая требуется для 50 % ингибирования фермента). Чем меньше величина  $IC_{50}$ , тем эффективней ингибитор (здесь — больше диаметр красных кружков). Из диаграммы видно, что наиболее избирательным ингибитором является лапатиниб (фирменное название — *Tykerb*), который является высокоспецифичным ингибитором *HER2* и *EGFR* (см. таблицу). Специфичность иматиниба ниже, кроме *ABL* и *BCR-ABL* он в той или иной степени ингибирует другие цитоплазматические тирозинкиназы (*TK*), некоторые рецепторные тирозинкиназы (*RTK*) и киназы из других семейств. Очень активным, но неселективным ингибитором большого числа протеинкиназ является природный антибиотик стауроспорин.

Аббревиатуры основных семейств протеинкиназ, изображенных на «дерево киномы» (слева): *CAMK* — calcium/calmodulin-dependent kinases; *CDK* — cyclin-dependent kinases; *CK* — casein kinase family; *CLK* — CDK-like kinases; *MAPK* — mitogen-activated protein kinases; *PKA* — protein kinase A family; *RTK* — receptor tyrosine kinases; *TK* — nonreceptor tyrosine kinases; *TKL* — tyrosine kinase-like kinases.

Рисунок адаптирован из статей E. Weisberg et al. [22] и I. Collins & P. Workman [23].

Для преодоления проблемы возникновения устойчивости к иматинибу, а также для увеличения специфичности и чувствительности лекарств были получены новые конкурентные ингибиторы *BCR-ABL* — нилотиниб и дазатиниб. Эти препараты также имеют сродство с АТФ-связывающим «карманом», но их константы ингибирования *BCR-ABL* превосходят иматиниб в 20 (нилотиниб) и даже в 300 раз (дазатиниб) [11]. Это связано с тем (рис. 2А), что конкурентные ингибиторы занимают немного различающиеся положения в АТФ-связывающем «кармане» белка. На рис. 2А показана схема локализации всех 3 конкурентных ингибиторов в активном центре *BCR-ABL*, из которой видно, что эти соединения занимают здесь немного различающиеся положения (они как бы «ползают» по активному центру). Такое разное позиционирование может приводить к тому, что некоторые мутации, которые придавали белку устойчивость к иматинибу, не будут оказывать существенного влияния на эффективность связывания но-

вых ингибиторов с ферментом, так как в данном случае эти мутировавшие аминокислоты могут не участвовать во взаимодействиях белок–ингибитор. Однако 1 мутация (Т315I) оказалась «роковой» и для этих лекарственных препаратов, вызывая снижение их сродства к ферменту более чем в 200 раз [11]. Несмотря на наличие определенной перекрестной чувствительности разных ингибиторов к некоторым мутациям, вызывающим резистентность к иматинибу, применение комбинированной терапии с использованием сочетаний различных таргетных препаратов способно существенно снизить риск рецидива заболевания.

### Ингибиторы протеинкиназ иного типа

Ранее мы уже отмечали, что использование АТФ в качестве прототипа ингибиторов протеинкиназ может приводить к низкой специфичности таргетных препаратов. Эти опасения вызваны тем, что все киназы имеют АТФ-связывающие участки, и ингибиторы подобного типа могут в той или иной степени взаимодействовать и инактивировать целый ряд нормальных клеточных протеинкиназ, вызывая, таким образом, побочные цитотоксические эффекты [3]. Наглядная иллюстрация различной специфичности конкурентных ингибиторов протеинкиназ представлена на рис. 1В. Однако такая мультикиназная активность некоторых ингибиторов позволяет использовать эти препараты для лечения нескольких заболеваний. Так, например, иматиниб достаточно успешно используется при таргетной терапии стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (*GIST*, см. таблицу). А ингибитор *VX-680/МК-0457*, который был разработан для инактивации некоторых киназ клеточного цикла, неожиданно показал активность против Т315I мутантной *BCR-ABL*-киназы, что позволило применить этот препарат для лечения рецидива ХМЛ у пациентов с иматиниб-устойчивым фенотипом [24]. В обоих случаях открытие «побочной» активности этих препаратов было сделано после их клинического испытания по другим показаниям. Поэтому доклиническая проверка специфичности получаемых ингибиторов с использованием тест-систем, содержащих большую часть ферментов «киномы» человека (рис. 2В), может существенно расширить палитру возможного клинического применения имеющихся таргетных препаратов.

