БЮЛЛЕТЕНЬ
ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова

Санкт-Петербург
2012

Главный редактор
Е.В. Шляхто

Зам. главного редактора
А.О. Конради
М.А. Карпенко

Секретарь
Н.Г. Авдонина

Члены редакционной коллегии
Е.И. Баранова (Санкт-Петербург)
Е.Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)
В.А. Барт (Санкт-Петербург)
О.А. Беркович (Санкт-Петербург)
В.Н. Вавилов (Санкт-Петербург)
М.М. Галагудза (Санкт-Петербург)
Е.Н. Гринева (Санкт-Петербург)
М.Л. Гордеев (Санкт-Петербург)
И.Е. Зазерская (Санкт-Петербург)
А.Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)
Э.В. Земцовский (Санкт-Петербург)
Д.О. Иванов (Санкт-Петербург)
Т.Л. Каронова (Санкт-Петербург)
М.А. Карпенко (Санкт-Петербург)
А.А. Костарева (Санкт-Петербург)
Д.И. Курапеев (Санкт-Петербург)
О.М. Моисеева (Санкт-Петербург)
А.О. Недошивин (Санкт-Петербург)
А.В. Рудакова (Санкт-Петербург)
Г.Н. Салогуб (Санкт-Петербург)
В.Н. Солнцев (Санкт-Петербург)
Л.А. Сорокина (Санкт-Петербург)
В.А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Editor-in-Chief
E. Shlyakhto

Vice-editors
A. Konradi
M. Karpenko

Secretary
N. Avdonina

Editorial board
E. Baranova (St. Petersburg)
E. Barancevich (St. Petersburg)
V. Bart (St. Petersburg)
O. Berkovich (St. Petersburg)
V. Vavilov (St. Petersburg)
M. Galagudza (St. Petersburg)
E. Grineva (St. Petersburg)
M. Gordeev (St. Petersburg)
I. Zazerskaya (St. Petersburg)
A. Zaritskii (St. Petersburg)
E. Zemtsovskiy (St. Petersburg)
D. Ivanov (St. Petersburg)
T. Karonova (St. Petersburg)
M. Karpenko (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)
D. Kurapeev (St. Petersburg)
O. Moiseeva (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (St. Petersburg)
A. Rudakova (St. Petersburg)
G. Salogub (St. Petersburg)
V. Solntsev (St. Petersburg)
L. Sorokina (St. Petersburg)
V. Tsirlin (St. Petersburg)

**Федеральный Центр
сердца, крови и эндокринологии
им. В.А. Алмазова**

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Подача рукописей и переписка с авторами,
размещение рекламы и подписка
e-mail: bulleten@almazovcentre.ru

Издательство
«ФОНД ВЫСОКИХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»
Адрес: 194156, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко,
д. 15, лит.Б.
Телефоны издательства: (812) 702 37 16

Тираж 1100 экз. ISSN 2078-8150

Верстка Морозов П.В.

Бюллетень зарегистрирован
в Государственном комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-38713 от 22.01.2010 г.

Тематическая рассылка по специалистам.

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»
подписной индекс 57992

Все права защищены. Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в бюллетене, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА РЕДАКТОРА 4

ГЕМАТОЛОГИЯ

Стадник Е.А., Стругов В.В., Вирц Ю.В., Зарицкий А.Ю.
Хронический лимфолейкоз. Рекомендации по диагностике и лечению 5

Ломаиа Е.Г., Сбитякова Е.И., Лазорко И.С., Романова Е.Г., Холопова И.В., Никулина Т.С., Зарицкий А.Ю.
Рекомендации по диагностике и мониторингу эффективности терапии ХМЛ 16

Ломаиа Е.Г., Сбитякова Е.И., Лазорко Н.С., Романова Е.Г., Зарицкий А.Ю.
Нилотиниб и дазатиниб. ингибиторы еирозинкиназ в первой линии терапии хронического миелолейкоза 26

Жук С.В., Зарицкий А.Ю., Моторин Д.В., Бутылин П.А.
Изучение воздействия экспрессии лигандов Notch в стромальных клетках
на экспансию гемопоэтических клеток in vitro 34

Бутылин П.А., Мельн И.А., Зубова Е.С., Хохунов О.А., Зарицкий А.Ю., Крутиков А.Н.
Анализ ангиогенного потенциала гемопоэтических клеток и их субпопуляций
у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 42

Малашичева А. Б., Худяков А. А., Костарева А. А.
Индуцированные плюрипотентные клетки и их роль в регенеративной медицине 49

Мельн И.А., Жук С.В., Бутылин П.А., Зарицкий А.Ю.
Эндотелиальные клетки с постоянно активным akt1 как модель изучения васкулярной ниши костного мозга 53

Кулемина О.В., Дмитриева Р.И., Бутылин П.А., Зарицкий А.Ю.
Роль стромальных клеток костного мозга в поддержании экспансии гемопоэтических стволовых
клеток в модели сокультивирования in vitro 64

Булычева Е.Н., Зарицкий А.Ю., Бутылин П.А.
Культивирование мезенхимных стволовых клеток с использованием человеческого тромболизата —
модель миелофиброза in vitro 73

Мещерякова Д.В., Петров А.В., Моторин Д. В.
Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у пациентов
с множественной миеломой: опыт успешной трансплантации после лечения леналидомидом 82

*Гиршова Л.Л., Романова Е.Г., Горюнова Е.Н., Вабищевич Р.И., Петров А.В., Моторин Д.В., Иванов В.В.,
Холопова И.В., Никулина Т.С., Миролюбова Ю.В., Алексеева Ю.А., Зарицкий А.Ю.*
Современные подходы к определению прогноза и персонализационной направленности
терапии рецидивов острого миелобластного лейкоза 91

Стругов В. В., Стадник Е. А., Вирц Ю. В., Зарицкий А. Ю.
Ретроспективное исследование результатов применения режимов FC/FCR
в первой линии терапии хронического лимфолейкоза 104

Сиордия Н.Т., Булычева Е.Н., Холопова И.В., Гиршова Л.Л., Алексеева Ю.А., Ломаиа Е.Г., Зарицкий А.Ю.
Частота встречаемости гиперэкспрессии гена Wt1 у пациентов с миелоидными неоплазиями 116

Романова Е.Г., Зарицкий А.Ю., Ильина Н.В., Карягина Е.В., Ломаиа Е.Г.
Хронический миелолейкоз от теории к практике. Клинические наблюдения 121

СТРАНИЦЫ ИЗ ИСТОРИИ МЕДИЦИНЫ

Журавлев Д.А.
Уникальное хранилище традиций отечественной медицины (к 70-летию военно-медицинского музея) 126

Глубокоуважаемые читатели!

Перед Вами — первый номер журнала, целиком посвященный вопросам онкогематологии, то есть проблемам, связанным с патогенезом, клиникой, диагностикой лейкозов и лимфом. Эти заболевания, высоко злокачественные по своей природе, еще недавно считались смертельными. Высокая смертность, высокая токсичность химиотерапии каких-нибудь 20 лет назад были спутниками этих заболеваний, близнецами.

Сегодня онкогематология — одна из самых динамичных отраслей медицины. Изучается биология опухолевой клетки. Открыто новое направление терапии — таргетное воздействие на опухолевую клетку. Это позволило на долгие годы продлить качественную жизнь больных хроническим миелолейкозом, миеломной болезнью, злокачественными лимфомами, хроническим лимфолейкозом. Пациенты стали жить не только дольше, но и, что на мой взгляд гораздо важнее, с хорошим качеством жизни.

Результаты некоторых фундаментальных исследований сегодня перед Вами.

В последние годы разрабатываются стандарты ведения пациентов по нозологическим группам на основе крупных рандомизированных исследований. Однако не каждый пациент может вписаться в рамки стандарта. Встречаются особенные пациенты, и только искусство, интуиция и знания лечащего врача могут помочь в нестандартной ситуации. Подобные интересные клинические случаи заслужили отдельных описаний.

Онкогематология — интересная и многообразная специальность. Мы попытались сделать и для Вас, уважаемые читатели, этот номер заслуживающим Вашего внимания и времени.

С уважением, член редколлегии журнала,
директор Института гематологии
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ
д.м.н., профессор *А.Ю. Зарицкий*

ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИМФОЛЕЙКОЗ. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ

Е.А. Стадник[1, 2], В.В. Стругов[1], Ю.В. Вирц[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГОБУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

Стадник Елена Александровна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, врач-гематолог ГОБУ ВПО Санкт-Петербургского Государственного Медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова; *Стругов Владимир Владимирович* — младший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; Вирц Юлия Викторовна — аспирант ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ ЗФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: (812) 702–37–65. E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Стадник Елена Александровна).

Резюме

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — один из самых распространенных лейкозов в Америке и Европе. Субстратом этого заболевания являются зрелые В-лимфоциты с характерным иммунофенотипом. Хотя это заболевание до сих пор считается неизлечимым, в последнее время произошли существенные изменения в подходах к его терапии, появились новые иммунохимиотерапевтические комбинации, повлиявшие на естественное течение заболевания и увеличившие продолжительность жизни пациентов. В настоящее время стандартом терапии больных ХЛЛ в первой линии является применение режима флударабин + циклофосфан + ритуксимаб. Однако этот режим является достаточно токсичным, особенно у пожилых пациентов, в связи с чем необходима индивидуализация подходов к терапии, в частности, редукция доз или применение новых, более безопасных препаратов. При использовании схемы бендамустин + ритуксимаб в многоцентровых исследованиях получены многообещающие результаты, в связи с чем она может быть рекомендована как альтернатива режиму FCR в первой линии терапии ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, стадии, диагностика, лечение, иммунофенотипирование, ритуксимаб, флударабин, бендамустин.

GUIDELINE FOR DIAGNOSIS AND FIRST-LINE TREATMENT IN CLL

E.A. Stadnik[1, 2], V.V.Strugov[1], A.A. Isayev[2], Yu.V. Virts[1], A.Yu. Zaritskey[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. Phone: (812) 702–37–65. E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Elena A. Stadnik — PhD, senior researcher of hematology institute).

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common types of leukemia in Europe and Northern America. Leukemic clone in this disease consists of mature B-cells with characteristic immunophenotype. Currently CLL is considered incurable, but recently some significant progress in treatment approaches was achieved. New chemoimmunotherapeutic regimens entered practice, changing natural course of the disease and prolonging survival of patients. FCR (fludarabine+cyclophosphamide+rituximab) is currently a standart scheme in first-line treatment for CLL. Nevertheless, this regimen has significant toxicity, especially in elderly patients. This fact underlines the need for personalized approaches in treatment of CLL, such as dose-reduction or usage of novel, less toxic drugs. BR (bendamustine+rituximab) regimen shows promising results in multicenter clinical trials, so it could be recommended as alternative to FCR regimen in first-line treatment for CLL.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, staging, diagnosis, treatment, immunophenotyping, rituximab, fludarabine, bendamustine.

Статья поступила в редакцию 01.11.12, принята к печати 20.11.12.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественная моноклональная пролиферация зрелых В-лимфоцитов с иммунофенотипом CD5+, CD23+, CD19+, для которой характерно первичное поражение костного мозга и периферической крови [1].

ХЛЛ встречается с частотой 3–10 на 100 тыс. населения и является наиболее распространенным типом лейкоза среди взрослого населения в западном мире (около 30 % всех лейкозов). Хотя ХЛЛ традиционно относится к патологии старшей возрастной группы, случаи заболевания у людей среднего возраста не редки (около 11 % моложе 55 лет). Медиана возраста пациентов по данным регистра SEER (США) — 72 года [2].

Критерии диагноза «Хронический лимфолейкоз» [1]:

1. Количество моноклональных В-лимфоцитов в периферической крови ≥ 5 × 10^9/л

2. Характерный иммунофенотип:

– экспрессия CD19, CD5, CD23 (обязательно наличие 3-х маркеров)

– слабая или отсутствующая экспрессия CD20, FMC7 и CD79b

– моноклональная экспрессия каппа или лямбда легких цепей иммуноглобулинов (табл.1)

Объем обследования [1, 6–10]**:**

I. Обязательные методы

1. Сбор анамнеза

Контакт с потенциальными мутагенами. Наследственность по онкологическим заболеваниям. Наличие случаев НХЛ/ХЛЛ у кровных родственников. Вероятность выявления заболевания у непосредственных родственников пациента достигает 10 % (в 8 раз выше общей популяции). Семейные случаи определяются как наличие диагноза ХЛЛ

Таблица 1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ ПО ГРУППАМ РИСКА (ПО ZENZ, 2012 С МОДИФИКАЦИЯМИ) [3]

Группа риска	Определение	Частота на момент начала первой линии терапии
Крайне высокий	1. Рефрактерность к флударабину 2. Ранний рецидив или прогрессия после FCR (24 мес.) 3. Делеция 17p13 и/или мутация TP53 при наличии показаний для начала терапии 4. Мутации NOTCH1	10–12 %
Высокий	1. IGHV-немутированный вариант 2. Делеция 11q 3. Высокий β2-микроглобулин сыворотки	70 %
Низкий	IGHV-мутированный вариант Отсутствие критериев высокого и крайне высокого риска	20 %

у ≥ 2 родственников в одном или в соседних поколениях.

2. Общий осмотр.

Наличие пальпируемой гепатомегалии, спленомегалии, увеличение периферических лимфоузлов (с обязательной документацией локализации и размеров наиболее крупных лимфоузлов), увеличение миндалин. Обязательна оценка шейных, аксиллярных, паховых и феморальных лимфоузлов.

3. Оценка соматического статуса по ECOG [6].

4. Оценка коморбидности по шкале CIRS [7].

5. Клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, ретикулоцитов, СОЭ.

6. Исследование коагулограммы.

7. Биохимический анализ крови.

8. Общий анализ мочи.

9. Регистрация и расшифровка ЭКГ.

10. Определение концентрации 2-микроглобулина сыворотки.

11. Количественная оценка концентрации иммуноглобулинов A, M, G сыворотки.

12. Прямая и непрямая пробы Кумбса.

13. Исследование крови на HBsAg, анти-HCV антитела, Ф-50, RW.

14. Количественное ПЦР-исследование ДНК вируса гепатита B, исследование на HBeAg.

15. Инфекционный скрининг.

16. Исследование крови методом ПЦР на ДНК цитомегаловируса (качественный и количественный).

17. Исследование миелограммы.

18. Иммунофенотипирование методом проточной цитометрии.

19. Цитогенетическое исследование.

20. FISH-исследование.

21. Исследование мутационного статуса IgVH генов методом секвенирования.

<u>II. Дополнительные методы</u>

1. Мониторинг синдрома лизиса опухоли [8].

2. Оценка минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии [9].

3. КТ органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза с внутривенным контрастированием.

4. Рентгенография органов грудной клетки.

5. УЗИ периферических лимфоузлов, органов брюшной полости (с оценкой размеров лимфоузлов).

6. Трепанобиопсия костного мозга с цитологическим, гистологическим и ИГХ исследованием.

7. Биопсия лимфатического узла с цитологическим, гистологическим и ИГХ исследованием [10].

8. ПЭТ/КТ-исследование.

9. HLA-типирование пациента и потенциальных доноров ГСК, поиск донора ГСК в регистрах.

Стадирование заболевания:

По J. Binet [11]:

A. Гемоглобин (Hb) ≥100 г/л, тромбоциты ≥ 100 × 10^9/л. Поражено ≤ 3 лимфатических областей.

B. Hb ≥100 г/л, тромбоциты ≥100 × 10^9/л. Поражено > 3 лимфатических областей.

C. Hb < 100 г/л или уровень тромбоцитов < 100 × 10^9/л.

Стадирование по K. Rai [12]:

0. Изолированный лимфоцитоз.

1. Увеличение лимфатических узлов; селезенка и печень не увеличены; анемии и тромбоцитопении нет.

2. Увеличение селезенки и/или печени; анемии и тромбоцитопении нет.

3. Снижение Hb < 110 г/л при любых клинических признаках.

4. Снижение тромбоцитов < 100 × 10^9/л при любых клинических признаках.

Модифицированная система стадирования по K. Rai [1]:

0 — низкий риск. 1–2 — промежуточный риск. 3–4 — высокий риск.

Формулировка диагноза

1. Стадия по Rai и/или Binet.

2. Наличие массивной лимфаденопатии (> 5 см, образование конгломератов) — «bulky».

3. Наличие основных факторов прогноза (мутационный статус IGHV, CD38, Zap-70, хромосомные аберрации).

4. Статус болезни: ремиссия, ранний или поздний рецидив, прогрессия.

5. Осложнения (аутоиммунные, инфекционные и т.д.).

Показания для начала терапии [1]

- Развитие или прогрессивное нарастание анемии и/или тромбоцитопении
- Массивная или симптоматичная спленомегалия и/или лимфоаденопатия
- Прогрессивное нарастание лимфоцитоза, время удвоения лимфоцитов менее 6 месяцев.
- Аутоиммунная анемия/или тромбоцитопения, плохо отвечающая на стандартную терапию.

Наличие хотя бы одного из конституциональных симптомов:

– необъяснимая потеря массы тела (не менее 10 % за 6 месяцев)

– ночная потливость в течение более 1 месяца без признаков инфекции

– фебрильная лихорадка в течение более двух недель без признаков инфекции

Таблица 2

КРИТЕРИИ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ

	ПР	ЧР	ПЗ
Группа А			
Лимфаденопатия	Нет > 1.5 см	Уменьшение ≥ 50 %	Увеличение ≥ 50 %
Гепатомегалия	Нет	Уменьшение ≥ 50 %	Увеличение ≥ 50 %
Спленомегалия	Нет	Уменьшение ≥ 50 %	Увеличение ≥ 50 %
Лимфоцитоз в переферической крови	< 4 × 10^9/л	Уменьшение ≥ 50 % от исходного	Увеличение ≥ 50 % от исходного
Костный мозг	Нормоклеточный, < 30 % лимфоцитов, нет нодулярной пролиферации	50 % редукция инфильтрации или В-клеточные скопления	–
Группа Б			
Тромбоциты	> 100 × 10^9/л	> 100 × 10^9/л или прирост ≥ 50 % от исходного	Уменьшение ≥ 50 % от исходного, связанное с ХЛЛ
Гемоглобин	> 110 г/л	> 110 г/л или прирост ≥ 50 % от исходного	Уменьшение > 20 г/л, связанное с ХЛЛ
Нейтрофилы	> 1.5 × 10^9/л	> 1.5 × 10^9/л или прирост > 50 % от исходного	–

Критерии ответа на терапию (табл. 2)

Ответ оценивается не менее чем через 2 месяца после окончания последнего курса терапии.

1. Полная ремиссия (CR) [1]

1. Количество лимфоцитов в периферической крови < 4 × 10^9/л.

2. Отсутствие периферической лимфаденопатии (> 1,5 см) при физикальном обследовании.

3. Отсутствие гепатомегалии, спленомегалии при физикальном обследовании.

4. Отсутствие В-симптоматики.

5. Нормальная картина периферической крови: нейтрофилы > 1,5 × 10^9/л без потребности в ростовых факторах. Тромбоциты > 100 × 10^9/л без потребности в трансфузиях и ростовых факторах. Гемоглобин > 110 г/л без трансфузий компонентов и потребности в эритропоэтине.

6. Нормальная миелограмма (нормоклеточность, < 30 % от ядросодержащих клеток — лимфоциты, нет нодулярной пролиферации).

У пациентов с ПР проводится оценка МОБ в периферической крови и костном мозге [17].

2. Полная ремиссия с неполным восстановлением кроветворения (CRi) [1]

1. Наличие критериев ПР № 1–4, 6.

2. Несоответствие всем критериям № 5 (персистирующая постцитостатическая цитопения).

У пациентов с CRi проводится мониторинг гемограммы до восстановления.

После восстановления (см. критерии CR № 5) исследование миелограммы повторяется.

После восстановления гемопоэза (см. критерии CR № 5) проводится оценка МОБ в периферической крови и костном мозге [17].

3. Частичная ремиссия (PR) [1]

Оценивается как наличие нижеследующих критериев (1,2 или 3 — если были отклонения до начала терапии), сохраняющееся в течение минимум 2 месяцев. Необходимо учитывать В-симптоматику, персистирующую более 1 месяца.

1. Уменьшение количества лимфоцитов в периферической крови на 50 % или более от уровня до начала терапии.

2. Уменьшение лимфаденопатии: уменьшение размеров лимфоузлов на 50 %. При количестве увеличенных лимфоузлов до 6 оценивается суммарный объем. При большем количестве — наибольший диаметр. Отсутствие роста лимфоузлов (допустим рост на 25 % лимфоузлов < 2 см в диаметре).

3. Уменьшение на 50 % размеров селезенки и/или печени.

4. Нормальная картина периферической крови:

Нейтрофилы > 1,5 × 10^9/л без потребности в ростовых факторах;

Тромбоциты > 100 × 10^9/л без потребности в ростовых факторах;

Гемоглобин > 110 г/л без трансфузий и потребности в эритропоэтине.

У пациентов с ЧР проводится оценка МОБ только в периферической крови [17].

4. Стабилизация заболевания (SD)

Документируется у пациентов, не достигших CR и PR и не имеющих признаков прогрессии.

5. Прогрессия заболевания (PD) [1]

Документируется при наличии хотя бы одного критерия из нижеперечисленных.

1. Прогрессивная лимфаденопатия. Появление новых лимфоузлов (> 1,5 см), спленомегалии и/или гепатомегалии, экстранодального поражения. Увеличение любого из имеющихся очагов на 50 % и более.

2. Увеличение количества лимфоцитов в периферической крови на 50 % и более при их уровне более 5×10^9/л.

3. Трансформация в заболевание более агрессивной гистологии.

4. Появление цитопении, связанной с прогрессией ХЛЛ. Уменьшение уровня гемоглобина на 20 г/л или менее 100 г/л, снижение уровня тромбоцитов на 50 % или менее 100×10^9/л, которое наблюдается по крайней мере через 3 месяца после окончания терапии. Необходимо исключение аутоиммунного генеза цитопении и подтверждение прогрессии биопсией костного мозга (инфильтрация).