В лекции № 3, которая вышла из печати в конце лета 2011 г., было высказано предположение о том, что специфичность таргетных препаратов, мишенью которых станут разнообразные неактивные конформации протеинкиназ, будет значительно выше современных конкурентных ингибиторов [3]. А уже через пару месяцев появилась публикация, в которой сообщалось о первых попытках получить соединения такого типа [25]. В этой работе описана альтернативная стратегия «нацеливания» на регуляторные модули *BCR-ABL*, которая может служить хорошим дополнением к терапии конкурентными ингибиторами. Авторы получили мини-антитело (*mono body*), которое стабилизирует ав-

тоингибирующую конформацию тирозинкиназы. Дело в том, что для формирования активной конформации фермента необходимо определенное взаимодействие между SH2 и киназными доменами BCR-ABL, при котором образуется специфичная контактная поверхность (интерфейс) между этими доменами. Нарушение такого интерфейса приводит к дестабилизации активной конформации белка и инактивации тирозинкиназной активности. Полученное мини-антитело обладает способностью «вклиниваться» между SH2 и киназными доменами BCR-ABL, нарушая тем самым их взаимодействие. Это мини-антитело высокоспецифично и образует с белком очень стабильные комплексы, что приводит к полному ингибированию киназной активности BCR-ABL как *in vitro*, так и в первичных ХМЛ-клетках, вызывая их апоптоз. Неудобство полученного агента для клинического применения заключается в том, что самостоятельно проникать в клетку, как это делают низкомолекулярные конкурентные ингибиторы, он не может. Поэтому в экспериментах *in vivo* его приходилось вводить в клетки с помощью трансфекции. Но важен сам факт, что агенты, дестабилизирующие активную конформацию протеинкиназ, обладают значительным терапевтическим потенциалом.

Регуляция ферментативной активности путем взаимодействия с белковыми доменами, которые не относятся к каталитическому центру, называется аллостерической. Поэтому описанное выше мини-антитело относится к аллостерическим таргетным препаратам. Ранее были описаны другие аллостерические таргетные агенты, мишенью которых являлась тирозинкиназа BCR-ABL [26, 27]. Например, одним из аллостерических регуляторных сайтов ABL-белка является «карман» на поверхности C-половины киназного домена, который взаимодействует с миристатином (остаток миристиновой кислоты, см. [2], Приложение 1) при формировании стабильной автоингибирующей конформации (рис. 1B). Удаление миристата из этого «кармана» при его связывании с мембраной в определенных компартментах клетки приводит к дестабилизации и разрушению автоингибирующей конформации ABL и резкому увеличению киназной активности. В гибридном белке BCR-ABL сайт миристилирования (к которому прикрепляется миристат при модификации белка, в ABL он находится в экзоне 1b) отсутствует, так как он удаляется при хромосомной транслокации (рис. 1A). Поэтому было высказано предположение, что химические соединения, способные прочно связываться с миристат-«карманом», могут восстанавливать некоторые автоингибирующие свойства, утерянные BCR-ABL. Однако первые созданные агенты (например, GNF2), взаимодействующие с миристат-«карманом», оказались не очень удачными, так как многие BCR-ABL-мутации, устойчивые к конкурентным ингибиторам (в том числе и T315I), каким-то загадочным образом были резистентны к GNF2.

Сегодня предпринимаются попытки создать эффективные аллостерические ингибиторы BCR-ABL, ориентированные не только на миристат-«карман» или поверхность взаимодействия между SH2 и киназными доменами, но и на N-концевой домен олигомеризации в BCR-части онкобелка BCR-ABL [27]. Этот домен очень важен для реализации конститутивной активации BCR-ABL, так как димеризация этого белка приводит к сближению и перекрестному фосфорилированию киназных доменов ABL, что приводит к активации тирозинкиназы. Данный процесс аналогичен активации рецепторных протеинкиназ в результате их димеризации при связывании с лигандом [2, 3]. Создание обширного набора таргетных препаратов, нацеленных на различные функциональные домены онкобелков, позволит в будущем принимать рациональные решения для получения хороших результатов путем дифференциального сочетания лекарств с различной специфичностью.

Стоит также отметить факты, которые свидетельствуют о том, что опухолевые клетки могут совершенно по-разному реагировать на фактически идентичное воздействие (ингибирование киназной активности препаратами, нацеленными на АТФ-связывающий участок белка) в зависимости от того, какая протеинкиназа подвергается атаке. Например, белок-«многостаночник» BCR-ABL, имеющий много разных клеточных мишеней, и активность которого определяет онкогензависимый характер опухоли, является важнейшим фактором поддержания опухолевого статуса клетки. Потеря его активности для клеток неприемлема, поэтому стратегия лекарственной резистентности реализуется в виде мутаций аминокислот в активном центре фермента, что приводит к ухудшению его связывания ингибиторами и восстановлению онкогенной активности. В то время как применение ингибитора вемурафениба, специфично инактивирующего серин-треониновую протеинкиназу B-RAF, для лечения метастатической меланомы, клетки которой имеют активирующие мутации в гене B-RAF (см. таблицу), часто сопровождалось другими ответами на терапию. Белки RAF являются важнейшими компонентами RAS-RAF-МЕК-ERK-пути сигнальной трансдукции — основного индуктора пролиферации клеток (см. [3], рис. 2), поэтому ингибирование RAF должно приводить к затуханию этого сигнального пути и торможению клеточного деления. Однако совершенно парадоксальным оказался тот факт, что клетки опухоли, ставшие резистентными к препарату, показывали существенное увеличение МЕК-ERK-сигнализации и клеточной пролиферации [28]. Исследование этого парадокса выявило удивительную генетическую пластичность клеток меланомы, которая позволяла им с помощью различных механизмов преодолевать влияние ингибитора. И хотя B-RAF является важным компонентом сигнальной трансдукции, стратегия обретения опухолевыми клетками резистентности была связана не с восстановлением былой онкогенной ак-

тивности В-RAF, а с компенсацией этой потери с помощью активации других компонентов сигнального пути [29]. Все дополнительные aberrации, приобретенные (или отобранные) клетками опухоли под селективным давлением терапии, приводили к одному результату – поддержанию аномально высоких уровней RAS-RAF-MEK-ERK-сигнализации и клеточной пролиферации, т. е. к восстановлению (правда, уже в более агрессивной форме) прежнего опухолевого фенотипа.

### Заключение

*Пациент является наиболее важным фактором, определяющим терапевтическую эффективность.*

Гиппократ (цитируется по [30])

Очевидно, что онкогематология является первой медицинской дисциплиной, которая вплотную подошла к реализации стратегии, известной сегодня как «персонализированная медицина» (personalized medicine), при которой выбор лечения для каждого пациента осуществляется индивидуально. Воз-

можность применения такого подхода отражает многие достижения в онкологии и связанных с ней дисциплинах: 1) прогресс в познании молекулярной и генетической природы опухолей; 2) появление технологий выявления опухоль-специфичных и прогностических биомаркеров, позволяющих проводить более дифференцированную стратификацию пациентов и осуществлять постоянный контроль за ходом терапевтического процесса; 3) возникновение индустрии разработки новых лекарственных препаратов для таргетной терапии. Все это позволяет отойти от эмпирической модели лечения – «один препарат подходит всем» – к целенаправленному индивидуальному подходу, основанному на рациональном клиническом применении высокоспецифичных противоопухолевых лекарств в сочетании с постоянным диагностическим тестированием процесса терапии на клеточном и молекулярном уровнях [31]. Все вышесказанное представляет собой следующий шаг в улучшении качества оказания медицинской помощи онкологическим больным.