6. Неудача терапии (HT)

Любой ответ на терапию, кроме PR и CR.

7. Рецидив

Документируется при наличии критериев прогрессии заболевания у пациента, достигшего CR или PR, через как минимум 6 месяцев после окончания терапии.

При возникновении прогрессии/рецидива в течение срока от 6 до 24 месяцев после окончания ПХТ в режимах FCR/BR данная прогрессия/рецидив расцениваются как ранние.

Ранние прогрессии/рецидивы ассоциированы с крайне неблагоприятным прогнозом.

Прогрессия/рецидив, возникшие более чем через 24 месяца после окончания ПХТ — поздние.

8. Рефрактерное заболевание (RD)

Документируется как неудача терапии или прогрессия заболевания в течение 6 месяцев после окончания терапии.

Рефрактерность к флударабин-содержащим схемам (FC, FR, FCR, FCM и т.д.) ассоциирована с крайне неблагоприятным прогнозом.

Терапия первой линии

Стандартом первой линии терапии у соматически сохранных больных является режим FCR. У пожилых пациентов (старше 65 лет) режим может применяться только при наличии хорошего соматического статуса (ECOG 0–1) и низкого индекса коморбидности (CIRS < 6) (не более 20 % всех больных). Назначение режима без взвешенной оценки рисков и возраста пациента может ухудшить прогноз. [15] (табл. 3)

Вариантом первой линии терапии может быть режим BR. Эта комбинация обладает сравнимой с FCR эффективностью, но с меньшей частотой гематологических и инфекционных осложнений. [13]

Пациенты с del17p13 и/или мутациями гена TP53 являются кандидатами для выполнения аллогенной трансплантации костного мозга с немиелоаблативным режимом кондиционирования после достижения адекватного контроля над заболеванием. Для индукции ремиссии у таких больных могут использоваться схемы FCR, алемтузумаб+ГКС, высокие дозы метилпреднизолона+ритуксимаб. Ни один из этих режимов не дает преимущества в ОВ.

Пожилые пациенты

Для пожилых пациентов характерен высокий уровень коморбидности, снижение функции почек,

Таблица 3

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЖИМОВ FCR, BR В ПЕРВОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ХЛЛ

	FCR	**BR**
	Hallek et al. 2010	**Fischer et al. 2012**
N пациентов	408	117
Медиана возраста	61	64
Binet C	31 %	46,2 %
ECOG 0	56 %	50,9 %
del17p	7 %	7,3 %
del11q	27 %	19,1 %
ORR	90 %	88 %
CR	44 %	23 % + 24 % (?)
MRD — негативная в костном мозге	~ 11 % (45/102)	~ 6 % (7/24)
Медиана EFS	51,9	33,9
Медиана OS	–	–

более высокая частота инфекционных осложнений, что может затруднять проведение стандартной ПХТ.

Режим FCR может использоваться только в очень ограниченной группе пожилых пациентов с хорошим соматическим статусом (ECOG 0–1, CIRS < 6) [16]

В исследовании DCLLSG у пожилых пациентов эффективность хлорамбуцила в монорежиме была не ниже эффективности флударабина при более высокой токсичности последнего [16].

По имеющимся представлениям режим BR обладает сравнительно небольшой токсичностью и может использоваться у пожилых пациентов [13].

Режим FCR (табл. 4, табл. 5)

Противопоказания к проведению режима FCR [5, 15].

1. Соматический статус по ECOG ≥ 2, CIRS ≥ 3 у пациентов старше 65 лет.
2. Текущая инфекция.
3. Продвинутые стадии органной недостаточности, не связанной с ХЛЛ.
4. Клиренс креатинина 30 мл/мин.
5. Психические нарушения («большая психиатрия»).
6. Клиника аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА).
7. Флударабин — ассоциированная АИГА в анамнезе.
8. Вирусный гепатит В с признаками активности.

Положительная прямая проба Кумбса без других клинико-лабораторных проявлений гемолиза не является противопоказанием для назначения режима FCR. АИГА, не связанная с флударабином в анамнезе, без клинико-лабораторных проявлений гемолиза на момент начала терапии не является противопоказанием.

В связи с риском фульминантного течения у пациентов с гепатитом В терапия возможна только при отсутствии активности под прикрытием адекватной противовирусной терапии (ламивудин, бараклюд).

Схема Режима FCR представлена в таблице 6. Продолжительность 1 цикла — 28 дней, всего 6 циклов.

Таблица 4

ОЖИДАЕМАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕЖИМА FCR

1я линия	ORR	CR	PFS	OS
Tam et al. 2008 (MDACC)	95 %	72 %	51 % к 5 годам	77 % к 5 годам
Hallek et al. 2011 (DCLLSG)	90 %	44 %	Медиана 51,8 месяцев	87 % к 3 годам

Таблица 5

ОЖИДАЕМАЯ ТОКСИЧНОСТЬ РЕЖИМА FCR

1я линия	↓ Ne 3–4 ст	↓ Tr 3–4 ст	↓ Hb 3–4 ст	Инфекции 3–4 ст
Keating et al. 2005 (MDACC)	52 %	4,3 %	0 %	2,6 % курсов
Hallek et al. 2011 (DCLLSG)	34 %	7 %	5 %	25 % курсов

Таблица 6

СХЕМА РЕЖИМА FCR

Препарат	Дозировка	Режим инфузии	Дни
Ритуксимаб	375 мг/м^2 (первый цикл) 500 мг/м^2 (последующие циклы)	По схеме (см ниже)	0 или 1 день цикла
Флударабин	25 мг/м^2 (в/в) или 40 мг/м^2 (р.о.)	На 250 мл физ. р-ра за 30 мин.	1–3 дни цикла (всего 3 дня)
Циклофосфан	250 мг/м^2	На 250 мл физ. р-ра за 30–60 мин.	1–3 дни цикла (всего 3 дня)

Особенности назначения ритуксимаба:

Ритуксимаб вводится в дозировке 375 мг/м^2 только в первом цикле терапии. Во всех последующих циклах доза увеличивается до 500 мг/м^2. Необходимость эскалации дозы объясняется относительно низкой экспрессией CD20 при ХЛЛ.

Всем пациентам за 30–60 минут до начала инфузии осуществляется премедикация — 1000 мг парацетамола per os, раствор анальгина 50 % — 2,0 (1 г) + раствор димедрола 0,1 % — 2,0 (20 мг) в/в.

При наличии лимфоцитоза $\geq 25 \times 10^9$/л к премедикации добавляются ГКС (преднизолон 50–100 мг, дексаметазон 4–8 мг). Также для профилактики синдрома лизиса опухоли за 12–24 часов до начала инфузии дается аллопуринол (300 мг однократно), осуществляется прегидратация. Доза ритуксимаба в таких случаях может быть разделена на 2 введения: Д0 — 100 мг, Д1 — остальная часть.

При первом введении инфузия ритуксимаба начинается со скорости 50 мг/ч. При отсутствии побочных явлений скорость инфузии увеличивается на 50 мг/ч каждые 30 мин до максимальной скорости 400 мг/ч.

При последующих введениях начальная скорость — 100 мг/ч. При отсутствии побочных явлений скорость инфузии увеличивается на 100 мг/ч каждые 30 мин до максимальной скорости 400 мг/ч.

При возникновении побочных явлений инфузия приостанавливается, и проводятся необходимые

Таблица 7

СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ РЕЖИМА FCR

Показание	Препарат, доза	Комментарии
Профилактика тошноты и рвоты, связанных с введением цитостатиков	Ондансетрон, 8 мг, внутривенно Десаметазон 4–8 мг, внутривенно Церукал 10 мг, внутривенно	По потребности в период введения цитостатиков и в раннем постцитостатическом периоде. Схема обладает низким эметогенным потенциалом
Профилактика пневмоцистной пневмонии в период деплеции CD4+ Т-лимфоцитов (< 200 кл/мкл)	Ко-тримоксазол, 480 мг, per os	По 1 таблетке 2 раза в день 3 раза в неделю (пн, ср, пт). С начала ПХТ и до 6 месяцев после окончания последнего курса всем пациентам
Деконтаминация кишечника, профилактика восходящей Грамм-отрицательной инфекции	Ципрофлоксацин, 500 мг, per os	По 1 таблетке 2 раза в день. При снижении АЧН менее $0,5 \times 10^9$/л до восстановления АЧН более $1,5 \times 10^9$/л всем пациентам
Профилактика инфекций, вызванных грибами рода Candida	Флуконазол, 100 мг, per os	По 3 капсулы 1 раз в день. При снижении АЧН менее $0,5 \times 10^9$/л до восстановления АЧН более $1,5 \times 10^9$/л на усмотрение лечащего врача
Профилактика реактивации HSV, VZV	Ацикловир, 200 мг, per os	По 2 таблетке 2 раза в день. С начала ПХТ и до 1 месяца после окончания последнего курса всем пациентам
Профилактика мочекислого диатеза	Аллопуринол, 100 мг, per os	По 1 таблетке 3 раза в день или по 3 таблетке 1 раз в день. С Д-1 ПХТ и в первые 10 дней после окончания введения цитостатиков и/или по уровню мочевой кислоты и/или по усмотрению лечащего врача
Профилактика синдрома лизиса опухоли	Питьевая вода per os, изотонические растворы (внутривенно)	Не менее 2 л в день. С Д-1 ПХТ и в первые 3–4 дня после окончания введения цитостатиков всем пациентам. Продолжительность может быть увеличена по усмотрению лечащего врача.
Стимуляция гранулоцитопоэза	Препараты рекомбинантного Г-КСФ (филграстим и его аналоги)	Пациентам с постцитостатической нейтропенией 4 степени при возникновении клинически значимых инфекций или при существенной отсрочке восстановления

Таблица 8

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ РЕДУКЦИИ ДОЗ ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА 2–6 КУРСАХ ТЕРАПИИ РЕЖИМА FCR

Гематологическая токсичность		
– нейтропения	Число нейтрофилов менее $1,5 \times 10^9$/л	Перерыв в терапии до восстановления показателей (АЧН $\geq 1,5 \times 10^9$/л, тромбоциты $\geq 50 \times 10^9$/л, гемоглобин ≥ 80 г/л). Допустимый перерыв 14 дней. При более длительном перерыве дозы химиопрепаратов уменьшают на 25 %.
– тромбоцитопения	Число тромбоцитов менее 40×10^9/л	
– анемия	Уровень гемоглобина менее 70 г/л или снижение гемоглобина более чем на 50 % от уровня до начала терапии	

Таблица 9

НЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ РЕЖИМА FCR

– инфекции на фоне нейтропении 3–4 степени	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25 %
– сепсис	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25–50 %
– другая	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25–50 % в зависимости от тяжести.

Таблица 10

ОЖИДАЕМАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕЖИМА BR

		ORR	**CR**	**EFS**	**OS**
1я линия	Fischer et al. 2012 (DCLLSG)	88 %	23.1 %	медиана 33.9 месяцев	90.5 % к 27 месяцам
2я линия	Fischer et al. 2011 (DCLLSG)	59 %	9 %	медиана 14.7 месяцев	медиана 33,9 месяцам

Таблица 11

ОЖИДАЕМАЯ ТОКСИЧНОСТЬ РЕЖИМА BR

		↓ Ne 3–4 ст	**↓ Tr 3–4 ст**	**↓ Hb 3–4 ст**	**Инфекции 3–4 ст**
1я линия	Fischer et al. 2012 (DCLLSG)	19.7 %	22.2 %	19.7 %	2.0 % курсов
2я линия	Fischer et al. 2011 (DCLLSG)	23.1 %	28.2 %	16.6 %	3.4 % курсов

медицинские манипуляции. Время возникновения реакции, скорость инфузии и введенная доза фиксируются в медицинской документации. Ставится в известность дежурный реаниматолог. Инфузия может быть возобновлена после полного купирования симптомов, при этом скорость уменьшается на 50 % и более, проводится мониторинг АД, ЭКГ, ЧДД, сатурации O_2.

Особенности назначения флударабина:

Доза флударабина должна быть редуцирована на 50 % при снижении клиренса креатинина (клирен креатинина рассчитывает по формуле Кокрофт — Гольта) менее 70 мл/мин. Препарат противопоказан при снижении клиренса менее 30 мл/мин.

Флударабин может использоваться в пероральной или инфузионной форме, которые обладают одинаковой эффективностью, но разной биодоступностью. Эквивалентом в/в дозы 25 мг является пероральная доза 40 мг.

При использовании пероральной формы капсулы принимаются независимо от приема пищи, не разжевываются, запиваются большим объемом жидкости.

Пероральный прием ассоциирован с несколько более высокой частотой гастроинтестинальных осложнений, хотя практически все они 1–2 ст.

Сопроводительная терапия режима FCR изложена в таблице 7.

Показания для редукции доз химиопрепаратов на 2–6 курсах терапии режима FCR в таблице 8, таблице 9. Подозрении на аутоиммунный и/или специфический генез цитопении необходимость отсрочки очередного курса и/или редукции дозировок химиопрепаратов определяются по клинической ситуации.

Режим BR. (табл. 10, табл. 11)

Противопоказания к проведению режима BR [13]:

1. Текущая инфекция.

2. Продвинутые стадии органной недостаточности, не связанной с ХЛЛ.

3. Клиренс креатинина 30 мл/мин.

5. Психические нарушения («большая психиатрия»).

6. Вирусный гепатит В с признаками активности.

Имеются указания на безопасность бендамустина у пациентов с клиренсом креатинина < 15 мл/мин.

В связи с риском фульминантного течения у пациентов с гепатитом В терапия возможна только при отсутствии активности под прикрытием адекватной противовирусной терапии (ламивудин, бараклюд).

Схема режима BR представлена в таблице 12. Продолжительность 1 цикла — 28 дней, всего 6 циклов. [13]

Особенности назначения ритуксимаба:

Ритуксимаб вводится в дозировке 375 мг/м^2 только в первом цикле терапии. Во всех последующих циклах доза увеличивается до 500 мг/м^2. Необходимость эскалации дозы объясняется относительно низкой экспрессией CD20 при ХЛЛ.

Всем пациентам за 30–60 минут до начала инфузии осуществляется премедикация — 1000 мг парацетамола per os, раствор анальгина 50 % — 2,0 (1 г) + раствор димедрола 0,1 % — 2,0 (20 мг) в/в.

При наличии лимфоцитоза $\geq 25 \times 10^9$/л к премедикации добавляются ГКС (преднизолон 50–100 мг, дексаметазон 4–8 мг). Также для профилактики синдрома лизиса опухоли за 12–24 часов до начала инфузии дается аллопуринол (300 мг однократно), осуществляется прегидратация. Доза ритуксимаба в таких случаях может быть разделена на 2 введения: Д0 — 100 мг, Д1 — остальная часть.

При первом введении инфузия ритуксимаба начинается со скорости 50 мг/ч. При отсутствии побочных явлений скорость инфузии увеличивается на 50 мг/ч каждые 30 мин до максимальной скорости 400 мг/ч.

При последующих введениях начальная скорость — 100 мг/ч. При отсутствии побочных явлений скорость инфузии увеличивается на 100 мг/ч каждые 30 мин до максимальной скорости 400 мг/ч.

При возникновении побочных явлений инфузия приостанавливается, и проводятся необходимые медицинские манипуляции. Время возникновения

Таблица 12

СХЕМА РЕЖИМА BR

Препарат	Дозировка	Режим введения
Ритуксимаб	375 мг/м^2 (первый цикл) 500 мг/м^2 (последующие циклы)	0 или 1 день цикла
Бендамустин	90 мг/м^2 (в/в)	2–3 дни цикла (всего 2 дня)

Таблица 13

СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ РЕЖИМА BR

Показание	Препарат, доза	Комментарии
Профилактика тошноты и рвоты, связанных с введением цитостатиков	Ондансетрон, 8 мг, внутривенно Десаметазон 4–8 мг, внутривенно Церукал 10 мг, в/в	По потребности в период введения цитостатиков и в раннем постцитостатическом периоде. Схема обладает низким эметогенным потенциалом
Профилактика пневмоцистной пневмонии в период деплеции CD4+ Т-лимфоцитов (< 200 кл/мкл)	Ко-тримоксазол, 480 мг, per os	По 1 таблетке 2 раза в день 3 раза в неделю (пн, ср, пт). С начала ПХТ и до 6 месяцев после окончания последнего курса по усмотрению лечащего врача
Деконтаминация кишечника, профилактика восходящей Гр-отр. инфекции	Ципрофлоксацин, 500 мг, per os	По 1 таблетке 2 раза в день. При снижении АЧН менее 0,5 × 10^9/л до восстановления АЧН более 1,5 × 109/л всем пациентам
Профилактика инфекций, вызванных грибами рода Candida	Флуконазол, 100 мг, per os	По 3 капсуле 1 раз в день. При снижении АЧН менее 0,5 × 10^9/л до восстановления АЧН более 1,5 × 10^9/л на усмотрение лечащего врача
Профилактика реактивации HSV, VZV	Ацикловир, 200 мг, per os	По 2 таблетке 2 раза в день. С начала ПХТ и до 1 месяца после окончания последнего курса всем пациентам
Профилактика мочекислого диатеза	Аллопуринол, 100 мг, per os	По 1 таблетке 3 раза в день или по 3 таблетке 1 раз в день. С Д-1 ПХТ и в первые 10 дней после окончания введения цитостатиков и/или по уровню мочевой кислоты и/или по усмотрению лечащего врача
Профилактика синдрома	Питьевая вода per os	Не менее 2 л в день. С Д-1 ПХТ и в

Таблица 14

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДОЗ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РЕЖИМА BR

Гематологическая токсичность		
– нейтропения	Число нейтрофилов менее 1,5 × 10^9/л	Перерыв в терапии до восстановления показателей (АЧН ≥ 1,5 × 10^9/л, тромбоциты ≥ 50 × 10^9/л, гемоглобин ≥ 80 г/л). Допустимый перерыв 14 дней. При более длительном перерыве дозы химиопрепаратов уменьшают на 25 %.
– тромбоцитопения	Число тромбоцитов менее 40 × 10^9/л	
– анемия	Уровень гемоглобина менее 70 г/л или снижение гемоглобина более чем на 50 % от уровня до начала терапии	

Таблица 15

НЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ РЕЖИМА BR

Негематологическая токсичность	
– инфекции на фоне нейтропении 3–4 степени	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25 %
– сепсис	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25–50 %
– другая	Перерыв в терапии до разрешения. Допустимый перерыв 28 дней. Редукция доз химиопрепаратов на 25–50 % в зависимости от тяжести.

реакции, скорость инфузии и введенная доза фиксируются в медицинской документации. Ставится в известность дежурный реаниматолог. Инфузия может быть возобновлена после полного купирования симптомов, при этом скорость уменьшается на 50 % и более, проводится мониторинг АД, ЭКГ, ЧДД, сатурации O_2.

Особенности назначения бендамустина:

В случае возникновения инфузионных реакций (лихорадка) делается премедикация — дексаметазон 4–8 мг в/в стр.

Примерно у 8 % больных через 10–14 дней после введения препарата наблюдаются кожные реакции 1–2 ст. не требующие отмены препарата. При возникновении дерматоза может назначаться преднизолон per os (начальная доза 40–60 мг с постепенным снижением за 3 нед.)

Сопроводительная терапия для режима BR изложена в таблице 13. [8, 14]

Показания для коррекции доз химиопрепаратов для режима BR в таблице 14, таблице 15. При подозрении на аутоиммунный и/или специфический генез цитопении необходимость отсрочки очередного курса и/или редукции дозировок химиопрепаратов определяются по клинической ситуации.

Литература

1. *Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D. et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines //Blood. — Vol. 111, № 12. — P. 5446–5456.

2. *Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. et al.* SEER // Cancer Statistics Review. — 2009.

3. *Zenz T., Gribben J.G., Hallek M. et al.* Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy // Blood. — 2012. — Vol. 119, № 18. P. 4101–4107.

4. *Montserrat E., Moreno C., Esteve J. et al.* How I treat refractory CLL // Blood. — 2006. — Vol. 107. — P. 1276–1283.

5. *Clemens M. Wendtner, Günter Brittinger, Hartmut Döhner, et. al.* First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2009. — Vol. 114. — P. 3382–3391.

6. *Oken M.M., Creech R.H., Tormey D.C. et. al.* Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group // Am. J. Clin. Oncol. — 1982. — Vol. 5. — P. 649–655.

7. *Miller et al.* Cumulative Illness Rating Scale-Geriatric // Psychiatry Res. — 1992. — Vol. 41. — P. 237–48.

8. *Cheson B.D., Frame J.N., Vena D. et al.* Tumor lysis syndrome: an uncommon complication of fludarabine therapy of chronic lymphocytic leukemia // J. Clin. Oncol. — 1998. — Vol. 16. — P. 2313–2320.

9. *Rawstron A.C., Villamor N., Ritgen M. et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia // Leukemia. — 2007. — Vol. 21, № 5. — P. 956–964.

10. *Tsimberidou A.M., Keating M.J.* Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia // Semin Oncol. — 2006. — Vol. 33, № 2. — P. 250–6.

11. *Binet J.L., Auquier A., Dighiero G. et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis // Cancer. — 1981. — Vol. 48. — P. 198–204.

12. *Rai K.R.* A critical analysis of staging in CLL. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions // New York: Alan R.Liss. — 1987. — P. 253–264.

13. *Fischer K., Cramer P., Busch R. et al.* Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group // J. Clin. Oncol. — 2012. — Vol. 30, № 26. — P. 3209–3216.

14. *Morrison V.A.* Management of Infectious Complications in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia // ASH education book. — 2007. — P. 332–338.

15. *Hallek M., FischerK., Fingerle-Rowson. G. et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial on behalf of an international group of investigators and the German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group // Lancet. — 2010. — Vol. 376. — P. 1164–1174.

16. *Eichhorst B., Goede V., Hallek M. et al.* Treatment of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. — 2009. — Vol. 50, № 2. — P. 171–178. Review.

17. *Rawstron A.C., Villamor N., Ritgen M. et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia // Leukemia. — 2007. — Vol. 21, № 5. — P. 956–64.

18. *Keating M.J., O'Brien S. et al.* Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 18. — P. 4079–4088.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГУ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ХМЛ

Е.Г. Ломаиа[1], Е.И. Сбитякова[1], Н.С. Лазорко[1], Е.Г. Романова[1], И.В. Холопова[1], Т.С. Никулина[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Ломаиа Ельза Галактионовна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова» МЗ РФ; *Сбитякова Евгения Игоревна* — врач-гематолог ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Лазорко Наталья Сергеевна* — врач-гематолог ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова» МЗ РФ; *Романова Екатерина Геннадьевна* — младший научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Холопова Ирина Валерьевна* — врач клинико-лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории ЦКДЛ, ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Никулина Татьяна Серафимовна* — врач клинико-лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории ЦКДЛ, ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор директор института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры факультской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д.2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: lomelza@gmail.com (Ломаиа Ельза Галактионовна).

Резюме

Диагностика многих гемобластозов, в том числе хронического миелолейкоза, возможна только при использовании высокотехнологичных лабораторных методов. Кроме того, одним из важных условий успеха в терапии ХМЛ является адекватная оценка резидуальной болезни. Именно молекулярно-генетические методы позволяют оценить эффективность как современных лекарственных средств, так и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, ингибиторы тирозинкиназ, цитогенетика, ПЦР.

DIAGNOSTICS, MONITORING AND EFFICIENCY OF CML THERAPY. RECOMMENDATIONS

E.G. Lomaia[1], E.I. Sbityakova[1], N.S. Lazorko[1], E.G. Romanova[1], I.V. Kholopova[1], T.S. Nikulina[1], A.Yu. Zaritskey[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: lomelza@gmail.com (Elza G. Lomaia — PhD, hematologist of Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Just high-tech laboratory techniques allow us to make an accurate diagnosis of the most hematological malignancies, including chronic myeloid leukemia (CML). In addition, one of the important conditions for success in the treatment of CML is an adequate assessment of residual disease. Molecular genetic techniques allow us to estimate the effectiveness of both modern drugs and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in CML.

Key words: Chronic myeloid leukemia, inhibitors of thyrosinkinase, Cytogenetic, PCR.

Статья поступила в редакцию 01.10.12, принята к печати 20.10.12.

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — первый среди описанных лейкозов, а Филадельфийская хромосома (Ph-хромосома), являющаяся специфической мутацией при ХМЛ, — первая генетическая аномалия, выявленная у онко-гематологических больных.

Патогенетическая значимость гена BCR-ABL

Впервые укорочение 22 хромосомы у всех пациентов с клиническим диагнозом ХМЛ в 1960 г. было обнаружено учеными Филадельфийского университета Nowell P.C. и Hungerford D.A. [1]. Дальнейшие исследования показали, что образование Ph-хромосомы является следствием реципрокной транслокации t(9;22)(q34;11) [2], в ходе которой происходит обмен материала ДНК между 9 и 22 хромосомами. Разрыв хромосом происходит на уровне генов ABL (на 9-ой хромосоме) и BCR (на 22-ой хромосоме). В результате данной обменной транслокации на 9-ой и 22-ой хромосомах образуются химерные гены, соответственно, ABL-BCR и BCR-ABL. Тогда как в развитии хронического миелолейкоза роль гена ABL-BCR не доказана, патогенетическое значение гена BCR-ABL не вызывает сомнений [3]. Продукт данного гена белок BCR-ABL обладает высокой тирозин-киназной активностью. Последняя воздействую на субстраты, приводит к активации множество сигнальных путей, как усиливающих пролиферацию клетки (SOS□RAS/GAP□RAF□ MEK□MAPкиназа), так и подавляющих апоптоз (GAB2□ PI3K□ PIP3□ PKB□AKT) [4]. В результате лейкемическая клетка приобретает пролиферативное преимущество, быстро накапливается и на момент выявления заболевания составляет около 90 % среди гемопоэтических клеток.

Одним из характерных признаков ХМЛ является также выход незрелых клеток в периферическую кровь. В исследованиях показано, что в гемопоэтических клетках, экспрессирующих ген BCR-ABL, снижена способность к связыванию с фибронектином. По-видимому, нарушение адгезии клеток со стромой является следствием взаимодействия F-актина с актин-связывающим участком BCR-ABL тирозин-киназы, что, вероятно, приводит к снижению экспрессии интегринов и CXCR4, ослаблению взаимодействия клетки с белками цитоскелета, снижению контакта со стромой в костном мозге и к выходу незрелых клеток в периферическую кровь. Кроме того, в клетках ХМЛ выявляется нарушение взаимодействия между CXCR4 рецептором и его лигандом SDF-1 [5]. После выхода в кровь лейкемические клетки способны формировать очаги экстрамедуллярного гемопоэза практически во всех тканях и органах, особенно часто в селезенке, лимфоузлах, костях, коже, центральной нервной системе.

Известно также, что со временем наряду с транслокацией (9;22) в клетка ХМЛ появляются и другие хромосомные аберрации. Клональная эволюция является следствием геномной нестабильности. Показано, что в клетках ХМЛ снижается способность восстанавливать двойные разрывы ДНК (снижение BRCA1) и повышается способность восстанавливать гомологичные повреждения [6]. Также было показано, что BCR-ABL способна активировать белок RAD51, который участвует в гомологичной рекомбинантной репарации, приводящей к устойчивости клетки к апоптозу при формировании двойных разрывов ДНК [7]. Кроме того, BCR-ABL способствует повышению экспрессии ROS (reactive oxygen species). Последние повреждают ДНК путем нарушения процессов трансверсии (GC□TA) и транзиции (GC□AT) [8]. Как повреждение ДНК, так и снижение способности восстанавливать нормальную его последовательность, могут привести к возникновению мутаций генов, нарушению их экспрессии или более грубым хромосомным аберрациям.

Дополнительные хромосомные аберрации со временем появляются у 20–40 % больных — трисомия 8 хромосомы (30–40 %), дополнительная 22-ая хромосома (20–30 %), изохромосома 17 (15–20 %) и другие. Вовлечение генов, расположенных на этих хромосомах, приводит к дальнейшей дерегуляция процессов пролиферации, апоптоза и дифференцировки в лейкемических клетках [9]. Так, например, трисомии 8 хромосомы часто сопутствует гиперэкспрессия гена c-myc, расположенного в локусе 8q24, также вовлеченного в развитие и прогрессию ХМЛ. Формирование изохромосомы 17q сопровождается потерей длинного плеча 17 хромосомы, что, возможно, приводит к инактивации расположенного на 17 хромосоме антионкогена p53 и ведет к прогрессии заболевания. Дополнительная Ph хромосома, приводящая к гиперэкспрессии гена BCR-ABL, также играет важную роль в прогрессии ХМЛ [10].

Т.о., именно с появлением в клетке тирозин-киназы BCR-ABL связана ее опухолевая трансформация, приводящая к усиленной пролиферации, подавлению апоптоза, выходу незрелых предшественников в кровь, их экстрамедуллярная диссеминация, а появление новых хромосомных аберраций, мутации генов приводит к неминуемой прогрессии болезни из хронической фазы (ХФ) в фазы акселерации (ФА) и бластного криза (БК).

У подавляющего большинства пациентов (около 80–85 %) ХМЛ диагностируется в ХФ. В остальных случаях ХМЛ выявляют на этапе ФА (около 15 %)

или даже в БК (около 5 %). Прогноз пациентов в продвинутых фазах существенно хуже. Как и при любых онкопатологиях, крайне важна своевременная диагностика ХМЛ и быстрое начало эффективной терапии.

Диагностика ХМЛ

Довольно часто изменения в клиническом анализе крови (КАК) или увеличение размеров селезенки выявляются случайно. Большинство пациентов чувствуют себя хорошо и не предъявляют никаких жалоб. Однако часть пациентов обращаются к врачу с неспецифическими симптомами — недомогание, слабость, быстрая усталость, потеря веса, редко лихорадка — связанными с опухолевой интоксикацией. Кроме того, в дебюте ХМЛ возможно наличие анемии, тромбоцитопении с проявлениями анемического и геморрагического симптомов. Выраженная спленомегалия и/или значительно реже гепатомегалия могут вызвать дискомфорт в брюшной полости и являться причиной обращения к врачу. Также возможны оссалгии из-за накопления огромного количества лейкемических клеток в костном мозге (КМ).

В КАК выявляется лейкоцитоз любого уровня с нейтрофилезом и молодыми предшественниками вплоть до бластов. Хотя эти изменения и являются наиболее характерными для ХМЛ, описаны случаи дебюта заболевания в виде тромбоцитоза. Возможно наличие анемии, тромбоцитоза или тромбоцитопении. При выявлении анемии всегда необходимо исключение других причин, особенно в ХФ. Морфологически клетки ХМЛ при микроскопии отличить от нормальных клеток не представляется возможным. Жалобы пациента, спленомегалия и/или вышеописанные изменения в КАК не являются специфичными для ХМЛ, хотя позволяют заподозрить заболевание. Поэтому только выявление Ph-хромосомы (цитогенетическое исследование) и/или гена BCR-ABL с помощью молекулярно-генетических методов исследования, таких как полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и флюоресцентная гибридизация in situ (Fluorescent hybridization in situ — FISH), является патогномоничным для ХМЛ. Поэтому единственным критерием для установки диагноза ХМЛ является выявление Ph-хромосомы и/или гена BCR-ABL.

При стандартном цитогенетическом исследовании Ph-хромосома выявляется почти у 95 % больных ХМЛ. При этом химерный ген BCR-ABL обнаруживается у всех больных ХМЛ с помощью ПЦР и/или FISH. Клиническая картина и течение болезни практически не отличаются у больных с Ph-позитивным/BCR-ABL-позитивным и Ph-негативным (с «замаскированной» Филадельфийской хромосомой), но с BCR-ABL-позитивном ХМЛ. «Маскировка» Ph-хромосомы может возникнуть при некоторых видах вариантных транслокаций, при которых в патологический процесс могут быть вовлечены наряду с 9 хромосомой, другие хромосомы. При этом разрыв на 22 хромосоме, как и при стандартной транслокации t(9;22)(q34;q11), происходит на уровне участка q11. В таких случаях если при цитогенетическом исследовании не удается обнаружить Ph-хромосому, то ген BCR-ABL методом FISH или ПЦР выявляется в 100 % случаев ХМЛ.

При транслокации t(9;22)(q34;11) точка разрыва на 9-ой хромосоме жестко фиксирована и возникает на 3' участке гена ABL (экзон a2). У подавляющего большинства больных ХМЛ разрыв на 22-ой хромосоме происходит в большой M-bcr зоне в области экзонов e13 и e14, известных также как b2 и b3. Оба транскрипта (b2a2 и b3a2) слитного гена BCR-ABL кодируют образование белка размером 210 kDa — p210 BCR-ABL. Однако другие транскрипты гена BCR-AB p190, p230 и др. у больных ХМЛ также могут выявляться. Хотя транскрипты e1a2, e19a2, e1a3 и др встречаются редко, однако они могут вызвать определенные трудности при диагностике и мониторинге эффективности терапии ХМЛ. Так, при определении количественного ПЦР используют праймеры к стандартному транскрипту p210 BCR-ABL (b2a2 и b3a2). Поэтому при ПЦР анализе в случае наличия у пациента нестандартных транскриптов гена BCR-ABL, можно получить ложно-негативный ответ. В связи с этим рекомендуется выполнение качественного анализа ПЦР для определения транскрипта гена BCR-ABL (при невозможности можно выполнить количественный ПЦР) на этапе диагностики или позже, пока все еще выявляется Ph-позитивный клон по цитогенетике. Отсутствие транскрита BCR-ABL по данным ПЦР при наличия хотя бы 1 % Ph-позитивного клона по стандартной цитогенетике или по данным FISH может свидетельствовать о присутствии нестандартного транскрипта гена BCR-ABL.

Фазы и группы риска ХМЛ

Четкое установление фаз ХМЛ важно как для определения прогноза заболевания, так и для подбора адекватной терапии (дозы ингибиторов тирозин-киназ, своевременное включение в схему лечения аллотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток). Существует несколько критериев определения фазы заболевания. До недавнего времени наиболее часто использовали критерии Онкологического Центра M.D. Anderson (США), разработанные Kantarjian H.M. с соавторами в

1988 г. [11]. Недавно распространение получили критерии Европейской сети по изучению лейкозов (European Leukemia Net — ELN), предложенные Baccarani M. с соавторами [12]. Характеристика фаз ХМЛ представлена в табл. 1.

Фазу заболевания следует устанавливать не только на момент диагноза, но и при ухудшении клинико-гематологических показателей и/или появлении органомегалии. Любые патологические образования, подозрительные на экстрамедуллярные очаги гемопоэза (за исключением поражения селезенки и печени), должны быть морфологически исследованы.

В отличие от фаз болезни, группы риска определяют только однократно до начала какой-либо терапии. В настоящее время используют группы риска Sokal, EURO и EUTOS [13–15]. Несмотря на то, что критерии факторов риска по Sokal и EURO были определены у пациентов, получавших терапию цитостатиками и препаратами ИФН-α, их значимость показана и у больных, получающих ингибиторы тирозин-киназ (ИТК). Группы риска можно рассчитать на сайте ELN на страницах http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score и http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score. В табл. 2 представлены критерии групп риска ХМЛ.

Таблица 1

МЕЖДУНАРОДНЫЕ КРИТЕРИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Признак	Критерии фазы акселерации	
	M.D.Anderson	критерии ELN
Бласты крови или костного мозга	15–29 %	15–29 %
Бласты + промиелоциты крови или костного мозга	³30 %	> 30 % (при наличии бластных клеток < 30 %)
Базофилы крови	³20 %	> 20 %
Тромбоцитопения, не связанная с терапией	< 100 × 10^9/л	< 100 × 10^9/л
Клональная эволюция	Да	–

Примечание: ХФ ХМЛ — устанавливается при отсутствии критериев ФА и БК.

Бластный криз — диагностируют при наличии бластных клеток в крови и/или костном мозге ≥ 30 % или при появлении экстрамедуллярных очагов гемопоэза в разных органах и тканях (кроме селезенки и печени).

NB! Спленомегалия и гепатомегалия любых размеров не являются признаками ФА или БК ХМЛ.

Таблица 2

КРИТЕРИИ ГРУПП РИСКА ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Признак	Критерии Sokal	Критерии EURO	Критерии EUTOS
Возраст, годы	0.0116(43.4)	0.6666(≥ 50)	–
Селезенка, см (из-под края реберной дуги)	0.0345(7.51)	0.042 * размер елезенки	4 * размер селезенки
Тромбоциты*10*9/л	0.188((тромбоциты)2/700–0.563)	1.0956,если ≥ 1500	–
Бласты, % (костного мозга)	0.0887(2.1)	0.0584*бласты	–
Эозинофилы, % (крови)	–	0.0413*эозинофилы	–
Базофилы, % (крови)	–	0.2039,если базофилы ≥ 3 %	7 * базофилы (%)
Гемоглобин г/л	–	–	–
Индекс относительного риска	Экспонента суммы	Сумма*1000	–
Группы риска: Низкая Средняя Высокая	 < 0.8 0.8–1.2 > 1.2	 ≤ 780 781–1479 ≥ 1480	 < 87 – ≥ 87

Примечание: Возможность автоматического подсчета групп риска.
http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score
http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score

Следует учитывать, что если группы риска SOKAL, EURO помогают прогнозировать общую выживаемость, EUTOS может предсказать вероятность достижения полного цитогенетического ответа к 18 мес терапии иматинибом. Пока валидность EUTOS для определения эффективности терапии новыми ИТК (дазатиниб, нилотиниб) не доказана.

К **обязательным методам** обследования пациентов ХМЛ для установления диагноза, а также для определения фазы и группы риска относятся:

1) Морфологическое исследование периферической крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и тромбоцитов;

2) Морфологическое исследование пунктата костного мозга;

3) Цитогенетическое исследование костного мозга. При неинформативности цитогенетического анализа (невозможность получения качественных метафазных пластинок, исследовано менее 20 клеток), а также при выявлении нормального кариотипа или отсутствии t(9;22)(q34;11), необходимо использовать молекулярно-генетические методики (FISH или ПЦР). Как правило, на этапе диагностики данная транслокация выявляется практически во всех исследуемых клетках. Хотя целесообразно исследовать не менее 20 клеток, однако обнаружение Ph-хромосомы в 2-х и более метафазах свидетельствует о клональном характере изменений и подтверждает диагноз ХМЛ. Поэтому если исследовано менее 20 метафаз, но при этом в 2-х и более клетках выявлена Ph-хромосома, диагноз ХМЛ считается доказанным и выполнение молекулярно-генетических исследований не обязательно. Данные исследования обязательны при отсутствии Ph-хромосомы и невозможности исследования 20 метафаз. В остальных случаях на этапе диагностики выполнение количественного ПЦР анализа или FISH не требуется.

4) Оценка экстрамедуллярных очагов: Показано пальпаторное определение размеров селезенки, печени и периферических лимфатических узлов. Выполнение УЗИ/КТ брюшной полости или грудной клетки требуется только при подозрении экстрамедуллярных очагов, кроме поражения селезенки и печени. Спленомегалия и/или гепатомегалия любых размеров не являются критериями ФА или БК, тогда как специфическое поражение центральной нервной системы, любых других органов и тканей следует рассматривать как признак трансформации болезни в БК. Природа экстрамедуллярных поражений (кроме селезенки и печени) должна быть доказана морфологически. Диагностическая люмбальная пункция и МРТ головного мозга показаны при наличии неврологической симптоматики, а также у пациентов в бластном кризе, особенно при лимфоидном варианте БК.

5) При бластном кризе показано цитохимическое исследование или иммунофенотипирование бластных клеток.

6) Мутационный анализ: В дебюте болезни только в ФА и БК, а в ХФ при резистентности к ИТК.

Мониторинг эффективности терапии ХМЛ

В настоящее время первой линией терапии ХМЛ являются ИТК (иматиниб, нилоитиниб, дазатиниб). Многочисленные исследования доказали, что на фоне терапии ИТК крайне важен регулярный мониторинг для оценки как степени, так и скорости редукции лейкемического клона клеток. Рисунок. Поэтапное достижение полного гематологического ответа (ПГО), ПЦГО, большого молекулярного ответа (БМО) и полного молекулярного ответ (ПМО).

Критерии ПГО, цитогенетического и молекулярного ответов представлены в таблице № 3–5.

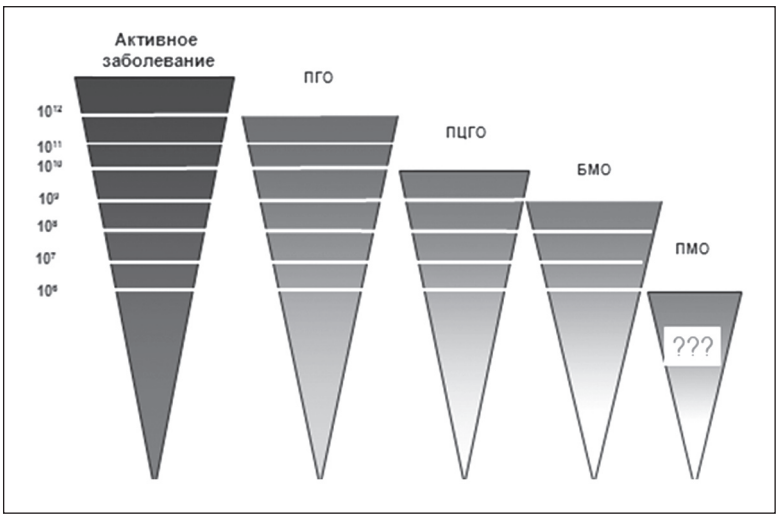


Рисунок. Ответ на терапию и примерное количество резидуальных лейкемических клеток при ХМЛ

Таблица 3

КРИТЕРИИ ПОЛНОГО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА

Показатель	Ответ
Лейкоциты	$< 10 \times 10^9$/л
Тромбоциты	$< 450 \times 10^9$/л
Спленомегалия	Отсутствует пальпаторно
Бласты + промиелоцитыц+миелоцы+метамиелоциты	0 %
Базофилы ПК	< 5 %

Таблица 4

КРИТЕРИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА

Глубина ответа	Количество Ph+метафаз
Полный (ПЦГО) *	0 %
Частичный (ЧЦГО)*	1–35 %
Малый (МЦГО)	36–65 %
Минимальный (минЦГО)	66–95 %
Нет ответа	96–100 %

Примечание: * — Большой цитогенетический ответ (БЦГО) = полный + частичный ЦГО. Цитогенетический ответ оценивается только при исследовании 20 и более метафазных пластинок!

Таблица 5

КРИТЕРИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТА

Глубина ответа	Соотношение bcr-abl/abl	
	% (по международной шкале)	log (Снижение от базального уровня по IRIS)
Большой молекулярный ответ (БМО)	≤ 0,1 %	≥ 3 log
Молекулярный ответ [4] (МО [4])	≤ 0,01 % или	≥ 4 log или
	Неопределяемый уровень транскрипта bcr-abl при исследовании ≥ 10 000 копий контрольного гена abl	
Молекулярный ответ [4,5] (МО [4,5])	≤ 0,0032 % или	≥ 4,5 log или
	Неопределяемый уровень транскрипта bcr-abl при исследовании ≥ 32 000 копий контрольного гена abl	
Молекулярный ответ [5] (МО [5])	≤ 0,0001 % или	≥ 5 log или
	Неопределяемый уровень транскрипта bcr-abl при исследовании ≥ 32 000 копий контрольного гена abl	
Полный молекулярный ответ/неопределяемый уровень траснкрипта	Транскрипт bcr-abl не определяется	

Достижение ПГО, т.е. нормализация показателей КАК и отсутствие экстрамедуллярных очагов гемопоэза, свидетельствует примерно о десятикратном снижении уровня лейкемических клеток. При наличии ПГО дальнейшая оценка ответа на терапию осуществляется с помощью цитогенетики и/или ПЦР. Выполнение FISH нецелесообразно при информативном ЦГ анализе. Несмотря на возможность исследования 200 и более клеток при FISH, чувствительность данного метода не сильно превосходит ЦГ анализ. Как правило, FISH используется при неинформативности ЦГ анализа (невозможно исследовать ≥ 20 метафаз или метафазные пластинки вовсе не удалось получить). При интерпретации результата FISH всегда следует обращать внимание на чувствительность исследования, которая может быть разной в зависимости от используемого зонда.