## Л и т е р а т у р а

1. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза (цикл лекций для врачей). Лекция № 1. Онкогематол 2010;4:49–56.
2. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 2. Механизмы реализации сигнальной трансдукции. Онкогематол 2011;1:76–84.
3. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 3. Гемобласты миелоидного происхождения. Онкогематол 2011;3:82–93.
4. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 4. Гемобласты лимфоидного происхождения. Онкогематол 2011;4:39–49.
5. Martini M., Vecchione L., Siena S. et al. Targeted therapies: how personal should we go? Nat Rev Clin Oncology 2012;9:87–97.
6. Dancey J., Bedard P., Onetto N., Hudson T. The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell 2012;148:409–20.
7. Переводчикова Н. Таргетные препараты и их место в современной терапии опухолевых заболеваний. Клинич онкогематол 2009;2:367–73.
8. Billingsley M. Druggable targets and targeted drugs: enhancing the development of new therapeutics. Pharmacology 2008;82:239–44.
9. Oflazoglu E., Audoly L. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. MAbs 2010 Jan–Feb;2(1):14–9.
10. Licht J. Acute promyelocytic leukemia – weapons of mass differentiation. New Engl J Med 2009;360:928–30.
11. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. Blood 2009;113:1619–30.
12. Melo J., Barnes D. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:441–53.
13. Hazlehurst L., Bewry N., Nair R., Pinilla-Ibarz J. Signaling networks associated with BCR-ABL dependent transformation. Cancer Control 2009;16:100–7.
14. Frazer R., Irvine A., McMullin M. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. Ulster Med J 2007;76:8–17.
15. Hunter T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. J Clin Invest 2007;117:2036–43.
16. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation and specificity. Sci Signal 2010;3:re6.
17. Sharma S., Settleman J. Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and «oncogenic shock». Biochem Pharm 2010;80:666–73.
18. Weinstein I., Joe A. Oncogene addiction. Cancer Res 2008;68:3077–80.
19. Luo J., Solimini N., Elledge S. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell 2009;136:823–37.
20. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646–74.
21. O'Hare T., Eide C., Deininger M. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood 2007;110:2242–9.
22. Weisberg E., Manley P., Cowan-Jacob S. et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer 2007;7:345–56.
23. Collins I. & Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. Nat Chem Biol 2006;2:689–700.
24. Karaman M., Herrgard S., Treiber D. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 2008;26:127–32.
25. Grebien F., Hantschel O., Wojcik J. et al. Targeting the SH2-kinase interface in Bcr-Abl inhibits leukemogenesis. Cell 2011;147:306–19.
26. Hassan Q., Sharma S., Warmuth M. Allosteric inhibition of BCR-ABL. Cell Cycle 2010;9(18):3710–4.
27. Hantschel O. Allosteric BCR-ABL inhibitors in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: novel opportunities for drug combinations to overcome resistance. Haematologica 2012;97:157–9.
28. Cox A., Der C. The Raf inhibitor paradox: unexpected consequences of targeted drugs. Cancer Cell 2010;17:221–3.
29. Cox A., Der C. The RAF inhibitor paradox revisited. Cancer Cell 2012;21:147–9.
30. Jackson D., Sood A. Personalized cancer medicine – advances and socio-economic challenges. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:735–41.
31. Thangue N., Kerr D. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:587–96.
32. Bleicher K., Bohm H-J., Muller K., Alanine A. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. Nat Rev Drug Discovery 2003;2:369–78.
33. Чугунов А. Драг-дизайн: как в современном мире создаются новые лекарства. Биомолекула 2004 (<http://www.biomolecula.ru/content/15>).
34. Schneider G., Fechner U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. Nat Rev Drug Discovery 2005;4:649–63.
35. Dittrich P., Manz A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. Nat Rev Drug Discovery 2006;5(3):210–8.
36. Ding S., Schultz P. A role for chemistry in stem cell biology. Nature Biotechnology 2004;22:833–40.
37. Sharma S., Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. Genes Dev 2007;21:3214–31.



15 февраля уже в течение 10 лет весь мир отмечает Международный день борьбы с детским раком. В этот день мы с надеждой смотрим в будущее, ведь современные технологии и своевременно начатая терапия по высокоэффективным протоколам позволяют успешно излечивать большинство заболевших детей. Это событие демонстрирует, как значимо повысилась роль детской гематологии-онкологии в мире.