Количественный анализ ПЦР для оценки степени редукции опухолевой массы можно использовать на любом этапе терапии ИТК. Однако согласно наиболее широко используемой рекомендации Baccarani M. с соавторами по терапии ИТК [16], количественное определение ПЦР обязательно только после достижения ПЦГО. Экспертное сообщество давно обсуждается целесообразность использования ЦГ анализа для оценки эффекта терапии ХМЛ. Существуют доводы как «за», так и «против». В пользу ЦГ — объективность метода, возможность оценки всего кариотипа и выявление хромосомных аберраций, как в Ph-позитивном, так и в Ph-негативном клоне. Недостатками данного метода исследования являются необходимость пункции костного мозга, длительность его выполнения, отсутствие четких доказательств прогностической значимости, как клональной эволюции, так и появления хромосомных аберраций в Ph-негативных клетках. В 2012 г. появились новые рекомендации Baccarani с соавторами [17], где наряду с ЦГ анализом для оценки эффективности ИТК можно использовать ПЦР анализ. Так, оптимальным следует считать результаты терапии при уровне транскрипта на 3 мес и 6 мес < 10 %, а на 12 мес ≤ 1 %.

Многочисленные исследования доказывают прогностическую значимость достижения ПЦГО и БМО в определенные сроки терапии ИТК, как впервой, так и во второй линии. Рекомендации Baccarani с соавторами 2009 г. по терапии ХМЛ с указанием оценки ответа на ИТК в разные сроки лечения представлены в таблицах 6–7.

Таблица 6

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИМАТИНИБА В ПЕРВОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ХМЛ

Месяцы терапии	Оптимальный	Субоптимальный	Неэффективность	Факторы риска
На момент диагноза	–	–	–	– Высокая гр. риска ХМЛ – КЭ в Ph+ клетках
3 мес	ПГО и Ph+ ≤ 65 %	ПГО есть, но Ph+ > 95 %	Нет ПГО	–
6 мес	БЦГО Ph+ ≤ 35 %	Нет БЦГО Ph+ > 35 %	Нет ЦГ ответа Ph+ > 95 %	–
12 мес	ПЦГО Ph+ 0 %	БЦГО Ph+ 1–35 %	Нет БЦГО Ph+ > 35 %	Нет БМО
18 мес	БМО	ПЦГО, но нет БМО	Нет ПЦГО Ph+ ≥ 1 %	–
В любое время	БМО стабильный или транскрипция гена BCR-ABL снижается	– Потеря БМО, но сохранение ПЦГО и/или – Появление мутаций с чувствительностью к иматинибу	– Потеря ПГО и/или – Потеря ПЦГО и/или – Появление мутаций, нечувствительных к иматинибу или – Появление КЭ в Ph+ клетках	– Любой прирост BCR-ABL транскрипта –Дополнительные хромосомные аномалии в Ph-негативных клетках

Примечание: ПГО — полный гематологический ответ; БЦГО — большой цитогенетический ответ; ПГЦО — полный цитогенетический ответ; БМО — большой молекулярный ответ; КЭ — клональная эволюция (в Ph+ клетках).

Таблица 7

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДАЗАТИНИБА И НИЛОТИНИБА ПРИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИМАТИНИБУ ИЛИ ЕГО НЕПЕРЕНОСИМОСТИ У ПАЦИЕНТОВ ХМЛ

Этап	Оптимальный	Субоптимальный	Неэффективность	Факторы риска
До терапии	–	–	–	– Гематологическая резистетность к иматинибу – КЭ – Мутации, резистентные к ИТК
3 мес	ПГО и БЦГО Ph+ 0–35 %	Малый ответ Ph+ 36–65 %	Ph+ >95 % или новые резистентные мутации	Минимальный ЦГО (Ph+ 66–95 %)
6 мес	ПЦГО Ph+ 0 %	БГЦО Ph+ 1–35 %	Ph+ 66–95 % или новые резистентные мутации	Малый ЦГО (Ph+ 36–65 %)
12 мес	БМО	Нет БМО	Ph+ >35 %	–

Примечание: ПГО — полный гематологический ответ; БГЦО — большой цитогенетический ответ; ПГЦО — полный цитогенетический ответ; БМО — большой молекулярный ответ; КЭ — клональная эволюция (в Ph+ клетках); ИТК-Ингибиторы тирозин-киназ.

Таблица 8

ОБСЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИТК

Метод исследования	Частота исследования
Клинический анализ крови	1 раз в 15 дней до 3-х мес, далее каждые 3 мес. Анализ выполняется чаще по показаниям (токсичность, отсутствие ПГО).
Морфология костного мозга	При подозрении на трансформацию в фазу акселерации или бластный криз.
Цитогенетика	Через 3 мес, 6 мес от начала терапии и далее каждые 6 мес до достижения ПЦГО. После достижения ПЦГО и регулярного ПЦР мониторинга проведение ЦГ исследования возможно только при подозрении на утрату ПЦГО (при выявлении >1 % транскрипта bcr-abl при количественном ПЦР).
FISH	Только при неинформативности цитогенетики.
Количественный ПЦР	Каждые 3 мес до достижения БМО, далее каждые 3–6 мес.
Мутационный анализ	При первичной или вторичной резистентности к ИТК.

Регулярное адекватное обследование позволяет своевременно выявить пациентов с резистентностью к проводимой терапии тем или иным ИТК. В такой ситуации ранний перевод пациента на другое ИТК или своевременное выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) дает больному ХМЛ наилучший шанс на достижение ремиссии. Доступность всех молекулярно-генетических методов исследования имеет крайне важное значение для обеспечения адекватной тактики ведения пациентов ХМЛ. Безусловно, для обеспечения высокого качества исследований огромное значение имеет и опыт врачей лабораторной диагностики.

Международное сотрудничество в области стандартизации и оценки качества этих высокотехнологичных методов позволяет гематологам быть уверенными в полученных результатах. Кроме того, международная стандартизация количественной методики ПЦР с получением индивидуального коэффициента (конверсионный фактор) для каждой лаборатории позволяет гематологам оценивать динамику транскрипта bcr-abl по ПЦР анализам, выполненных в разных лабораториях. Кроме того, уровень БМО в международных рекомендациях указан с учетом использования конверсионного фактора. В России важности международной стандартизации была посвящена конференция в Иркутске в 2010 г.

Дубина М.В. с соавторами в статье по материалам данной конференции обозначили основные требования к ПЦР методике, важность молекулярного мониторинга эффективности терапии ХМЛ [18]. В 2011г. большинство молекулярно-генетических лабораторий России, в том числе лаборатория ФЦСКЭ им В.А. Алмазова (выступала в качестве референс лаборатории), получили конверсионный фактор для пересчета результатов ПЦР по международной шкале.

Для определения тактики ведения пациентов важное значение имеет также определение мутационного статуса гена BCR-ABL. Их появление связывают с геномной нестабильностью в клетке ХМЛ. Чаще выявляются у пациентов в ФА/БК. При этом почти не обнаруживаются до начала ИТК в ХФ. К настоящему времени выявлено более 90 мутаций данного гена. Однако клиническое значение имеют всего несколько из них. Так, клетки, экспрессирующие мутацию T315I, не чувствительны к ИТК. При выявлении данной мутации, терапия ИТК не рекомендуется, хотя описаны единичные случаи достижения даже ПЦГО как на монотерапии ИТК, так и в сочетании с препаратами интерферона [19]. Выявлено также, что результаты терапии дазатинибом снижаются резко при наличии у пациента мутаций V299L, T315A, F317L/V/I/C, а нилотиниб малоэффективен при мутациях E255K/V, Y253H, F359V/C/I. В связи с этим выявление вышеперечисленных мутаций позволяет индивидуализировать терапию ИТК пациентов ХМЛ для получения оптимального эффекта. В настоящее время для определения мутаций наиболее часто используется метод прямого секвенирования. Хотя чувствительность данного метода не очень высокая, клиническая значимость появления мутаций в небольшом количестве клеток ХМЛ не доказана. Прямое секвенирование признано экспертным сообществом ELN стандартным методом для выполнения мутационного анализа гена BCR-ABL. Выполнение данного анализа позволяет не только выбрать оптимальную консервативную терапию, но своевременно, без предшествующей дорогостоящей и малоэффективной терапии ИТК, направить пациента с мутацией T315I на аллоТГСК [15, 17, 20].

В таблице 8 показаны сроки выполнения лабораторных методов исследования, а также показания к ним.

Т.о. успехи в терапии ХМЛ могут быть обеспечены доступностью как современных лекарственных препаратов (ИТК) и аллоТГСК, так и всех высокотехнологичных молекулярно-генетических методов исследования. Именно полноценный мониторинг позволяет персонализировать тактику ведения пациентов и дает возможность максимально повысить эффективность современных средств терапии ХМЛ.

Литература

1.*Nowell P.C., Hungerford D.A.* A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Science. — 1960. — Vol. 132. — P. 1497–1502.

2. *Rowley J.D.* A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // Nature. — 1973. — Vol. 243. — P. 290–293.

3. *Elefanty A.G., Hariharan I.K., Cory S.* The hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple haematopoietic neoplasms in mice // EMBO J. — 1990. — Vol. 9. — P. 1069–1078.

4. *Steelman L.S., Pohnert S.C., Shelton J.G. et.al.* JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and eukemogenesis // Leukemia. — 2004. — Vol. 18, № 2. — P. 189–218.

5. *Peled A., Hardan I., Trakhtenbrot L. et al.* Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1 // Stem Cells. — 2002. — Vol. 20, № 3. — P. 259–266.

6. *Deutsch E., Jarrousse S., Buet D. et al.* Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells // Blood. — 2003. — Vol. 101, № 11. — P. 4583–4588.

7. *Slupianek A., Hoser G., Majsterek I. et al.* Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. // Mol. Cell Biol. — 2002. — Vol. 22, № 12. — P. 4189–4201.

8. *Sattler M. et al.* The BCR-ABL tyrosine-kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 275. — P. 24273–24278.

9. *Cortes J., O'Dwyer M.E.* Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. — 2004. — Vol. 8, № 3. — P. 671–684.

10. *Majlis A., Smith T.L., Talpaz M.* Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia // Journal of Clin. Oncol. — 1996. — Vol. 14. — P. 196–203.

11. *Kantarjian H.M. et al.* Characteristic of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia // Cancer. — 1988. — Vol. 61. — P. 1441–1446.

12. *Baccarani M. et.al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of European Lukemia Net // Blood. — 2006. — Vol. 108. — P. 1809–18203.

13. *Hasford J., Pfirmann M., Hehlmann R.* A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group //

Journal of Nationale Cancer Institution. — 1998. — Vol. 90. — P. 850–858.

14. *Sokal J.E., Baccarani M., Russo D. et al.* Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia // Semin Hematol. — 1988. — Vol. 25. — P. 49–61.

15.*Hasford J. et al.* Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score // Blood. — 2011. — Vol. 118, № 3. — P. 686–692.

16. *Baccarani M., Cortes J., Pane F., Niederweiser D. et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet // JCO. — 2009. — P. 1–11.

17. *Baccarani M., Pileri S, Steegmann J.L. et al.* ESMO Guidelines Working Group. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Ann Oncol. — 2012. — Vol. 23, № 7 — P. 72–77.

18. *Дубин М.В., Куевда Д.А., Хомяков Т.Е. и др.* Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России (по материалам Всероссийской научно-практической конференции, Иркутск, 3–4 сентября 2010 г) //Современная онкология. — 2010. — № 4. — С. 9–15.

19. *Cornelison A.M., Welch M.A., Koller C., Jabbour E.* Dasatinib combined with interferon-alfa induces a complete cytogenetic response and major molecular response in a patient with chronic myelogenous leukemia harboring the T315I BCR-ABL1 mutation // Clin Lymphoma Myeloma Leuk. — 2011. — Vol. 11, № 1. — P. 111–113.

20. *Soverini S., Hochhaus A., Nicolini F. et al.* BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chonic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: ecommendations from an expert panel on befalf of European LeukemiaNet // Blood. — 2011. — Vol. 118, № 5. — P. 1208–1215.

НИЛОТИНИБ И ДАЗАТИНИБ. ИНГИБИТОРЫ ТИРОЗИНКИНАЗ В ПЕРВОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Е.Г. Ломаиа[1], Е.И. Сбитякова[1], Н.С. Лазорко[1], Е.Г. Романова[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» МЗ ЗФ, Санкт-Петербург, Россия

Ломаиа Ельза Галактионовна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Сбитякова Евгения Игоревна* — врач — гематолог ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Лазорко Наталья Сергеевна* — врач — гематолог ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Романова Екатерина Геннадьевна* — младший научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор, директор института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры факультской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д.2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: salamatevgeny@mail.ru (Сбитякова Евгения Игоревна).

Резюме

Терапия иматинибом (ИМ) у большинства пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в хронической фазе (ХФ) обеспечивает стабильный и глубокий ответ. Тем не менее, часть больных не достигают полного цитогенетического ответа (ПЦГО) или впоследствии его утрачивают. В настоящее время в арсенале гематологов появились ингибиторы тирозинкиназ нового поколения: нилотиниб и дазатиниб. Клинические исследования по применению новых ингибиторов тирозин-киназ (ИТК) нилотиниба и дазатиниба в ХФ ХМЛ в качестве первой линии терапии доказали их преимущество над иматинибом. В статье в основном приведены результаты двух многоцентровых международных клинических исследований под названиями ENESTnd (the Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients) и DASISION (The Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients

Ключевые слова: Хронический миелолейкоз, нилотиниб, дазатиниб.

NILOTINIB AND DASATINIB. SECOND GENERATION OF TYROSINE-KINASE INHIBITORS (TKI) AS A FRONTLINE TREATMENT

E.G. Lomaia[1], E.I. Sbityakova[1], N.S. Lazorko[1], E.G. Romanova[1], A.Yu. Zaritskey[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: salamatevgeny@mail.ru (Evgenia I. Sbityakova — hematologist of Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Therapy with imatinib (IM) of chronic phase (CP) of chronic myeloid leukemia (CML) in the majority of patients leads to stable hematologic and cytogenetic remission. Nevertheless, part of patients don't reach the complete cytogenetic remission or subsequently it lose. Now in an arsenal of hematologists there were new generationof tyrosine-kinase inhibitors (TKI):nilotinib and dasatinib. Clinical trials of new tyrosine-kinase inhibitors (TKI) nilotinib and dasatinib as a frontline treatment in newly diagnosed CML CP patients proved their advan-

tages above imatinib. This review contains results of two multicenter international clinical triels are ENESTnd (the Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients) and DASISION (The Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients.

Key words: Chronic myeloid leukemia, nilotinib, dasatinib.

Статья поступила в редакцию 01.10.12, принята к печати 20.10.12.

В эру ингибиторов тирозинкиназ у пациентов хроническим миелолейкозом появилась возможность значимо продлить жизнь и улучшить ее качество, получать терапию амбулаторно, избежать привязанности к стационарному лечению. Первый ингибитор тирозинкиназ (ИТК) — иматиниб показал феноменальные результаты по сравнению с предыдущими методами терапии таких пациентов. В данной статье мы будет обсуждать лечение только хронической фазы (ХФ) заболевания, поскольку ингибирование bcr-abl наиболее эффективно лишь в этой фазе, тогда как в фазах акселерации (ФА) и бластного криза (БК) включаются другие, не связанные с bcr-abl, пока еще полностью не расшифрованные механизмы [1]. Все ли проблемы смог решить иматиниб Бессобытийная выживаемость больных через 8 лет лечения составляет 81 % [2]. Резистентность может быть преодолена ИТК второго поколения (нилотиниб, дазатиниб) [3], в качестве третьей линии используется аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) [4] или другие ИТК [5]. В настоящее время нерешенной проблемой остается вопрос с редкими случаями мутации T315I, панрезистентной к известным в настоящее время ИТК [6].

Иматиниб показал очень хорошие результаты — большинство пациентов достигают цитогенетической ремиссии, часть из них — достигают полного молекулярного ответа (ПМО) [7]. Кроме того, у некоторых больных ХМЛ, достигших длительного ПМО, отмена препарата не приводит к рецидиву заболевания [8]. Непереносимость ИМ встречается редко и обычно не связана с серьезными угрожающими жизни побочными эффектами [9].

Залогом излечения пациента с хроническим миелолейкозом являются максимально глубокий молекулярный ответ в сочетании с минимальной токсичностью препарата.

Основными задачами, решение которых позволит достигнуть полного излечения, являются:

1. Достижение ПМО у максимального числа больных.

2. Дальнейшее углубление молекулярных ремиссий путем:

– снижения антиапоптотического влияния стромы костного мозга;

– усиления противоопухолевого иммунного ответа;

3. Совершенствование лабораторных методик оценки минимальной остаточной болезни с целью повышения их чувствительности.

4. Высокая безопасность новых препаратов.

Предлагаем рассмотреть результаты двух международных исследований, в которых участвовали и Российские центры: ENESTnd (the Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients) и DASISION (The Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients). Исследования посвящены эффективности ингибиторов тирозинкиназ второго покаления в качестве первой линии терапии у пациентов в ХФ ХМЛ.

Дазатиниб — ин-гибитор тирозинкиназ, разработанный для лечения взрослых пациентов с ХМЛ в хронической фазе, фазе акселерации, бластного криза при развитии резистентности или непереносимости к иматинибу, а также терапии Ph+ острого лимфобластного лейкоза. Зарегистрирован FDA США 28 июня 2006. Дазатиниб обладает двойным действием, которое направлено на подавление тирозинкиназы BCR-ABL как в активной так и неактивной конформации , а также активен в отношении тирозинкиназ группы Src (SRC, LCK, YES,FYN), кроме того, ингибирует активность c-KIT, EPHA2,PDGFR. Дазатиниб активен в отношении 21 из 22 известных мутаций BCR-ABL. В 325 раз интенсивнее подавляет активность немутированного дикого типа BCR-ABL по сравнению с иматиибом. Дазатиниб был создан в 2006 г. в результате поисков путей преодоления неэффективности иматиниба при хроническом миелолейкозе. Препарат получил свое наименование в честь одного из разработчиков, химика Джагабанду Даса. С 2012 года препарат включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов[10, 11].

Нилотиниб (известный ранее как AMN107). В июне 2010 года зарегестрирован в FDA также как препарат первой линии терапии ХМЛ после

проведения многочисленных клинических исследований [12].

В исследовании ENESTnd проводилось исследование нилотиниба (в сравнении с иматинибом), в исследовании DASISION — дазатиниба (также в сравнении с иматинибом) в первой линии терапии пациентов с хронической фазой ХМЛ.

Невозможно напрямую сравнивать конкретные данные двух различных исследований, можно лишь сравнить тенденции и закономерности.

Основные критерии включения больных в данные исследования были идентичными: пациенты старше 18 лет без тяжелой сопутствующей патологии, с соматическим статусом по шкале ECOG не более 2, цитогенетически подтвержденным диагнозом хронической фазы ХМЛ, диагностированным в течение 3 (ENESTnd) и 6 месяцев (DASISION). Из предшествовавшей терапии в обоих исследованиях допускалось применение анагрелида, гидроксикарбамида, непродолжительное (не более 2 недель) применение иматиниба.

В обоих исследованиях распределение пациентов в группах было равномерным (Рис. 1 и Рис. 2).

В исследовании DASISION была разрешена эскалация дозы дазатиниба и иматиниба, а в исследовании ENESTnd — только иматиниба. В обоих исследованиях не допускалось перевод пациента с одного препарата на другой. В исследовании DASISION терапия продолжалась до прогрессии заболевания или тяжелых неконтролируемых токсичностей. В исследовании ENESTnd поводом для прекращения лечения были отсутствие ответа на лечение, прогрессия заболевания или неконтролируемые токсические осложнения препарата.

В обоих исследованиях разрешалась редукция дозы препаратов и перерывы в лечении при развитии нежелательных явлений.

Как в одном, так и в другом исследовании проводился мониторинг показателей клинического, биохимического анализов крови, ЭХОКГ, ЭКГ, рентгенография органов грудной клетки для оценки безопасности терапии. Значимых отличий в схеме мониторирования не отмечалось.

Эффективность препаратов оценивалась на основании данных цитогенетического исследования костного мозга, которое проводилось каждые 3 месяца до достижения ПЦГО и далее каждые 12 месяцев в исследовании DASISION, а в исследовании ENESTnd — каждые 6 месяцев в течение первых 2 лет терапии в независимости от результатов терапии. Также для оценки эффективности терапии в обоих исследованиях проводился регулярный (каждые 3 месяца) количественный молекулярный мониторинг методом ПЦР в реальном времени.

Стратификация риска среди пациентов проводилась с использованием различных шкал: по шкале Sokal в исследовании ENESTnd и шкале Hasford в исследовании DASISION, при этом значимых различий в соотношениях по количеству пациентов в различных группах риска не отмечалось.

Эффективность новых ингибиторов тирозинкиназ в качестве первой линии терапии

Полный цитогенетический ответ.

При анализе показателей эффективности в исследовании ENESTnd выявлена значимо большая

Рисунок 1. Дизайн исследования DASISION: сравнительный анализ эффективности иматиниба и дазатиниба в качестве первой линии терапии

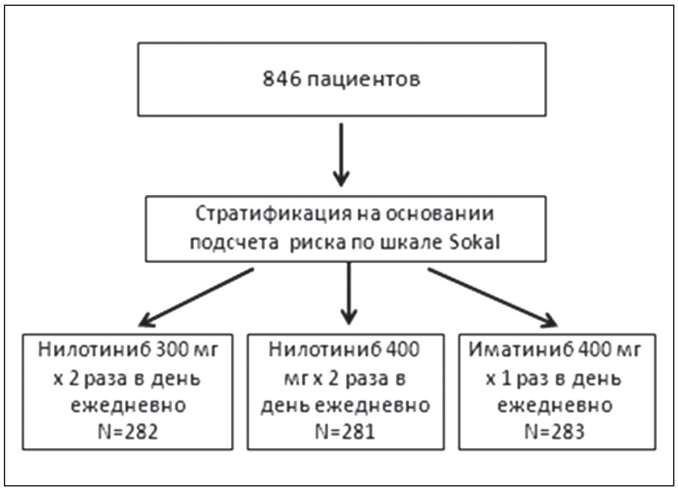


Рисунок 2. Дизайн исследования ENESTnd: сравнительный анализ эффективности иматиниба и нилотиниба в качестве первой линии тер

частота достижения ПЦГО к 12 месяцам (кумулятивная частота ПЦГО в течение 12 мес) при терапии нилотинибом по сравнению с иматинибом: 80 %, 78 % и 65 % при терапии нилотинибом 300 мг × 2 р/д, 400 мг × 2 р/д и иматинибом, соответственно ($p < 0.001$). При этом следует отметить, что у части пациентов к 6 мес (от 25 % до 26 % пациентов в группах) и 12 мес (от 12 % до 14 % пациентов в группах) цитогенетический анализ не был выполнен или был неинформативен. Данные пациенты были отнесены в группу с отсутствием ПЦГО. Однако, частота ПЦГО на нилотинибе была выше по сравнению с иматинибом и среди пациентов, которым цитогенетический анализ на 12 мес был выполнен и был информативен. В данной категории больных кумулятивная частота ПЦГО была 93 % (нилотиниб 300 мг 2 р/д), 93 % (нилотиниб 400 2 р/д) и 76 % (иматиниб 1 р/д). Такая же тенденция сохранялась при анализе результатов терапии среди пациентов с высокой группой риска по шкале Sokal — частота ПЦГО к 12 мес было 74 % (нилотиниб 300 мг 2 р/д), 63 % (нилотиниб 400 2 р/д) и 49 % (иматиниб 1 р/д). Т.о. нилотиниб в обеих дозах оказался эффективнее иматиниба по частоте достижения ПЦГО.

При анализе этого же показателя в исследовании DASISON было установлено, что кумулятивная частота подтвержденных случаев ПЦГО к 12 месяцам составила 77 % при терапии дазатинибом и 66 % при терапии иматинибом ($p = 0.007$). Преимущества дазатиниба (83 %) над иматинибом (72 %) сохранялось и при учете всех случаев ПЦГО (подтвержденных или неподтвержденных), полученных в течение 12 мес лечения .

В обоих исследованиях частота ПЦГО и к 6 мес терапии также была выше в группах пациентов, получающих новые ингибиторы тирозин-киназ по сравнению с иматинибом.

При более длительном наблюдении (медиана 18 мес.) достоверно сохранялось преимущество новых ИТК над иматинибом по частоте достижения ПЦГО. В исследовании ENESTnd частота всех случаев ПЦГО за время наблюдения в разных группах составила 85 % (нилотиниб 300мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом $p < 0,001$), 82 % (нилотиниб 400 мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом $p = 0,017$) и 74 % (иматиниб 400мг 1 р/д). В исследовании DASISION частота подтвержденных случаев ПЦГО к 18 мес лечения составила 78 % и 70 % ($p = 0,0366$) [13].

Высокая эффективность нилотиниба была показана еще в одном исследовании итальянской группы GIMEMA [14]. После 12 мес лечения препаратом в дозе 800 мг/д кумулятивная частота ПЦГО составила 96 %. Нерандомизированные исследования новых ИТК, проведенные в MD Anderson Cancer Centre, у пациентов, ранее не получающих терапию, также показали очень высокую эффективность нилотиниба [15] и дазатиниба [16].

Интересно, что эффективность новых ИТК в качестве первой линии превышает результаты терапии иматинибом не только в стандартных, но и в высоких дозах препарата. Так, частота достижения ПЦГО к 12 месяцам терапии на фоне применения иматиниба в исходной дозе 800 мг/сут составляла 66 %, что также ниже, чем результаты, полученные при терапии новыми ИТК [17].

Однако цитогенетическая ремиссия не защищает от рецидива, следовательно, даже стопроцентная вероятность достижения цитогенетической ремиссии не сильно приближает к проблеме излечения.

Большой молекулярный ответ:

В обоих исследованиях в разные сроки наблюдения частота БМО была выше при лечении новыми ИТК по сравнению с иматинибом. При этом, как ранее было отмечено, следует обратить внимание на разные способы подсчета БМО в течение первых 12 мес лечения. В исследовании ENESTnd учитывали БМО на 12 мес (регистрация случаев БМО только на этот срок лечения), а в исследовании DASISION к 12 мес (кумулятивная частота за это время терапии). В разные сроки лечения при оценке БМО в обоих исследованиях эффективность новых ИТК была достоверно выше по сравнению с иматинибом ($p < 0,0001$) (рис. 3). При более длительном

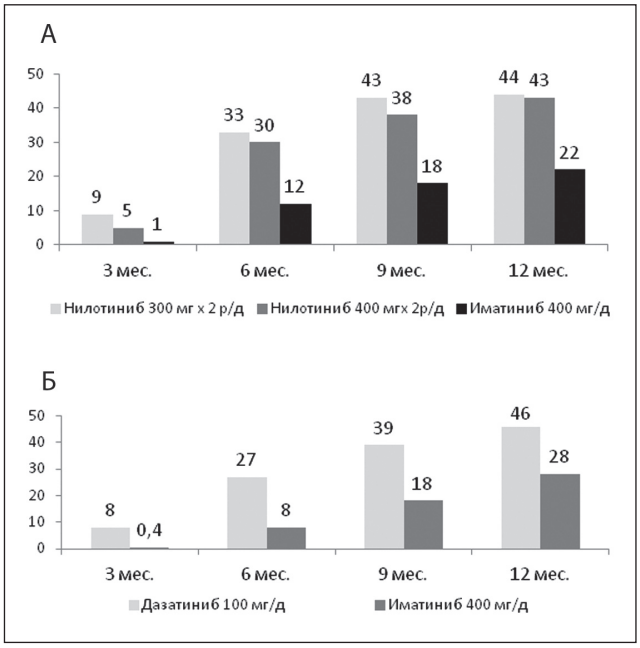


Рисунок 3. Динамика достижения БМО (% пациентов) в исследованиях ENESTnd (А) и DASISION (Б) в разных сроки терапии

наблюдении (медиана 18 мес) кумулятивная частота БМО в исследовании ENESTnd составила 66 % (нилотиниб 300 мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом p < 0,0001), 62 % (нилотиниб 400 мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом p < 0,0001) и 40 % (иматиниб 400 мг 1 р/д). Частота случаев ПМО (уровень транскрипта BCR-ABL ≤ 0,0032 % по интернациональной шкале) в исследовании также была выше при терапии нилотинибом 300 мг 2 р/д (21 %, p < 0,0001) и 400 мг 2 р/д (17 %, p < 0,0001) по сравнению с иматинибом (6 %).

В исследовании DASISION при медиане наблюдения 18 мес частота всех случаев БМО и ПМО (уровень транскрипта BCR-ABL ≤ 0,0032 % по интернациональной шкале) составила при терапии дазатинибом 57 % и 13 %, а при лечении иматинибом 41 % и 7 % соответственно (для БМО p = 0,0002).

Как уже говорилось, невозможно сравнивать результаты разных исследований, тем не менее, хотелось бы обратить внимание, что частота БМО и ПМО в группах больных, получающих терапию иматинибом в исследованиях ENESTnd и DASISION сравнима. При этом складывается впечатление о более высокой частоте БМО и ПМО при терапии нилотинибом 300 мг 2 д (66 % и 21 %) по сравнению с дазатинибом (57 % и 13 %).

Прогрессия в фазу акселерации и бластный криз

Информативные результаты были получены при оценке частоты прогрессии в фазу акселерации и бластный криз при сроке наблюдения 18 месяцев. При терапии иматинибом 400 мг/д частота прогрессий составила 4,2 % (12/283), 0,7 % (2/282) при дозировке нилотиниба 300 мг × 2 р/д (p = 0,0059) и 1,1 % (3/281) при дозировке нилотиниба 400 мг × 2 р/д (p = 0,0196). При терапии дазатинибом случаев трансформации в фазу акселерации и бластный криз также было немного (2,3 % (6/259)), однако этот показатель был сравним с группой иматиниба (3,5 % (9/260)). На срок 18 мес выживаемость без прогрессии в этих группах также существенно не отличалась и составила при терапии дазатинибом 94,9 %, а при лечении иматинибом — 93,7 % [18].

Достижение ПЦГО и БМО снижали риск трансформации в фазу акселерации и бластный криз. Так, в исследовании ENESTnd только у троих пациентов, достигших ПЦГО на фоне терапии иматинибом, впоследствии имела место прогрессия в фазу акселерации и бластный криз. Следует отметить, что ни у кого из пациентов, получавших нилотиниб с достижением ПЦГО, подобных явлений не отмечалось.

Важно отметить также, что после достижения большого молекулярного ответа ни один больной в обоих исследований не прогрессировал в фазы акселерации и бластного криза.

Таким образом, в обоих исследованиях при терапии новыми ИТК частота прогрессии была низкой. Однако, этот показатель был достоверно ниже только у больных, получавших нилотиниб. Вероятно, это объясняется достоверно более высокой частотой БМО и ПМО при применении нилотиниба по сравнению с иматинибом, а возможно и дазатинибом.

Общая выживаемость:

По результатам исследования ENESTnd вероятность общей выживаемости на 18 мес составила 98,5 % (нилотиниб 300 мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом p = 0,28), 99,3 % (нилотиниб 400 мг 2 р/д, по сравнению с иматинибом p = 0,03) и 96,9 % (иматиниб). При медиане наблюдения 18 мес в ходе исследования умерли всего 16/846 (1,9 %) пациентов. При этом от заболевания и от других причин погибли 2 и 3 в группе нилотиниба 300 мг 2 р/д, 1 и 1 в группе нилотиниба 400 мг 2 р/д, 8 и 1 в группе иматиниба. Причинами смерти, не связанными с заболеванием среди пациентов, получавших нилотиниб, были тонкокишечная непроходимость, суицид и рак желудка.

Частота общей выживаемости в исследовании DASISION на 18 мес наблюдения была 96 % в группе дазатиниба и 97,9 % в группе иматиниба. К сожалению нет данных о количестве случаев смерти и причин гибели пациентов в данном исследовании при медиане наблюдения 18 мес. Однако, при медиане наблюдения около 14 мес среди пациентов, получавших иматиниб, имел место 1 летальный исход, а среди пациентов в группе дазатиниба погибли 4 пациента.

Таким образом, увеличение выживаемости по сравнению с иматинибом было продемонстрировано только у больных, получавших нилотиниб в дозе 400 мг 2 р/д.

Токсичность новых ИТК в исследованиях ENESTnd и DASISION

Как известно для всех известных ингибиторов тирозин-киназ BCR-ABL белок не является единственной мишенью. Этим могут быть объяснены некоторые токсичности, возникающие на фоне терапии дазатинибом и нилотинибом.

Гематологическая токсичность

Исследователями группы ENESTnd была выявлена сопоставимая гематологическая токсичность нилотиниба в различных дозировках: частота нейтропений и тромбоцитопений тяжелых степени не превышала 12 % как при дозировке 300 мг × 2 р/д

Таблица 1

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ИТК В ИССЛЕДОВАНИЯХ ENESTND И DASISION

	Нилотиниб 300 мг × 2 р/д (ENESTnd)		**Нилотиниб 400 мг × 2 р/д (ENESTnd)**		**Иматиниб 400 мг/сут (ENESTnd/DASISION)**		**Дазатиниб 100 мг × 1 р/д (DASISION)**	
	Все степени	**¾ степень**	**Все с тепени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**
	% пациентов							
Нейтро-пения	43	12	38	10	68/58	20/20	65	21
Тромбо-цито-пения	48	10	49	12	56/62	9/10	70	19
Анемия	38	3	38	3	47/84	5/7	90	10

Таблица 2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ НЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ

	Нилотиниб 300 мг × 2 р/д (ENESTnd)		**Нилотиниб 400 мг × 2 р/д (ENESTnd)**		**Иматиниб 400 мг/сут (ENESTnd/DASISION)**		**Дазатиниб 100 мг × 1 р/д (DASISION)**	
	Все степени	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**
	% пациентов							
Сыпь	31	< 1	36	3	11/17	1/1	11	0
Диарея	8	1	6	0	21/17	1/1	17	< 1
Тошнота	11	< 1	19	1	31/20	0/0	8	0
Рвота	5	0	9	1	14/10	0/0	5	0
Миалгия	10	< 1	10	0	10/12	0/0	6	0
Плевральные выпоты	< 1	< 1	0	0	0/0	0/0	10	0
Поверхностные отеки	7	0	8	< 1	39/36	< 1/< 1	9	0
Исключение из исследования по причине токсичности	5		9		7/4		5	

Таблица 3

НЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ИТК (ИЗМЕНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ)

	Нилотиниб 300 мг × 2 р/д (ENESTnd)		**Нилотиниб 400 мг × 2 р/д (ENESTnd)**		**Иматиниб 400 мг/сут (ENESTnd/ DASISION)**		**Дасатиниб 100 мг × 1 р/д (DASISION)**	
	Все степени	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**	**Все степени**	**¾ степень**
	% пациентов							
Гипербилирубинемия	53	4	62	8	10/НД	< 1/НД	Нет данных	
Гипофосфатемия	32	5	34	5	45/НД	8/НД		
Гипергликемия	36	6	41	4	20/НД	0/НД		
Повышение липазы	24	6	29	6	11/НД	3/НД		
Повышение креатинина	5	0	5	0	13/НД	< 1/НД		
Повышение АЛТ	66	4	73	9	20/НД	2/НД		

так и 400 мг × 2 р/д. При сравнении токсичности нилотиниба и иматиниба имела место несколько большая частота цитопений, в особенности нейтропений (в том числе тяжелых степеней), при терапии иматинибом. Следует отметить, что терапия нилотинибом приводила к меньшей гематологической токсичности по сравнению с терапией гливеком, особенно в плане нейтропений.

В то же время по результатам исследования DASISION наоборот несколько большая частота цитопений наблюдалась в группе пациентов, получающих дазатиниб (табл. 1). Если учесть, что токсичность иматиниба в двух этих исследованиях сопоставима (за исключением анемий всех степеней), то представляется, что терапия нилотинибом по сравнению с дазатинибом реже приводит к цитопениям, как это показано при использовании этих препаратов в качестве второй линии терапии у больных с непереносимостью или токсичностью иматиниба [19].

Негематологическая токсичность

Наиболее частые негематологические осложнения на фоне терапии ИТК в этих исследованиях указаны в таблице 2.

При оценке отечного синдрома значимо меньшая частота отмечалась при терапии нилотинибом по сравнению с иматинибом. Так, например, частота развития периферических отеков при терапии нилотинибом по 300 мг × 2 р/д и 400 мг × 2 р/д — 5 %, а при терапии иматинибом — 14 %, при этом следует отметить, что отечного синдрома тяжелой степени не отмечалось ни в одной из групп пациентов.

Как и следовало ожидать, при сравнении частоты выявления плевральных выпотов значительно чаще это осложнение встречалось при терапии дазатинибом — у 10 % пациентов, в то время как у пациентов, получавших иматиниб, данное осложнение не зарегистрировано. По результатам исследования ENESTnd при терапии иматинибом и нилотинибом 400 мг × 2 р/д плевральные выпоты зарегистрированы не были, а при терапии нилотинибом 300 мг × 2 р/д их количество было незначимо (< 1 %) [20].

В обоих исследованиях проводился тщательный мониторинг электрокардиограммы пациентов. По данным исследования DASISION по одному пациенту в каждой группе (0,4 %) имели увеличение корригированного интервала QT более 500 мсек. При этом среднее увеличение интервала QT у пациентов, получавших дазатиниб, составило 3 мсек, а при терапии иматинибом — 8,2 мсек. По данным исследования ENESTnd: увеличения интервала QT более 500 мсек ни у кого из пациентов не отмечалось.

Таким образом, из таблицы 2 видно, что токсичность иматиниба в обоих исследованиях была сопоставима между собой, однако при терапии нилотинибом имело место меньшее количество значимых осложнений, таких как плевральные выпоты, диарея, отечный синдром.

Однако, обращают на себя внимание выявленные побочные эффекты, неврологического характера, которые ранее не описывались в работах, посвященных дазатинибу: у 31 % пациентов была выявлена периферическая полинейропатия, причем у 5 % из них, она достигала 3 степени, а 19 % пациентов отмечали нарушения памяти (из них 5 % тяжелых степеней), причем данные явления регрессировали после перерыва или снижения дозы дазатиниба, что подтверждает связь осложнений с препаратом.

При описании результатов исследования DASISION, к сожалению, не представлены данные по изменению лабораторных показателей в ходе терапии, поэтому невозможно сравнить показатели токсичности нилотиниба и дазатиниба. Что касается токсичности нилотиниба, то, как и при терапии пациентов во второй линии, имела место большая частота бессимптомного повышения уровня липазы, частота гипергликемий (по сравнению с иматинибом) (табл. 3).

Модификация доз и прекращение терапии ИТК из-за осложнений

За время терапии средняя ежедневная доза иматиниба составляла 400 мг/сут как в одном, так и в другом исследовании, доза дазатиниба — 99 мг/сут, нилотиниба — 592 мг/сут и 779 мг/сут в ветках 300 мг × 2 р/д и 400 мг × 2 р/д, соответственно. При медиане наблюдения 18 мес в исследовании ENESTnd терапию из-за токсичности прекратили 9 % больных, получающих иматиниб, 7 % и 12 % пациентов в группах нилотиниба 300 мг и 400 мг 2 р/д соответственно.

При таком же сроке наблюдения в исследовании DASISION из-за осложнений, связанных с терапией, лечение было прекращено у 6 % и 4 % пациентов в группах дазатиниба и иматиниба соответственно. При этом цитопения была причиной прекращения терапии дазатинибом у 6 (2,3 %) и иматинибом у 3 (1,2 %) пациентов. Вероятно, это отражает меньшую миелосупрессивную активность иматиниба (возможно и нилотиниба) по сравнению с дазатинибом.

Заключение

Приведенные результаты исследований показывают высокую эффективность новых ИТК в терапии

хронического миелолейкоза в качестве первой линии. Как нилотиниб, так и дазатиниб превосходят иматиниб по частоте достижения цитогенетического и молекулярного ответов. Случаев прогрессии заболевания и гибели пациентов от ХМЛ меньше в группе пациентов, получающих нилотиниб по сравнению с иматинибом. Превосходство дазатиниба над иматинибом не выявлено.

Первые результаты вышеприведенных исследований дают надежду, что с использованием новых ИТК, в качестве первой линии терапии, врачи-гематологи реже будут сталкиваться с прогрессией ХМЛ. Учитывая более высокую частоту молекулярных ремиссий на фоне новых ИТК, есть надежда, что возрастет шанс пациентов и на полное излечение от заболевания. В процессе терапии тем или иным ИТК следует осуществлять четкое наблюдение за пациентом и своевременно обращать внимание на те, или иные изменения (объективные, лабораторные, инструментальные). Комплексный индивидуальный подход к каждому пациенту является залогом успеха терапии ИТК 2 линии.

Литература

1. *Calabretta B. et al.* The biology of CML blast crisis // Blood. — 2004. — Vol. 103, № 11. — P. 22.

2. *Deininger M. et al.* International randomized study of interferon vs STI571 8 year follow-up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with imatinib // Blood. — 2009. — Vol.: 114. — P. 462.

3. *Kantarjian H.M. et al.* Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase // Cancer. — Vol. 116, № 6. — P. 1419.

4. *Nikolas von Bubnoff.* Chronic Myelogenous Leukemia //Treatment and Monitoring.

5. *Ibrahim A.R. et al.* Efficacy of tyrosine kinase inhibitors (TKI) as third line therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase who have failed two prior TKI // Blood. — 2010.

6. *O'Hare et al.* Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia // Blood. — 2007. — Vol. 110, № 7. — P. 2242–2249.

7. *Abdulkadyrov K., Lomaia E., Zaritskey A.* Survival, cytogenetic, molecular responses in chronic myeloid leukemia chronic phase patients treated by imatinib: 9-year follow-up data from population St-Petersburg and Leningrad region database // Haematologica. — 2010. — Vol. 1319. — P. 535.

8. *Mahon et al.* Blood (ASH annual meeting abstracts). — 2008. — Vol. 187. — P. 112.

9. *O. Waller C.F.* Imatinib mesylate // Recent Results Cancer Res. — 2010. — Vol. 184, № 3.

10. *Brave M.,Goodman V., Kaminskas E. et al.* Sprycel for Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome PositiveAcute Lymphoblastic Leukemia // Clin Cancer Res. — 2008. — Vol. 14, № 2.

11. *O'Hare T., Walters D.K., Stoffregen E.P., et al.* Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib // Clin. Cancer Res. — 2005. — Vol. 11. P. 6987–6993.

12. *Garland1 P.* Apperley Nilotinib: evaluation and analysis of its role in chronic myeloid leukemia // Future Oncol. — 2011. — Vol. 7, № 2. — P. 201–218.