В Российской Федерации данной проблеме с каждым годом уделяется все большее внимание – открываются новые центры и отделения детской гематологии-онкологии, улучшается оснащение клиник и повышается квалификация врачей. На сегодняшний день излечивается более половины пациентов, в лучших федеральных учреждениях они получают высокотехнологичную помощь на основе самых передовых стандартов лечения.

Особое внимание уделяется ранней диагностике, выявлению рецидивов и назначению своевременного лечения, а также развитию паллиативной помощи. Как сказано в информационном письме Международного общества педиатров-онкологов (International Society of Paediatric Oncology – SIOP), при ранней и правильной диагностике возможно успешно лечить более 70 % заболеваний гематологического и онкологического профиля. Для этого необходимы сплоченные действия людей различных специальностей во всех странах мира, ведь зачастую первые признаки гематологических и онкологических заболеваний могут маскироваться под «безобидные» состояния.

В этот день SIOP призывает не только медицинскую общественность, но и всех тех, кто причастен к здоровью детей, объединиться в деле борьбы с детским раком. Вместе мы можем многое!

**С.Р. Варфоломеева, К.И. Киргизов**

*Национальное общество детских гематологов и онкологов, Москва, Россия*



### Всемирные организации по борьбе с детским раком начинают кампанию по раннему распознаванию онкологических заболеваний для спасения тысяч детских жизней

Женева | 15 февраля 2012 г.



Сегодня Международный день борьбы с детским раком. Международное общество педиатров-онкологов (International Society of Paediatric Oncology – SIOP) и Международная конфедерация организаций родителей детей с онкологическими заболеваниями (International Confederation of Childhood Cancer Parent Organizations – ICCPO) начинают целенаправленную кампанию по просвещению широких слоев населения о ранних признаках детских онкологических заболеваний.

Каждый год 175 000 детей по всему миру заболевают раком, из них 90 000 впоследствии погибают от данного заболевания. Точное количество новых случаев неизвестно, поскольку во многих странах регистрируются не все дети с онкологическими заболеваниями, а многим диагнозом ставится неправильно. Эти цифры особенно поразительны, если учесть, что 70 % злокачественных опухолей у детей могут быть излечены при ранней и правильной постановке диагноза и своевременном начале лечения. Онкологические заболевания занимают 2-е место в качестве причины смерти у детей в развитых странах. Наиболее частым типом рака в Европе, Северной и Южной Америке, Восточной Азии у европейского населения является острый лимфобластный лейкоз, в то время как лимфома Беркитта, связанная с малярией и инфицированием вирусом Эпштейна–Барр, составляет половину детских лимфом в африканских странах.

«Симптомы рака часто интерпретируются как обычные детские заболевания», – предупреждает Габриэла Каламинус, президент SIOP.

Следующие симптомы, если они не проходят, могут служить признаками онкологического заболевания у ребенка:

- белое пятно в глазу, появление косоглазия, слепота, выпячивание глазного яблока;
- опухоль в животе или в тазовой области, на голове, шее, конечностях, яичках, железах;
- необъяснимый длительный подъем температуры, сохраняющийся более 2 недель;
- потеря веса, бледность, утомляемость, появление синяков или кровотечений;
- боли в костях, суставах, спине, переломы от незначительной травмы;
- неврологические признаки: нарушение походки, равновесия, речи, потеря уже приобретенных навыков в развитии;
- головная боль более 2 недель, с наличием рвоты или без нее, увеличение размера головы.

«При наличии этих симптомов жизненно необходимо, чтобы родители проконсультировались с ребенком у врача или другого квалифицированного работника здравоохранения», – говорит Г. Каламинус.

К вечеру сегодняшнего дня чьим-то сыну, дочери, сестре или брату – всего приблизительно 440 детям по всему миру – поставят диагноз «рак», а 250 детей умрут от него. «Детский рак – это лишь часть глобальной проблемы онкологических заболеваний, но для детей и их семей – это вопрос надежды, смелости и решимости. . . вопрос выбора между жизнью и смертью», – поясняет Кенет Долман, президент ИСССРО и отец ребенка из Южной Африки, перенесшего лейкоз.