13. *Shah N., Kantarjian H., Hochhaus A. et al.* Dasatinib vs Imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) in the DASASION trial: 18 month follow-up // Blood. — Vol. 116, № 19. — P. 94–95.

14. *Rosti G et al.* Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 24. — P. 4933–4938.

15. *Cortes J.E. et al.* Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 3. — P. 392.

16. *Cortes J.E. et al.* Results of Dasatinib Therapy in PatientsWith Early Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 3. — P. 398–404.

17. *Cortes J., Baccarani M., Guilhot F., et al.* A phase III, randomized, open-label study of 400 mg versus 800 mg of imatinib mesylate (IM) in patients (pts) with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase (CMLCP) using molecular endpoints: 1-year results of TOPS (Tyrosine Kinase Inhibitor optimization and Selectivity) study // Blood. — 2008. — Vol. 112. — P. 335.

18. *Hughes T. et al.* ENESTnd Update: Continued Superiority of Nilotinib Versus Imatinib In Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia In Chronic Phase (CML-CP) // ASH. — 2010. — P. 207.

19. *Kantarjian H. et al.* Update on imatinib resistant chronic myeloid leukemia patients in chronic phase on nilotinib therapy at 24 months: clinical response, safety, and long-term outcomes // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 22, P. 1129.

20. *Saglio G., et al.* Nilotinib demonstrates superior efficacy compared with imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the international randomized phase III ENESTnd trial. Abstract LBA-1 // Presented at the 51st ASH Annual Meeting and Exposition; December 5–8, 2009, New Orleans, Louisiana.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ ЛИГАНДОВ NOTCH В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ НА ЭКСПАНСИЮ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК IN VITRO

С.В. Жук, А.Ю. Зарицкий, Д.В. Моторин, П.А. Бутылин

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Жук Сергей Владимирович — научный сотрудник НИЛ трансфузиологии и эфферентной терапии; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — профессор, доктор медицинских наук, директор Института гематологии; *Моторин Дмитрий Васильевич* — кандидат медицинских наук, научный сотрудник НИЛ онкогематологии; *Бутылин Павел Андреевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ онкогематологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца,крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: s.v.zhuk@gmail.com (Жук Сергей Владимирович).

Резюме

Изучение экспансии гематопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови ex vivo является актуальной темой для исследований, так как в перспективе позволит получать большое количество доступного клеточного материала, пригодного для восстановления гемопоэза после миелоаблативной терапии. Целью работы является изучение влияния лигандов Notch, экспрессирующихся в клетках стромы на экспансию ГСК пуповинной крови. **Материалы и методы.** Мезенхимные стволовые клетки из ткани пупочного канатика (МСК-ПК) были трансдуцированы генами DLL1 и JAG1. CD34+ клетки, выделенных из пуповинной крови, культивировали совместно с МСК, экспрессирующими лиганды, через две недели был проведен фенотипический анализ популяции клеток, находившихся в суспензионной фракции. **Результаты**. МСК-ПК экспрессирующие лиганды DLL1 увеличивали количество суспензионных CD34+ клеток в 5,7 раз по сравнению с культурой без МСК и в 2,8 раза по сравнению с контрольными МСК-ПК. **Выводы.** Совместное культивирование ГСК и МСК, трансдуцированных геном DLL1, увеличивало экспансию малодифференцированной CD34+ фракции клеток.

Ключевые слова: ex vivo экспансия гемотопоэтических стволовых клеток, CD34, DLL1, лентивирусная трансдукция, мезенхимные стволовые клетки.

NOTCH LIGAND EXPRESSION IN STROMAL CELLS STIMULATES EXPANSION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN VITRO

S.V. Zhuk, A.Yu. Zaritskey, D.V. Motorin, P.A. Butylin

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: s.v.zhuk@gmail.com (Sergey V. Zhuk — staff scientist, Insitute of Hematology).

Abstract

Studying of cord blood hematopoietic stem cell (UC-HSC) ex vivo expansion is an important research area because it can potentially lead to acquisition of large numbers of stem cells capable of successful engraftment and hematopoiesis reconstitution after myeloablative therapy. **Objectives.** Here we study the influence of Notch ligand expression in stromal cells on the expansion of HSC. **Design and methods.** Mesenchymal stem cells from umbilical cord (UC-MSC) were transduced with DLL1 and JAG1. CD34+ cells from cord blood mononuclear fraction were cultured with ligand-expressing MSC. After two weeks phenotype of cells in suspension was analyzed. **Results.** UC-MSC with expression of DLL1 provided 5.7-fold increase of CD34+ cells in suspension

fraction compared to cytokines alone conditions and 2.8-fold compared to UC-MSC. **Conclusions.** Coculture of HSC and DLL1 expressing MSC leads to expansion of undifferentiated CD34+ fraction of hematopoietic stem cells.

Key words: hematopoietic stem cell ex vivo expansion, CD34, DLL1, lentiviral transduction, umbilical cord mesenchymal stem cells.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 20.10.2012.

Список сокращений

МСК — мезенхимные стволовые клетки
МСК-ПК — мезенхимные стволовые клетки из пуповинного канатика
ГСК — гематопоэтические стволовые клетки
РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина»

Введение

Трансплантация ГСК является наиболее распространенным типом терапии стволовыми клетками [13]. В качестве источника стволовых клеток могут выступать костный мозг, периферическая кровь и пуповинная кровь [14]. В 1959 г. Tomas впервые описал случай лечения острого лейкоза путем аллогенной трансплантации костного мозга. Открытие антигенов основного комплекса гистосовместимости (HLA) позволило лучше понять подбор доноров ГСК и причины неудач при трансплантации.

Оптимальным аллогенным донором для трансплантации ГСК является сиблинг больного, совпадающий по HLA системе. В случае, если среди членов семьи нет HLA-идентичного донора, то трансплантацию ГСК можно выполнить с использованием костного мозга неродственного донора, совместимого по HLA. Поиск подходящего донора костного мозга — дорогой и длительный путь, и иногда пациент не доживает до трансплантации. Вероятность того, что для пациентов, принадлежащих к этническим меньшинствам, найдется HLA-идентичный неродственный донор, может быть еще меньше, поскольку встречаемость определенных HLA-типов в различных этнических группах значительно варьирует.

Эффективность трансплантации во многом зависит от достаточного количества ГСК. Большая часть трансплантаций ГСК пуповинной крови приходится на детей и взрослых с низкой массой тела [4], из-за проблемы ограниченного объема доступной пуповинной крови, и как следствие ограниченного содержания в ней ГСК необходимых для трансплантации [2, 3]. Тем не менее, пуповинная кровь обладает рядом преимуществ по сравнению с препаратом костного мозга донора: пониженная вероятностью развития РТПХ даже при наличии различий в HLA [1], возможностью хранения донорского материала длительное время, низкой вероятностью содержания латентной вирусной инфекции (случаев CMV < 1% в США). Метод экспансии ГСК может позволить улучшить результаты приживления при трансплантации препаратов пуповинной крови.

Существует множество статей, описывающих протоколы экспансии ГСК ex vivo, тем не менее, только единичные протоколы доходят до клинических испытаний. Большинство методов основывается на применении различных комбинаций цитокинов и ростовых факторов (SCF, TPO, FLT-3L, G-CSF, IL-3, IL-6, EPO), стимулирующих экспансию; также можно выделить методы, связанные с использованием лигандов сигнального пути Notch, мезенхимных стволовых клеток или химических соединений (хелаты меди, простагландины, никотинамид, CD26/DPPIV ингибиторы) [11]. Каждый из методов имеет ряд недостатков, затрудняющих его применению на практике. Например, не известна оптимальная концентрация цитокинов для клеточных сред, а использование лигандов или МСК требует значительных финансовых затрат и технической оптимизации. Тем не менее, пуповинная кровь является доступным источником ГСК, кроме того, в случае ее применения реже происходит развитие РТПХ по сравнению с костномозговыми трансплантатами, поэтому исследования по экспансии ГСК из пуповинной крови активно ведутся по всему миру.

На данный момент стало очевидно, что для успешного восстановления гемопоэза необходимы клетки, находящиеся в недифференцированном или малодифференцированном состоянии (так называемые «long-term» ГСК), которые могли бы дифференцироваться во все типы клеток крови, но также нужны популяции ГСК, обеспечивающие быстрое восстановление клеток миелоидного ряда и препятствующие развитию у пациентов нейтропении. Восстановление после миелоаблации и поддержание LT-ГСК в недифференцированном состоянии, по сути, являются противоположными физиологическими процессами, тем не менее, существуют работы, демонстрирующие возможность

увеличения количества и тех, и других популяций клеток [5, 6]. Использование комбинации донорского материала, частично прошедшего ex vivo экспансию и части, не подвергавшейся никаким воздействиям, показывает наилучший результат в клинических испытаниях [6, 12].

Сигнальный путь Notch является крайне консервативным механизмом передачи сигнала между контактирующими клетками. Одна из взаимодействующих клеток несет на поверхности мембраны лиганд (у человека DLL 1,3,4 или JAG1, 2), другая — мембранный рецептор (NOTCH 1–4). При непосредственном контакте двух клеток лиганд связывается с рецептором, в результате чего рецептор претерпевает конформационные изменения и у него открываются сайты для специфического протеазного расщепления. Результатом нескольких последовательных расщеплений является высвобождение внутриклеточного домена рецептора, который является компонентом сложного комплекса транскрипционных факторов. Транспортировка внутриклеточного домена в ядро активирует комплекс Maml/CSL и запускает экспрессию генов [7]. На ГСК с фенотипом $CD34^+$ и CD34+/Lin- обнаружены рецепторы Notch1, что говорит о возможности регуляции гемопоэтических клеток стромальным окружением путем передачи сигнала через Notch-лиганды. В одной из работ было показано, что трансдукция мышиных $Lin^-Sca\text{-}1^+c\text{-}kit^+$ ГСК внутриклеточным доменом рецептора приводит к получению культур, обладающих повышенной способностью к самообновлению, но при этом способных реагировать на цитокиновые сигналы и дифференцироваться в клетки лимфоидного и миелоидного ряда при трансплантации в мышь идентичной линии [8]. В другой работе было показано, что иммобилизованный внеклеточный фрагмент DLL1 не только увеличивает количество CD34+ клеток в культуре, но и сокращает период миелоаблации после введения трансплантата, частично состоящего из таких клеток [6]. В своей работе мы использовали МСК из «Вартонова студня» пуповинного канатика новорожденного, в качестве стромальных клеток, так как по литературным данным этот тип клеток экспрессирует многие маркеры костномозговых МСК (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, и HLA-A) и способен эффективно поддерживать экспансию LT-ГСК ex vivo [9] и при этом обладает высоким потенциалом деления.

Целью данной работы является изучение влияния экспрессии лигандов Notch в мезенхимных стволовых клетках на экспансию ГСК пуповинной крови.

Материалы и методы

1. Клеточные культуры .

CD34+ клетки выделяли из пуповинной крови здоровых доноров, полученной в Перинатальном центре ФГБУ «ФЦСКЭ им.Алмазова» после подписания информированного согласия. Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) и подвергали сортировке по CD34 маркеру методом магнитной сепарации (CD34 Multisort kit, MACS Mylteniy Biotec). Полученные клетки ресуспендировали в среде StemSpan SFEM содержащей 100нг/мл SCF, 100нг/мл FLT-3L, 50нг/мл TPO и 30нг/мл IL6 (все цитокины от R&D Systems, США).

Для получения МСК из пуповины здорового новорожденного удаляли артерии и вены, после чего разрезали на мелкие фрагменты и инкубировали в растворе коллагеназы I типа (Worthington, США) в течение 3 часов при 37°C, после чего отмывали от коллагеназы и разводили в среде для культивирования МСК перед помещением в культуральные флаконы. Через 24 часа отбирали среду, промывали фосфатно-солевым буфером и добавляли свежую среду. Среду меняли каждые три дня. В экспериментах использовались МСК до 4 пассажа.

2. Клонирование DLL1 и JAG1.

Для создания лентивирусных векторов использовали плазмиды LeGO-iG2 (любезно предоставленую K.Weber, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Гамбург, Германия и pLVTHM-T7 (полученную от А.Н.Томилина, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). В качестве источников кДНК лигандов DLL1, JAG1 использовались плазмиды, предоставленные K.Hozumi (Kyoto University, Япония). Для клонирования генов DLL1 и JAG1 использовались праймеры с сайтами для рестриктаз BamHI и EcoRI. Последовательности праймеров приведены в табл. Векторы с DLL1 и JAG1 создали путем лигирования ПЦР продукта и векторов, предварительно обработанных смесью рестриктаз. Проверку плазмид осуществляли рестрикционным анализом и с последующим секвенированием. В результате клонирования экспрессия генов оказывались под контролем промоторов EF1-alpha (pLVTHM вектор) или SFFV (LeGO-iG2 вектор), что обеспечивало их стабильную экспрессию даже спустя 3 недели с момента трансдукции вирусом.

3. Производство лентивирусных частиц и трансдукция МСК.

Для создания вируса использовали пакующую систему второго поколения, состоящую из

Таблица

Обозначение	Последовательность
clon_hJAG1_bamh_F	5’-ATAGGATCCCAGCGATGCGTTCCCCAC-3’
clon_hJAG1_ecor_R	5’-TTAGAATTCGCGGTCTGCTATACGATGTA-3'
cl_hDLL1_bamh1_F	5’-ATAGGATCCGCGAAGCAGCATGGGCAGTC-3'
cl_hDLL1_ecor1_R	5’-TTAGAATTCGAAAAGACTGGCTCATAAGAA-3’
JAG1_F	5'-ACACCGTTCAACCTGACAGT-3’
JAG1_R	5’-CAGCCAAAGCCATAGTAGTAG-3’
DLL1_F	5’-TGACCTCGCAACAGAAAAC-3’
DLL1_R	5’-CAGCCCTCTCCGTAGTAGT-3’
GAPDH_F	5’-CCACATCGCTCAGACACCAT-3’
GAPDH_R	5’-CCAGGCGCCCAATACG-3’

psPAX2 и pMD2.G(предоставленную D.Trono, École polytechnique fédérale de Lausanne, Швейцария). pMD2.G кодирует VSV-G белок вируса везикулярного стоматита, нахождение которого в составе вирусной оболочки обеспечивает высокую эффективность заражения различных типов клеток

Производство лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK293. Клетки рассеивали в концентрации 2,5–3,0 × 10^6 клеток на 10 см чашку в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина и 20мкг/мл гентамицина. На следующий день среду меняли на 9мл свежей с добавлением 25мкм хлорохина. Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом; смесь плазмид (из расчета 15 мкг вектора с трансгеном, 9,35 мкг psPAX2 и 5,32 мкг pMD2.G на одну чашку) ресуспендировали в Tris-EDTA буфере, содержащем CaCl2, и добавляли к 2X HEPES буферу. Через 15 минут образовавшиеся комплексы ДНК и фосфатов кальция добавляли к клеткам. Через 16 часов клеткам меняли среду, после чего каждые 24 часа с чашек собирали супернатанты, содержащие вирусные частицы. Концентрирование вирусных частиц осуществляли ультрацентрифугированием на сахарозной подложке в течение 2 часов при 72.000 g и 4 ^{0}C. Полученный осадок вирусных частиц ресуспендировали в DMEM и хранили на -80 ^{0}C. Измерение количества трансдукционных единиц осуществлялось по серийному разведению растворов с лентивирусами и последующему заражением известного количества HEK293 клеток. Через 72 часа, методом проточной цитометрии, измерялся процент клеток, экспрессирующих eGFP. Все эксперименты по трансдукции МСК проводились в условиях МЗ = 10 (множественности заражения). Для увеличения эффективности трансдукции в среду, содержащую вирус добавляли полибрен (гексадиметрина бромид) до 8 мкг/мл.

4. Совместное культивирование гематопоэтических стволовых клеток и пуповинных мезенхимных стволовых клеток.

МСК-ПК рассеивали в 24-луночные платы в концентрации 5 × 10^4 клеток на лунку. Как только клетки достигали состояния 100 % конфлюентности их обрабатывали 4мкг/мл митомицина С (Sigma-Aldrich) в течение 2 часов, после этого клетки 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером. На следующий день среду убирали и добавляли 1мл StemSpan SFEM с цитокинами, содержавшую 2–3 × 10^4 CD34+ ГСК из пуповинной крови. Каждые два дня с момента начала совместного культивирования половину суспензионной фракции отбирали для анализа и добавляли равный объем свежей среды с цитокинами.

5. Количественная ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии генов в популяциях МСК проводили в день добавления к ним суспензии ГСК. Для этого часть клеток лизировали (TriReagent, Sigma-Aldrich), выделяли РНК в соответствии с рекомендациями производителя, проводили обратную ПЦР (MMLV RT kit, Евроген, Россия) и измеряли экспрессию генов DLL1, JAG1 и GAPDH (последовательности праймеров представлены с табл.). ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора нуклеиновых кислот 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), используя технологию SybrGreen по следующей схеме: 5 мин 95º, затем 40 циклов, включающих 30 с 95 ºС, 30с с 60 ^{0}C и 30 с 72 ºС. Температура отжига всех праймеров праймеров составляла 60 ºС. Уровень экспрессии каждого из генов нормализовали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства», кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) по методу ΔΔCt.

6. Проточная цитометрия.

Данные проточной цитометрии были получены на Guava EasyCyte 8 (EMD Millipore, США). Клетки суспензионной фракции собирали через каждые два

дня, фиксировали в 1 % ПФА и хранили до проведения анализа. Для окраски клеток использовались моноклональные антитела, коньюгированные с флюорохромами: CD34-PE и CD45-FITC (Dako, Agilent Technologies), CD38-PC5 (Beckman Coulter). Окраска проводилась в соответствии с рекомендациями производителей.

Результаты

1. Получение МСК-ПК с экспрессией лигандов NOTCH.

На первом этапе были получены бицистронные лентивирусные векторные плазмиды, несущие лиганды DLL1 или JAG1 и экспрессирующие eGFP. За счет наличия в интегрирующейся части плазмиды гена eGFP оценка эффективности трансдукции была проведена методом проточной цитометрии. После обработки лентивирусом более 90 % клеток экспрессировали трансген по результатам проточной цитометрии (рис. 4). Экспрессия трансгенов также была подтверждена методом real-time qPCR. При сравнении с контрольными группами МСК-ПК, трансдуцированные клетки демонстрировали статистически значимое увеличение экспрессии DLL1 и JAG1 в 27 и 208 раз соответственно (рис. 3). Внедрение трансгенов приводило к снижению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на 20–40 % среди популяции МСК-ПК, что, возможно, является следствием токсичности концентрированных вирусных супернатантов (рис. 5). К сожалению, не удалось подобрать условия, при которых достигалась бы высокая (более 90 %) эффективность трансдукции, но не наблюдалось бы снижения пролиферативной

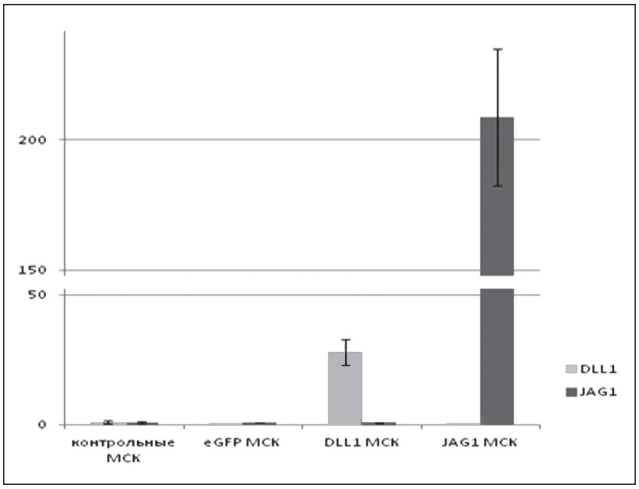


Рисунок 3. Изменение уровней экспрессии генов DLL1 и JAG1 после лентивирусной трансдукции. За единицу приняты уровни экспрессии в контрольных клетках. Измерения проведены методом ПЦР в реальном времени

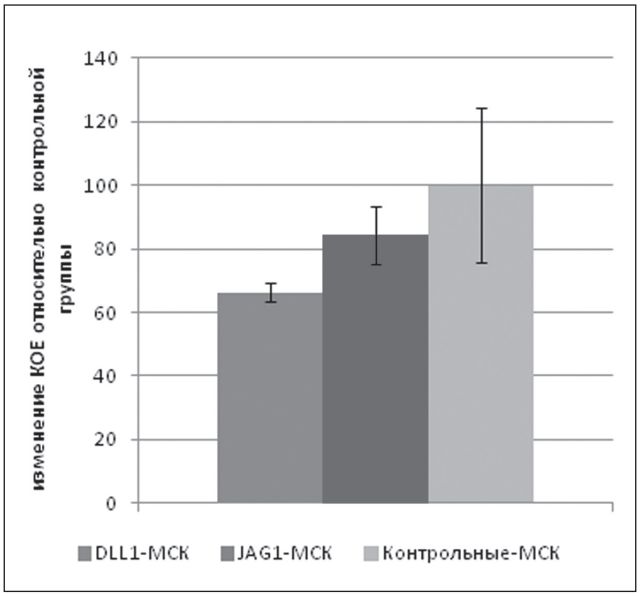


Рисунок 5. Изменение количества КОЕ (колониеобразующих единиц) после трансдукции лентивирусами. Приведенные данные нормализованы по контрольным МСК

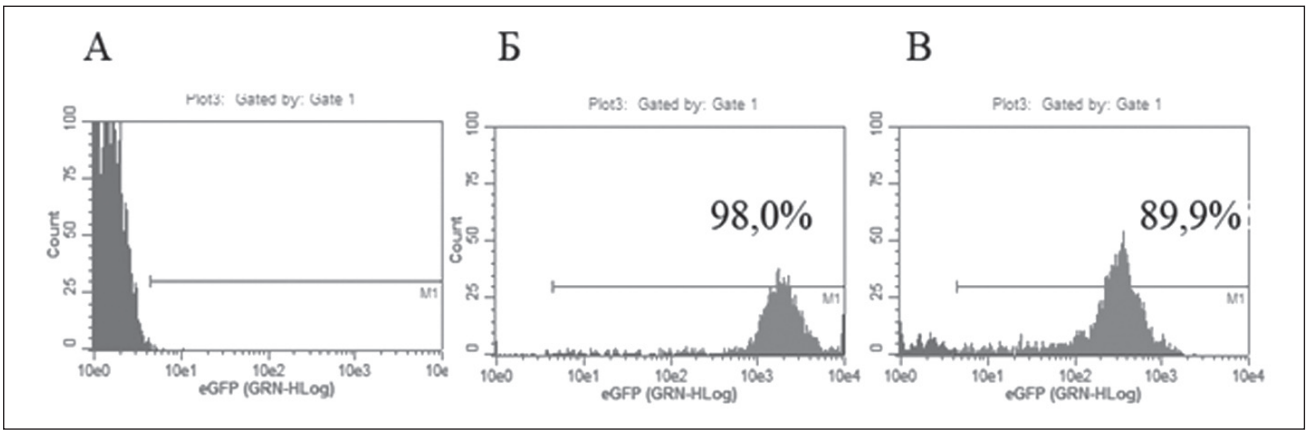


Рисунок 4. Оценка эффективности трансдукции МСК вирусами, несущими DLL1 и JAG1. Оценка осуществлялась по измерению eGFP, находящемуся в векторной плазмиде

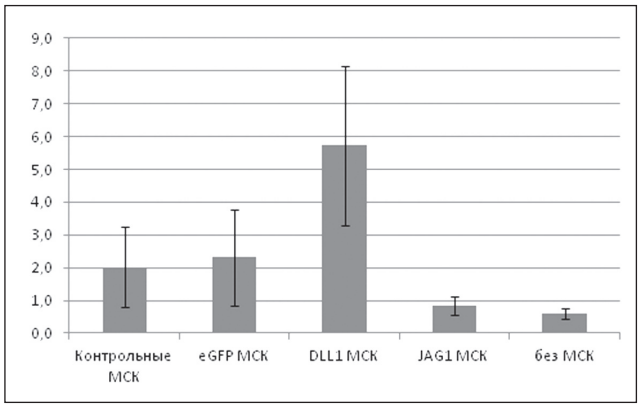


Рисунок 7. Изменение количества CD34+ клеток (разы) после двух недель культивирования на различных типах МСК. За единицу принята исходная концентрация CD34+ клеток, измеренная в начале эксперимента

активности клеток. Тем не менее, использование полибрена позволило повысить эффективность трансдукций, а использование сахарозной подложки при ультрацентрифугировании снизило осаждение токсичных для клеток компонентов среды.

2. Анализ экспансии клеток пуповинной крови при сокультивировании с клетками, экспрессирующими лиганды NOTCH.

Известно, что культивирование ГСК in vitro снижает количество недифференцированных клеток. При использовании только среды с цитокинами наблюдалось снижение количества CD34+ клеток почти в 2 раза (на 40 % от исходного количества). Тенденция к снижению также наблюдалась при использовании JAG1-МСК (на 10 %). Однако при использовании контрольных МСК или DLL1-МСК количество CD34+ клеток в суспензионной фракции увеличивалось в 2,0 и в 5,7 раз соответственно. Данные по трем независимым экспериментам представлены на рис.7. В экспериментах использовались ГСК от разных доноров, процент позитивных по CD34 клеток после магнитной сепарации составлял от 35 до 90 %. После двух недель культивирования при использовании всех типов МСК происходило увеличение общего количества клеток в культуре и количества CD34-позитивных клеток. При оценке влияния МСК на на общую экспансию наиболее эффективными оказались контрольные МСК (рис. 2), которые в 3,9 раз увеличивали количество всех клеток в суспензионной культуре по сравнению со средой StemSpan с цитокинами, но без фидерного слоя. Клетки DLL1-МСК в 7,3 раза эффективнее увеличивали количество CD34-позитивных клеток по сравнению с опытами без МСК (рис. 1). Иммунофенотипический анализ показал, что экспрессия лиганда DLL1 увеличивает количество CD34+CD38- клеток, которые считаются менее дифференцированными, чем CD34+CD38+ клетки, по сравнению с другими типами МСК (рис. 6).

Обсуждение

При экспансии ГСК ex vivo клетки перестают получать молекулярные сигналы костномозговой ниши. Добавление цитокинов и ростовых факторов

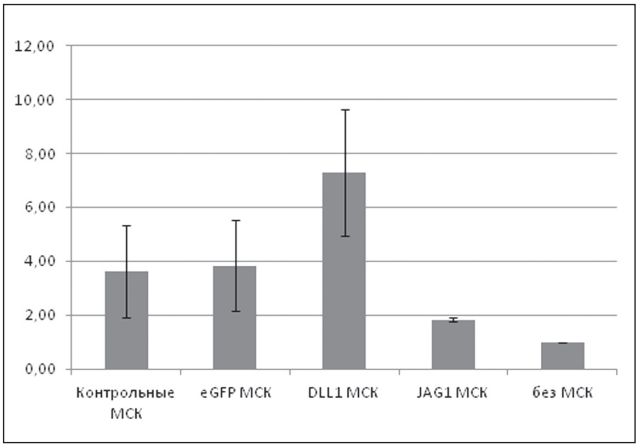


Рисунок 1. Изменение количества CD34+ клеток после 2 недель ex vivo экспансии в различных условиях, нормализованные по контрольным группам (без МСК). Измерения осуществлялись методом проточной цитометрии. Данные п риведены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. За единицу принято изменение количества CD34+ клеток при культивировании в среде с цитокинами

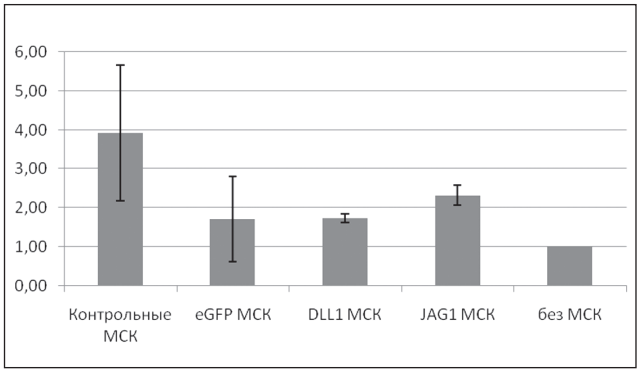


Рисунок 2. Изменение количества общего количества клеток после 2 недель экспансии в различных условиях, нормализованные по контрольным группам (без МСК). Подсчет клеток осуществлялся с использованием проточного цитометра. Данные приведены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. За единицу принято изменение количества CD34+ клеток при культивировании в среде с цитокинами

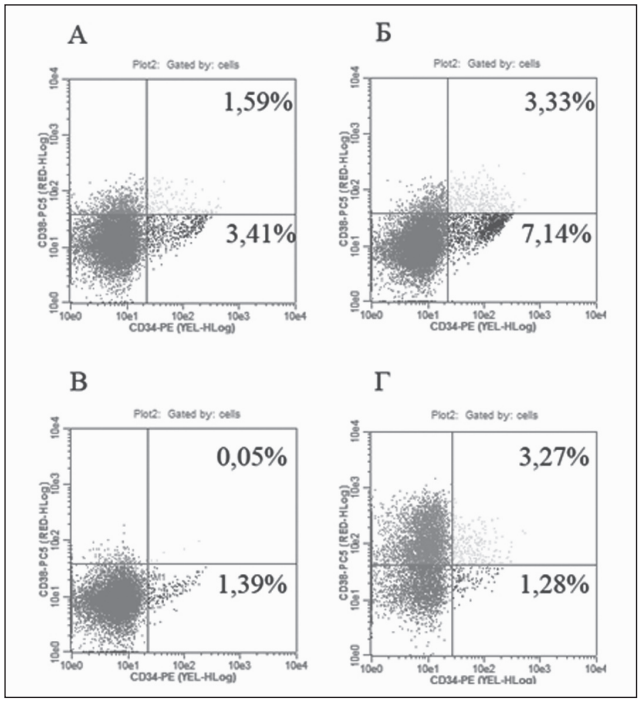


Рисунок 6. Фенотипический анализ клеток в суспензии после 2 недель культивирования с различными типами МСК или без подложки

не способно в полной мере смоделировать сложное взаимодействие между стромальной клеткой и гематопоэтической, поэтому наблюдается дифференцировка клеток и снижение способности к самообновлению. В ходе исследования было показано, что экспрессия лигандов DLL1 положительно влияет на экспансию малодифференцированной популяции CD34+ клеток, полученных из пуповинной крови. Поскольку измерялась только суспензионная фракция, нельзя точно определить количественное изменение ГСК во всей культуре, а во многих работах было показано, что CD34+ клетки могут находиться под слоем МСК и пролиферировать [10]. Тем не менее, можно говорить об увеличении количества «мобилизованных» клеток, наибольшее количество которых обнаруживалось при культивировании с DLL1-МСК.

Разработка модифицированных стромальных клеток является перспективным направлением, так как обеспечивает больший клеточный прирост по всем популяциям при сравнении с обычными суспензионными культурами. Лентивирусная модификация позволяет активировать многие сигнальные пути, необходимые для пролиферации гематопоэтических клеток, при этом сохраняя комплекс факторов, воздействующих на клетки в норме. Использование МСК-ПК трансдуцированных геном DLL1 для экспансии ГСК должно помочь в создании in vitro модели культивирования лейкемических стволовых клеток, которые демонстрируют многие свойства LT-ГСК.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить коллектив сотрудников Перинатального центра за оказанное содействие в наборе материала, а также сотрудников Института молекулярной биологии и генетики за помощь в получении генетических конструкций.

Финансовая поддержка исследования осуществляется за счет гранта «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологических изменённых тканей и органов с использованием стволовых клеток» Государственный контракт № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 г.

Литература

1. *Laughlin M.J., Barker J., Bambach B. et al.* Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344 — P. 1815–1822.

2. *Migliaccio A.R., Adamson J.W., Stevens C.E. et al.* Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity // Blood. — 2000. — Vol. 96. — P. 2717–2722.

3. *Gluckman E., Rocha V., Arcese W. et al.* Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice // Exp Hematol. — 2004. — Vol. 32. — P. 397–407.

4. *Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chammard A. et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group // N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 337. — P. 373–381.

5. *Butler J.M., Nolan D.J., Vertes E.L. et al.* Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells // Cell Stem Cell. — 2010. — Vol. 6, № 3. — P. 251–264.

6. *Delaney C., Heimfeld S., Brashem-Stein C. et al.* Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution // Nat Med. — 2010. — Vol. 16. — P. 232–236.

7. *Bray S.J.* Notch signalling: a simple pathway becomes complex // Nat Rev Mol Cell Biol — 2006. — Vol. 7, № 9. — P. 678–689.

8. V*arnum-Finney B., Xu L., Brashem-Stein C.. et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling // Nat Med. — 2000. — Vol. 6, № 11. — P. 1278–1281.

9. *Bakhshi T., Zabriskie R.C., Bodie S. et al.* 2nd. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture // Transfusion. — 2008. — Vol. 48, № 12. — P. 2638–2644.

10. *Jing D., Fonseca A.V., Alakel N. et al.* Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal

cells-modeling the niche compartments in vitro // Haematologica. — 2010. — Vol. 95, № 4. — P. 542–550.

11. *Kelly S.S., Sola C.B., de Lima M., Shpall E.* Ex vivo expansion of cord blood blood // Bone Marrow Transplant. — 2009. — Vol. 44, № 10. — P. 673–681.

12. *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. — 2008. — Vol. 41, № 9. — P. 771–778.

13. *Copelan E.A.* Hematopoietic Stem-Cell Transplantation // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 354. — P. 1813–1826.

14. *Watt F.M., Driskell R.R.* The therapeutic potential of stem cells // Phil. Trans. R. Soc. B. — 2010. — Vol. 365. — P. 155–163.

АНАЛИЗ АНГИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

П.А. Бутылин, И.А. Мельн, Е.С. Зубова, О.А. Хохунов, А.Ю. Зарицкий, А.Н. Крутиков

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Бутылин Павел Андреевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онкогематологии; *Мельн Ирина Андреевна* — научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий и регенерации; *Зубова Елена Сергеевна* — аспирант лаборатории сосудистой хирургии; *Хохунов Олег Александрович* — врач отделения эндокринологии; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — профессор, доктор медицинских наук, директор Института гематологии; *Крутиков Александр Николаевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы ангиологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Институт гематологии, НИЛ онкогематологии, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Бутылин Павел Андреевич).

Резюме

Актуальность. Лечение ишемии нижних конечностей при нейро-ишемической форме синдрома диабетической стопы и облитерирующем атеросклерозе является сложной и нерешенной проблемой. Альтернативой прямой реваскуляризации может быть клеточная терапия. Особый интерес для клеточной терапии представляют гемопоэтические клетки моноцитарного ряда, обладающие выраженной секреторной активностью и играющие большое значение в регенерации сосудов и образовании новых капилляров. **Целью** работы являлось изучение ангиогенного потенциала *in vitro* гемопоэтических клеток и их субпопуляций у пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИК) и синдрома диабетической стопы (СДС)**. Материалы и метод.** В работе исследовали клетки костного мозга и периферической крови (ПК) пациентов с КИК, вызванной окклюзирующим атеросклерозом сосудов, а также у пациентов с сахарным диабетом и нейро-ишемическим вариантом СДС в сравнении со здоровыми донорами сходного возраста. Для функциональной характеристики клеток моноцитарного ряда применяли ряд тестов: образование колоний Хилла из периферической крови, секреция VEGF клетками костного мозга (CD14+ и CD14- фракцией), а также образование трубочек в Матригеле эндотелиальными клетками под воздействием среды, кондиционированной клетками пациентов. **Результаты.** Согласно полученным данным, уровень колоний Хилла у пациентов в группах СДС и КИК был ниже, чем у здоровых лиц сходного возраста. Кондиционированные среды от клеток костного мозга пациентов не стимулируют образование трубочек эндотелиальными клетками *in vitro*, а при использовании клеток от больных с КИК оно ингибируется. Клетки КМ как больных с СДС так и больных КИК производят сходное количество основных ангиогенных факторов, при этом клетки популяции CD14+ выделяют больше количество VEGF, а клетки CD14- HGF и bFGF.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, критическая ишемия нижних конечностей, гемопоэтические клетки, ангиогенез, колонии Хилла, моноциты.

ANALYSIS OF ANGIOGENIC POTENTIAL OF HEMOPOIETIC CELLS AND SUBPOPULATIONS FROM PATIENTS WITH CHRONIC LOWER LIMB ISCHEMIA

P.A. Butylin, I.A. Meln, E.S. Zubova, O.A. Hohunov, A.Y. Zaritskey, A.N. Krutikov

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrynology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: ankrutikov@yandex.ru (Krutikov Alexander Nikolaevich — PhD, senior staff scientist, Angiology group, Hematology Institute).

Abstract

Introduction: Treatment of lower limb ischemia caused by neuro-ischemic form of diabetic foot syndrome or obliterating atherosclerosis is complex problem far to be solved. Alterative approach for the direct vascularisation could be a cell therapy. Particular interest of the cell therapy focused on hemopoietic cells of monocytic lineage, which have significant secretory activity and play distinct role in vascular regeneration and development of new capillary. **Aim: Aim** of this work was to study of the angiogenic potential of hemopoietic cells and subpopulations *in vitro* from patients with critical limb ischemia (CLI) and diabetic foot syndrome (DFS). **Methods:** Bone marrow aspirate (BM) and peripheral blood (PB) were obtained from consented patients with CLI induced by obliterating atherosclerosis and neuro-ishemic DFS patients compare with healthy volunteers of the same age. Functional characterizing of the monocytic cells of peripheral blood was done using Hill-assay, for BM cells (CD14+ and CD14-) we employed proangiogenic factors secretion and endothelial tube formation in Matrigel assay using patient-derived cells conditioned media. **Results:** According to the experimental results, Hill colony formation in PB of CLI and DFS patients compare to the healthy donors of the same age. Conditional media from DFS patient's bone marrow cells did not stimulate endothelial tube formation *in vitro*, CLI patient's cells even inhibiting this assay activity. Also BM cells from CLI and DFS patients produce similar amount of proangiogenic factors, although CD14+ cells produce more VEGF, and CD14- cells produce large amounts of HGF and bFGF.

Key words: diabetic foot syndrome, lower limb ischemia, hematopoietic cells, angiogenesis, Hill's colonies, monocytes.

Статья поступила в редакцию 01.11.2012, принята к печати 20.11.2012.

Введение

Хроническая ишемия нижних конечностей развивается при окклюзирующем атеросклерозе сосудов конечности, при макрососудистых осложнениях сахарного диабета, в частности, при синдроме диабетической стопы, при облитерирующем тромбангиите. Значительна распространенность этой патологии в промышленных странах — около 3 % населения, из них у 5 % в течение года развивается критическая ишемия конечности. Лечение хронической ишемии нижних конечностей является сложной и во многом нерешенной проблемой. Прямая реваскуляризация является методом выбора. В связи с большой частотой дистального поражения сосудистого русла она возможна только у 35–55 % пациентов, а в возрастной группе старше 70 лет — у 25 %. На поздних стадиях патологии консервативная терапия, как правило, исчерпывает свои возможности. Примерно 40 % пациентов, которые получали только консервативную терапию, в течение года вынуждены проводить ампутацию пораженной конечности. Альтернативой хирургической реваскуляризации может быть введение гемопоэтических клеток для стимуляции образования капилляров и ремоделирование существующих коллатеральных артериальных сосудов, увеличение их диаметра и пропускной способности [2].

Было проведено большое количество экспериментальных работ на животных с использованием различных типов клеток, показавших эффективность клеточной терапии [3], однако результаты клинических исследований не столь однозначны. К настоящему времени выполнено только несколько рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, в которых использовались мононуклеары костного мозга, вводимые пациентам внутримышечно или внутриартериально [4–6]. Во всех исследованиях показан положительный эффект на заживление язв, уменьшение болей покоя, улучшение ряда инструментальных показателей. Однако предотвращение ампутаций конечности в течение 6 месяцев было отмечено только в исследовании Lu D. и соавт.(2011) [5]. В исследовании PROVASA [6] число ампутаций в группе клеточной терапии было такое же, как в контрольной группе. В исследовании PROVASA выделили три детерминанты эффективности клеточной терапии мононуклеарами костного мозга при КИК: количество введенных клеток, функциональные способности клеток, повторные введения суспензии клеток.

Известно, что доминирующей гипотезой, объясняющей положительные эффекты трансплантированных клеток, является «паракринная», т.е. эффекты достигаются за счет активации резидентных стволовых клеток в так называемой «васкулогенной зоне» артерий цитокинами, хемокинами и факторами роста, которые секретируются в окружающие ткани введенными клетками [7]. В связи с этим, исследование ангиогенного потенциала вводимых клеток крайне актуально. С 2003 года в исследованиях активности клеток крови применяют *in vitro* тест по образованию колоний Хилла, в связи с тем, что была обнаружена значимая корреляция числа образовавшихся колоний с риском развития сердечнососудистых заболеваний. Данные колонии представляют собой скопления клеток моноцитарного происхождения, получаемых из периферической крови [7].

Таким образом, особый интерес для клеточной терапии представляют клетки моноцитарного ряда, т.к. они обладают выраженной секреторной активностью, выделяя проангиогенные факторы. Интерес к ним также обусловлен относительной простотой получения для проведения терапии. В данной работе мы исследовали ангиогенный потенциал гемопоэтических клеток и их субпопуляций у пациентов с КИК и СДС.

Материалы и методы

1. Пациенты.

Исследовали образцы периферической крови и костного мозга, полученные у пациентов с критической ишемией нижних конечностей, обусловленной облитерирующим атеросклерозом сосудов конечностей (n = 6) и пациентов с сахарным диабетом, осложненным развитием нейро-ишемическй формы синдрома диабетической стопы (n = 26). Контролем служили образцы крови и костного мозга от здоровых лиц сходного возраста (n = 9).

2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и костного мозга.

Выделение мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ) и периферической крови (МКПК) из образцов производили в градиенте фиколла в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Далее производили подсчет клеток с использованием камеры Гаряева.

3. Магнитная сепарация CD14+ и CD14- фракций клеток.

Для проведения магнитной сепарации моноцитов (CD14+) брали 2×10^7 МК из КМ или ПК. Для получения CD14+ клеток из мононуклеарной фракции периферической крови и костного мозга использовали CD14 MicroBead human магнитные микрочастицы (Miltenyi Biotec, Германия). Для проведения магнитного мечения использовали магнитные микрочастицы, конъюгированные с CD14 антителами, и MS колонки (Miltenyi Biotec, Германия). Мононуклеврные клетки инкубировали с микрочастицами, затем наносили клеточную суспензию на колонку и трижды промывали буфером. Таким образом, прошедшая через колонку фаза содержала негативную фракцию CD14- клеток. Затем с колонки снимали фракцию, содержащую CD14+ клетки.

4. Получение кондиционированных сред.

CD14+ и CD14- фракции клеток из периферической крови и костного мозга ресуспензировали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), и высаживали в количестве 5×10^5 клеток в лунку 12-луночного планшета. Культивировали в инкубатор в течение 48 часов в стандартных условиях (37°C; концентрация CO_2 5 %). Кондиционированные среды отбирали в пробирки объемом 15 мл, центрифугировали при 300 × g , после чего аликвотировали и замораживали при -40 °C.

5. Исследование продукции проангиогенных ростовых факторов.