В то время как в развитых странах 80 % детей, страдающих раковыми заболеваниями, выживают, действительность выглядит совсем иначе для тех, кто живет в менее благополучных местах, – а именно там находится 80 % всех заболевших детей. Ситуация усугубляется тем, что в этих странах имеется недостаток или полное отсутствие знаний о детском раке. Онкологические заболевания там не только поздно диагностируют, но также имеются ограниченные возможности в плане лечения. Это приводит к тому, что приблизительно 80 % детей со злокачественными опухолями погибают. «Поздняя диагностика значительно снижает уровень выживаемости. В то время как в богатых странах выживают 8 из 10 детей, в странах с низким и средним доходом выживают только от 2 до 3 детей из 10», – комментирует К. Долман.

Мифы, окружающие детский рак, приносят дополнительные сложности в распространение достоверной информации. Например, в некоторых общинах дети с ретинобластомой или «кошачьим блеском глаз» считаются имеющими сверхъестественные способности и их не разрешают лечить до тех пор, пока не становится слишком поздно.

Сегодня SIOP и ИСССРО с помощью своих членов по всему миру будут связываться с общественностью, школами, больницами, населением в целом. Родители будут работать рука об руку с детскими онкологами, педиатрами, медсестрами, работниками здравоохранения, распространяя жизненно важную информацию о детских онкологических заболеваниях. Чтобы получить дополнительную информацию о том, что происходит в вашем регионе, пожалуйста, свяжитесь с местными врачами-онкологами.

**SIOP и ИСССРО подготовили План совместных действий в отношении раннихстораживающих признаков детского рака. Подробную информацию можно получить, посетив веб-сайты этих организаций: [www.siop.nl](http://www.siop.nl) и [www.iccspo.org](http://www.iccspo.org).**

### **Международное общество педиатров-онкологов (International Society of Paediatric Oncology – SIOP)**

Основанное в 1969 году, Международное общество педиатров-онкологов (SIOP), включающее более 1500 членов, является ведущей всемирной организацией, сосредоточенной на проблемах детей и подростков, страдающих онкологическими заболеваниями. Цель сообщества – «Ни один ребенок не должен умирать от рака». Для реализации этой цели SIOP ставит следующие задачи: 1) обеспечить доступ к современному лечению для каждого ребенка и подростка с онкологическим заболеванием; 2) обеспечить всем участникам борьбы с детским раком в мировом масштабе доступ к новейшим методам лечения и информации путем встреч, создания рабочих групп и профессионального обучения; 3) поддержать всех, кто оказывает помощь детям и подросткам, страдающим раком, предоставив самые лучшие методы лечения и паллиативной помощи; 4) способствовать длительному диспансерному наблюдению детей и подростков после окончания лечения. Президентом SIOP является доктор Габриэла Каламинус. SIOP управляется советом директоров и базируется в Женеве, Швейцария. Веб-сайт организации: [www.siop.nl](http://www.siop.nl).

### **Международная конфедерация организаций родителей детей с онкологическими заболеваниями (International Confederation of Childhood Cancer Parent Organizations – ICCSPO)**

ИСССРО – крупнейшая в своем роде организация, представляющая интересы семей, в которых есть дети, больные раком. ИСССРО добивается того, чтобы непосредственные и долговременные трудности, встающие перед детьми с онкологическими заболеваниями и их семьями, были поняты родителями, работниками здравоохранения и широкой общественностью с целью обеспечения этих детей, по возможности, наилучшей помощью, вне зависимости от того, где они проживают. Миссия ИСССРО – делиться информацией и опытом для улучшения лечения детей, страдающих раком, по всему миру. Веб-сайт организации: [www.iccspo.org](http://www.iccspo.org).

#### **SIOP Media Contact**

JJ Divino, MPH  
Communications and External Relations  
International Society of Paediatric Oncology  
Geneva, Switzerland  
tel: 0041 22 906 9123  
email: [jdivino@kenes.com](mailto:jdivino@kenes.com)

#### **ICCSPO Media Contact**

Marianne Naafs-Wilstra  
c/o VOKK  
Schouwstede 2B, 3431 JB Nieuwegein  
NETHERLANDS  
Tel: +31 30 242 2944  
[iccspo-secretariat@vokk.nl](mailto:iccspo-secretariat@vokk.nl)



## Глобальная информированность в поддержку Международного дня борьбы с детским раком 15 февраля 2012 г.

### *Уважаемые члены организации,*

Кампания по привлечению общественного внимания к онкологическим заболеваниям у детей с помощью Международного дня борьбы с детским раком была запущена Международной конфедерацией организаций родителей детей с онкологическими заболеваниями (International Confederation of Childhood Cancer Parent Organizations, или ICCCP) в 2002 году, и с тех пор этот день ежегодно отмечается 15 февраля. В 2010 году возникла идея проводить сбор средств, не только для привлечения общественного внимания к онкологическим заболеваниям у детей, но и для того, чтобы организации – члены конфедерации могли увеличить свой бюджет.

В 2011 году 19 членов ICCCP со всех частей света отмечали Международный день борьбы с детским раком путем проведения ряда различных мероприятий по привлечению внимания к проблеме и сбора средств в течение февраля и марта. Мы рады видеть, что в 2012 году члены SIOP присоединились к нам для проведения мероприятия, темой которого является «раннее выявление заболевания», что актуально и для развитых, и для развивающихся стран.

С присоединением к кампании членов SIOP мы рассчитываем значительно увеличить количество наших мероприятий, проводимых по всему миру, воплощая, таким образом, нашу цель и способствуя официальному признанию этого дня Всемирной организацией здравоохранения.

В кампанию будут вовлечены члены как ICCCP, так и SIOP, организующие мероприятия с воздушными шарами 15 февраля 2012 года. Замысел состоит в том, что воздушные шары будут выпущены в небо больными детьми прямо из окон больничных палат по всему миру. К шарам будет прикреплена открытка с информацией о том, что рак можно вылечить, ранняя диагностика увеличивает выживаемость, лечение должно проходить в специализированных центрах, и другими полезными данными касательно детских онкологических заболеваний (статистика и факты). Там, где будет нельзя запустить шары, члены обществ будут вручать открытки бизнесменам, общественным деятелям, работникам образования и здравоохранения (касательно последних – можно их детям или внукам).

Мы понимаем, что некоторые члены конфедерации, возможно, уже имеют собственные планы о том, как следует отмечать Международный день борьбы с детским раком, и мы не настаиваем на своем варианте; тем не менее мы были бы очень благодарны, если кто-либо из участников этих организаций сможет присоединиться к нашему мероприятию.

Тех, кто имеет возможность и желание, мы просим находиться в тесном контакте с членами SIOP и следовать предложенному «Плану действий» насколько возможно. Это прекрасная возможность не только привлечь средства массовой информации, но и улучшить репутацию организаций.

Члены конфедерации, возможно, также захотят собрать какие-либо средства для своей организации. Всех, имеющих такую возможность, мы просим пожертвовать часть собранных средств для поддержки Всемирной организации по борьбе с детским раком (World Child Cancer's work – организация, создавшая ICCCP, и единственный ее акционер), спонсирующей программы по борьбе с детским раком в странах с ограниченными ресурсами.

Являясь членом ICCCP, помогите нам претворить в жизнь наш лозунг «Нам не все равно, мы участвуем!». Пожертвования и/или комментарии можно высылать в секретариат ICCCP по электронному адресу: [icccpo-secretariat@vokk.nl](mailto:icccpo-secretariat@vokk.nl).

С наилучшими пожеланиями,

**Kenneth Dollman**

*Председатель ICCCP*

*От имени подкомитета по сбору средств в 2012 году*

**Глубокоуважаемые коллеги!**

**Министерство здравоохранения и социального развития РФ**  
**Российская академия медицинских наук**  
 ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России  
 ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
 онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России  
**Национальное гематологическое общество**  
**Национальное общество детских гематологов и онкологов**  
**Российское общество онкогематологов**

и н ф о р м и р у ю т в а с о п р о в е д е н и и

# КОНГРЕССА

## ГЕМАТОЛОГОВ РОССИИ

2–4 июля 2012 года

В Конгрессе будут участвовать ведущие российские и зарубежные ученые в области гематологии, трансплантации костного мозга, реаниматологии, клинической микробиологии, патологической морфологии, клинических исследований, фундаментальных исследований и других направлений.

Наряду с пленарными заседаниями параллельно будут проходить секционные заседания по основным разделам гематологии:

- острые лейкозы и трансплантация костного мозга у детей и взрослых;
- трансплантация костного мозга – биологические аспекты;
- миелодиспластические синдромы и депрессии кроветворения у детей и взрослых;
- миелопролиферативные заболевания у детей и взрослых;
- зрелоклеточные лимфомы;
- агрессивные лимфомы у детей и взрослых;
- парапротеинемические гемобластозы;
- нарушения коагуляционного гемостаза у детей и взрослых;
- интенсивная терапия и реаниматология у детей и взрослых;
- микробиология и терапия инфекционных осложнений у детей и взрослых;
- клиническая трансфузиология;
- фундаментальные исследования в гематологии;
- планирование и проведение клинических и клинико-эпидемиологических исследований;
- патоморфология и Школа патоморфологов;
- безопасность труда медицинских работников.

Ожидается 1000–1200 участников.

Заявки на участие принимаются по электронной почте Оргкомитета Конгресса: [elenap@blood.ru](mailto:elenap@blood.ru); [garmaeva@yandex.ru](mailto:garmaeva@yandex.ru); [ma.blood@yandex.ru](mailto:ma.blood@yandex.ru).

В заявке следует указать:

- тематический раздел, название доклада или сообщения;
- фамилию, имя, отчество;
- почтовый адрес с почтовым индексом;
- место работы и должность;
- научную степень и звание;
- адрес электронной почты;
- контактные телефоны.

**Проводится электронная регистрация!**

**Зарегистрироваться можно на информационном сайте Конгресса [www.hematology2012.ru](http://www.hematology2012.ru)**

Все зарегистрированные участники будут обеспечены материалами Конгресса.

Если вы уже зарегистрированы и хотите отменить визит, убедительно просим аннулировать регистрацию до 15 июня 2012 года.

Место проведения Конгресса гематологов России: Москва, Центр Международной торговли, точный адрес – Краснопресненская набережная, дом 12, ст. метро «Улица 1905 года».

## Информация для авторов

### Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Онкогематология», следует руководствоваться следующими правилами:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (компакт-диск или дискета) с распечаткой на бумаге формата А4 в двух экземплярах (таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, список литературы, резюме — на отдельных листах).

Шрифт — Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, город.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

Статья должна быть подписана всеми авторами. В конце статьи должны быть обязательно указаны **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, факс, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья — не более 12 страниц; описание отдельных наблюдений, заметки из практики — не более 5 страниц; обзор литературы — не более 20 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию — 3 страницы.

**Структура оригинальной статьи:** введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском языке, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений. Объем резюме — не более 1/3 машинописной страницы с указанием **ключевых слов**.

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы — четкими.
- Фотографии представляются в оригинале или в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).
- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате EPS Adobe Illustrator 7.0—10.0. При невозможности представления файлов в данном формате необходимо связаться с редакцией.
- Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными подписями. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. На рисунке указываются «верх» и «низ»; фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисовочной подписи.
- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

• Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках, а их расположение указывается автором в виде квадрата на полях статьи слева.

5. Единицы измерений даются в СИ.

Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование неопределенных сокращений не допускается.

Название генов пишется курсивом, название белков — обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация — строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.
- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» — в английском тексте).
- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи; название журнала, год, том, номер выпуска, страницы.
- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.
- При ссылке на **авторефераты** диссертаций указывают также полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания.
- При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.
- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).
- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20—25 источников, в обзорах литературы — не более 60.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно.

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

**Все поступающие статьи рецензируются.**

**Присланные материалы обратно не возвращаются.**

**Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.**

Авторы могут присылать свои материалы по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 15 либо по электронной почте на адрес редакции: redactor@abvpress.ru с обязательным указанием названия журнала.