Анализ кондиционированных сред на содержание ангиогенных факторов (HGF, VEGF, bFGF, Ang2) производили с помощью наборов для иммуноферментного анализа производства R&D(США). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя. Кратко: 96-луночные планшеты, содержащие антитела к исследуемому белку, инкубировали с образцами кондиционированных сред или со стандартами белков исследуемых факторов в качестве положительного контроля в течение 2 часов. После промывки специальным промывочным растворов наносили биотинилированные поликлональные антитела козы в концентрации 0,2 мкг/мл на два часа, а затем повторяли процедуру отмывки. В качестве фермента, связывающегося с биотинилированными антителами, использовали стрептовидин-пероксидазу хрена в разведении 1:200, с которой инкубировали образцы 20 минут. Для развития ферментативной реакции в лунки вносили субстрат на 20–30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением стоп-раствора. Уровень поглощения раствора в лунках определяли при длине волны 450 нм с корректировкой при длине волны 570 нм на анализаторе «Synergy 2» производства Bio-Teck (США). По результатам для разных разведений белкового стандарта строили калибровочную кривую, по которой определяли концентрацию исследуемого белка в образцах

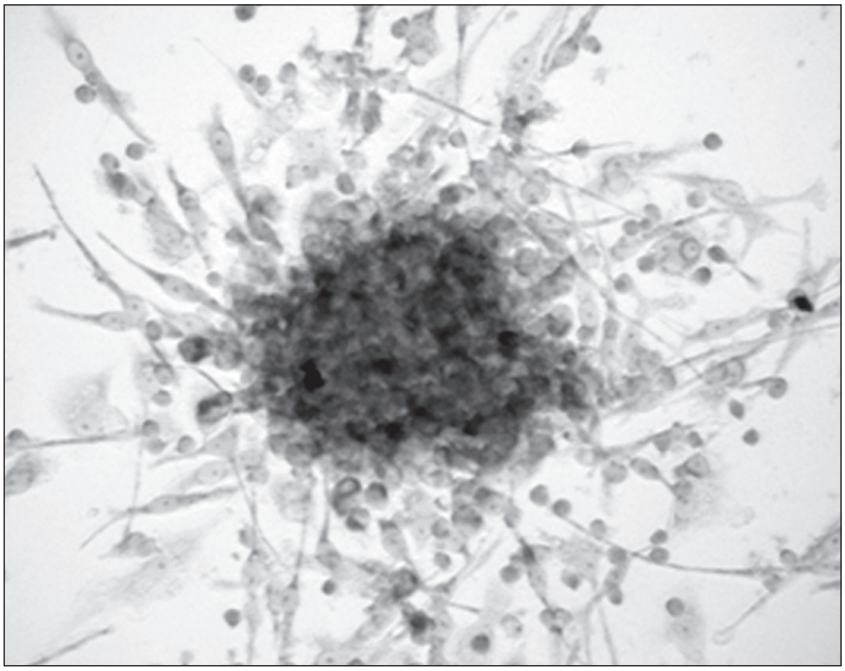


Рис. 1. Фазовая микроскопия колонии Хилла (Х400).

кондиционированных сред и пересчитывали ее на количество клеток для каждого образца.

6. Анализ образования трубочек в системе Matrigel/ HUVEC.

Для изучения ангиогенного потенциала мы использовали Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD, США). Источником матригеля является клетки опухоли мыши (Engelberth-Holm-Swarm Mouse Tumor). После подготовки матригеля (размораживание, нанесение в 48-луночной плашки, инкубирования при 22–35 °С), в каждую лунку вносили по 3×10^4 суспензии эндотелиальных клеток. Использовали первичную культуру человеческих эндотелиальных клеток пуповинной вены HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Через 2 суток культивирования HUVEC с кондиционированными средами эндотелиальные клетки образовывали трубочки. Оценку образования трубочек проводили с использованием микроскопа.

7. Получение колониеобразующих единиц Хилла.

Получение колоний Хилла из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) производили методом, предложенным компанией Stem Cell Technologies (Канада) с использованием наборов (CFU-Hill Liquid Medium Kit Human). Протокол состоял из следующих этапов: день 0 — «посадка» 5 млн. МКПК на 6-луночные покрытые фибронектином плашки(BD Bio Coat, США); день 2 — перенос неприкрепившихся клеток на 24-луночные плашки; день 5 — подсчет образовавшихся колоний. Перед подсчетом, клетки фиксировали метанолом и окрашивали раствором Гимза (Sigma Aldrich Chemie, Швейцария). 8. Статистическая обработка данных.

Статистическая обработка полученных данных произведена с использованием пакетов статистических программ «Statistica 6.0», «Microsoft Excel», использовали методы параметрической и непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение

1. Исследование образования колоний Хилла.

Колонии Хилла представляют собой округлые образования из клеток с радиально расходящимися веретенообразными клетками на периферии колонии. Пример колонии, окрашенной по Гимза, представлен на рисунке 1. Количество колоний Хилла в образцах периферической крови от пациентов с КИК и СДС значимо не различались, но было значительно ниже, чем в группе здоровых лиц, данные представлены на рисунке 2. Так как изначально для культивирования брали одинаковое количество клеточного материала, то снижение колониеобразующего потенциала может свидетельствовать о снижении функциональной активности клеток пациентов, либо об уменьшении доли клеток, способных образовывать колонии. Уменьшение колониеобразования может говорить о снижении уровня первичного имунного ответа (моноцитарного, нейтрофильного), который необходим для стимуляции регенерации, в том числе ангиогенеза. С другой стороны такое уменьшение колоний воз-

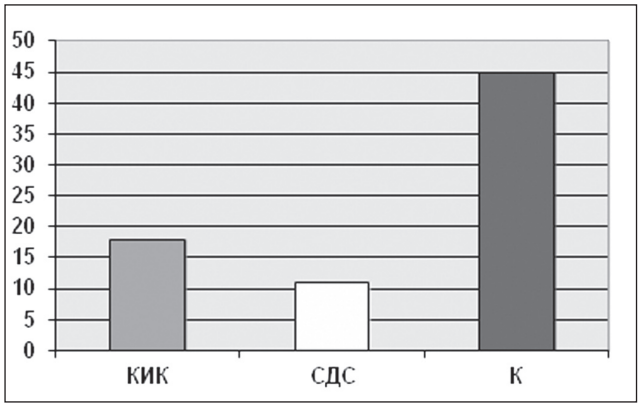


Рис. 2. Среднее значение счета колоний Хилла в образцах, полученных от пациентов с синдромом диабетической стопы, критической ишемией конечностей и группы контроля (СДС, КИК, К соответственно). КИК-СДС — нд; КИК-К — p < 005; СДС-К — p < 005.

можно связано с их преждевременной дифференцировкой и фенотипической трансформацией. Такая трансформация продемонстрирована на мышах с моделью ишемии конечности [8]. Авторы показали, что моноцитарные клетки КМ и ПК чувствительны к стимулам дистантной ишемии. В периферической крови и костном мозге отмечается активация моноцитов и их фенотипическая трансформация. При этом моноциты КМ и ПК от мышей с моделью ишемии конечности обладают дефектным ангиогенным, и пролиферативным потенциалом. Также дефектны мононуклеары КМ пациентов с ИБС [9]. Таким образом, у пациентов с КИК и СДС снижено образование колоний Хилла по сравнению со здоровыми лицами, что говорит о снижении уровня первичного имунного ответа. Тенденция к меньшему образованию колоний Хилла в группе пациентов с СДС позволяет предположить меньшую эффективность клеточной терапии мононуклеарными клетками у пациентов с сахарным диабетом.

2. Исследование ангиогенного потенциала различных субпопуляций клеток периферической крови и костного мозга в системе Matrigel/HUVEC.

Известно, что образование трубочек отражает один из этапов ангиогенеза — морфогенез, связанный с процессом дифференцировки эндотелиальных клеток. На рисунке 3 представлено микроскопическое исследование трубочек, сформировавшихся эндотелиальными клетками при культивировании с различными кондиционированными средами от пациентов с КИК, СДС в сравнение со здоровым донорам, сходного возраста. Результаты анализа, представленные на рисунке 4, показывают, что клетки КМ больных с СДС и КИК не способны стимулировать образование трубочек в матригеле с эндотелиальными клетками. Клетки КМ пациентов с КИК могут ингибировать этот процесс, возможно, за счёт, выделения ингибирующих факторов в сравнении с некондиционированной средой. Не было обнаружено значимых различий в образовании трубочек между субпопуляциями CD14+ и CD14- клеток КМ у обеих исследованных групп пациентов. Отсутствие различий между субпопуляциями CD14+ и CD14- клеток костного мозга в данном анализе, говорит о том, что изменения происходят на уровне предшественников, более ранних, чем общий миелоидный предшественник. Таким образом, кондиционированная субпопуляциями CD14+/- клеток среда от пациентов с сахарным диа-

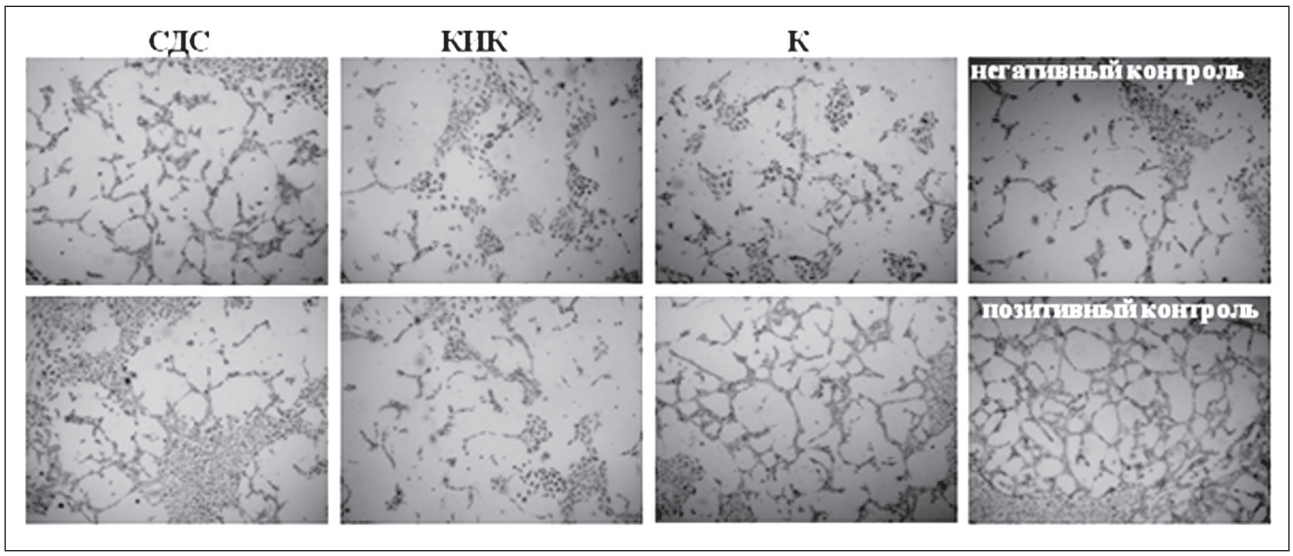


Рис. 3. Фазовая микроскопия сформированых эндотелием трубочек под влиянием кондиционированных сред, полученных при культивировании CD14+/- клеток КМ от пациентов с СДС, КИК и контрольной группы. Негативный контроль — некондиционированная среда. Позитивный контроль — среда богатая ростовыми факторами.

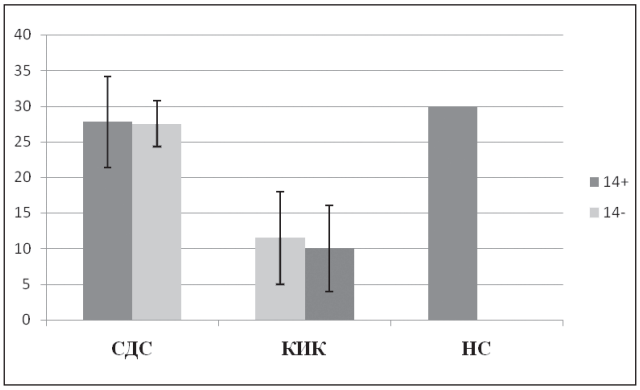


Рис. 4. Средние значение количества фокусов трубочек эндотелия, после культивирования с кондиционированными средами, полученных от CD14+/- клеток КМ и ПК пациентов с СДС и КИК, в качестве контроля некондиционированная среда (НС). КИК-СДС — p < 0,05; КИК-КСр — p < 0,05; СДС-КСр — нд.

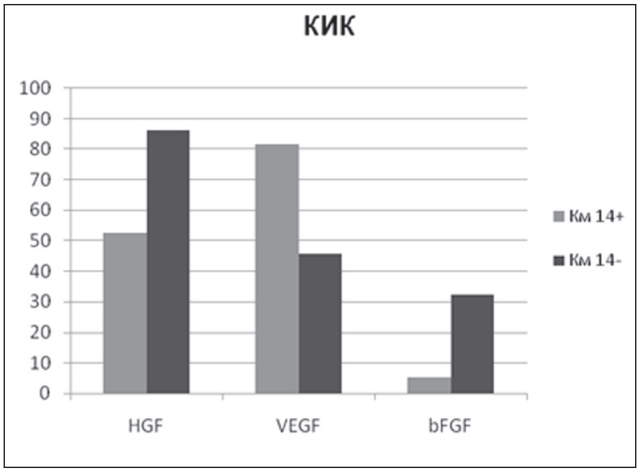


Рис. 5. Результаты измерения концентрации ангиогенных факторов (пг/мл), секретируемых различными субпопуляциями клеток пациентов с КИК.

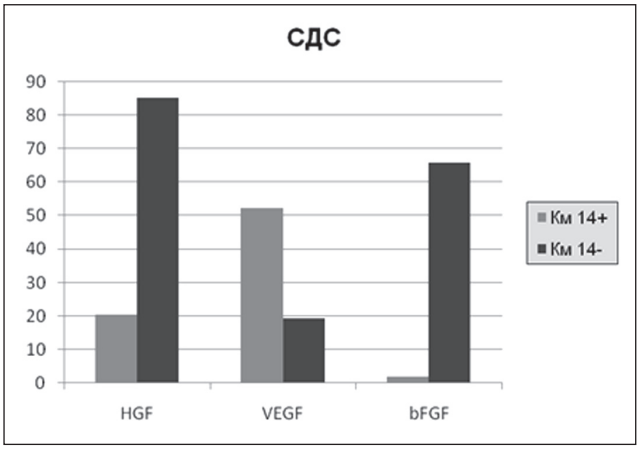


Рис. 6. Результаты измерения концентрации ангиогенных факторов (пг/мл), секретируемых различными субпопуляциями клеток пациентов с СДС.

бетом и СДС не влияет на образование трубчатых структур эндотелиальными клетками в системе Matrigel, а от пациентов с КИК ингибирует этот процесс. Возможно, это обусловлено как особенностями используемой методики, так и патологией у пациентов. В дальнейшем необходимо оценить эффект кондиционированных сред от пациентов на другие таргетные популяции клеток, например резидентные мезенхимные стволовые клетки и перициты, которые производят ангиогенные факторы и напрямую задействованы в регуляции эндотелиальных клеток.

3. Исследование продукции проангиогенных ростовых факторов гематопоэтическими клетками пациентов с СДС и КИК.

Анализ количества секретируемых проангиогенных факторов в исследуемых группах представлен на рисунках 5 и 6. Анализ секретируемых факторов показал, что мононуклеарные клетки КМ больных СДС и КИК производят сходное количество основных ангиогенных факторов. В обеих группах клетки популяции CD14+ выделяют больше количество эндотелиального фактора роста (VEGF), а клетки CD14- гепатоцитарного фактора роста (HGF) и фактора роста фибробластов (bFGF). При этом клетки больных с КИК в среднем производили большее количество VEGF, а популяция CD14- от больных с СДС отличалась более высоким уровенем секреции HGF и bFGF. Однако же разброс значений и небольшой объём исследованных групп не позволяют сделать вывод о достоверности полученных различий.

Полученные результаты актуальны для последующих исследований популяций клеток, которые возможно будет применять для клеточной терапии ишемии нижних конечностей различного генеза. Таковыми могут быть, например, мезенхимные стволовые клетки (МСК). Недавно было показано, что МСК, полученные из костного мозга пациентов с критической ишемией конечностей в той же степени увеличивали кровоток у иммунодефицитных мышей с моделью ишемии конечности, как и МСК здоровых лиц, в то же время костномозговые мононуклеары пациентов делали это в значительно меньшей степени [10]. Регенерация сосудов сложный процесс, в который вовлечены как собственно эндотелиальные клетки, так и окружающие их перициты, резидентные МСК и множество иммунных клеток. Все вышеперечисленные популяции клеток выделяют различные активные молекулы и входят в сложные звенья регуляции физиологического баланса сосудов. Таким образом, будущее исследования пригодного субстрата для клеточной терапии будут лежать в области комбинирования различных типов клеток.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках выполнения Государственного контракта «Разработка новых подходов к диагностике и терапии синдрома диабетической стопы с применением клеточных технологий» контракт К-32-НИР/111-9 от 24 октября 2011г.

Литература

1. *Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al.* TASC II Working Group. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease // Int. Angiol. — 2007. — Vol. 2. — P. 81–157.

2. *Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Epstein S.E.* Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences // Circ Res. — 2004. — Vol. 95, № 4. — P. 354–363.

3. *Lawall H., Bramlage P., Amann B.* Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease // Thromb Haemost — 2010. — Vol. 103 — P. 696–709.

4. *Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial // Lancet. — 2002. — Vol. 360. — P. 427–435.

5. *Lu D., Chen B., Liang Z. et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial // Diabetes research and clinical practice. — 2011. — Vol. 92, № 1 — P. 26–36.

6. *Walter D.H., Krankenberg H., Balzer J.O. et al.* Intraarterial Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Critical Limb Ischemia : A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial (PROVASA) // Circ Cardiovasc Interv. — 2011. — Vol. 4. — P. 26–37.

7. *Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P., et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk // New Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 348. — P. 593–600.

8. *Gregory A.D., Capoccia B.J., Woloszynek J.R., Link D.C.* Systemic levels of G-CSF and interleukin-6 determine the angiogenic potential of bone marrow resident monocytes // J. Leukoc. Biol. — 2010. — Vol. 88, № 1 — P. 123–131.

9. *Heeschen C., Lehmann R., Honold J. et al.* Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease // Circulation. — 2004. — Vol. 109 — P. 1615–1622.

10. *Smadja D.M., d'Audigier C., Guerin C.L. et al.* Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia // Bone Marrow Transplantation. — 2012. — Vol. 47 — P. 997–1000.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ИХ РОЛЬ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

А.Б. Малашичева, А.А. Худяков, А.А. Костарева

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Малашичева Анна Борисовна — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ Молекулярной кардиологии; *Худяков Александр Александрович* — младший научный сотрудник НИЛ Молекулярной кардиологии; *Костарева Анна Александровна* — кандидат медицинских наук, директор института Молекулярной биологии и генетики.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Малашичева Анна Борисовна).

Резюме

Стволовые клетки — клетки, в норме находящиеся во взрослом организме и способные к дифференцировке в нескольких направлениях. Недавно была показана возможность получения стволовых клеток из дифференцированных клеток взрослого организма — так называемое репрограммирование. В данном обзоре освещаются вопросы, связанные с получением и применением индуцированных плюрипотентных клеток в научных целях, клинических исследованиях и терапии заболеваний.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные клетки, терапия сердечных заболеваний, репрограммирование.

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND THEIR ROLE IN REGENERATIVE MEDICINE

A.B. Malashicheva, A.A. Khudiakov, A.A. Kostareva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Anna B. Malashicheva — Ph.D., Head of the Laboratory of Molecular Cardiology).

Abstract

Stem cells are the cells of a mature organism able to differentiate in several directions. Recently a possibility was shown to artificially produce stem cells from adult differentiated cells, so called reprogramming. In the review we discuss the ability of these reprogrammed stem cells (induced pluripotent stem cells, iPS cells) to give rise to different tissues and their importance in clinic and basic science.

Key words: induced pluripotent stem cells, heart disease therapy, reprogramming.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 20.11.2012.

Клетки взрослого организма в большинстве своём находятся в дифференцированном состоянии и неспособны или слабо способны к дифференцировке в различных направлениях, а также к выведению в культуру in vitro и к размножению. Большинство фундаментальных и прикладных исследований в клеточной биологии, тем не менее, проводится именно на клетках в культуре. Последнее десятилетие в клеточной биологии ознаменовано возвратом интереса к первичным клеточным культурам, так как стало понятно, что классические постоянные клеточные линии, такие как HeLa, 293HEK, A431 и многие другие, полученные в результате онкотрансформации, могут не отражать истинные процессы, имеющие место в живом организме. Кроме того, изучение процессов, лежащих в основе патогенеза различных заболеваний, также связано с необходимостью культивирования клеток от конкретных

пациентов для сохранения генетического фона конкретного заболевания. Однако, клетки взрослого, а часто престарелого, организма чрезвычайно трудно поддаются выведению в культуру. В то же время в основе заболевания зачастую лежат процессы нарушения клеточной дифференцировки, происходящие в раннем развитии организма. Таким образом ясно, что для лучшего изучения клеточных основ как патогенеза заболеваний, так и многих нормальных процессов, имеющих место во взрослом организме, необходимо уметь реконституировать (воспроизводить) эмбриональный статус клеток взрослого.

Исследования биологических процессов, имеющих место в ходе ранней дифференцировки клеток, стали возможны благодаря получению эмбриональных тератокарцином [1], а затем эмбриональных стволовых клеток мыши [2] и человека [3]. Эмбриональные стволовые клетки обладают так называемой плюрипотентностью, то есть способностью к дифференцировке в различных направлениях, что дает разнообразные возможности для изучения процессов дифференцировки и моделирования различных ситуаций раннего развития. Действительно, с использованием эмбриональных стволовых клеток был достигнут значительный прогресс в понимании многих нормальных и патогенетических клеточных процессов. Однако получить эмбриональные стволовые клетки можно только из ранних доимплантационных эмбрионов, что, естественно, исключает исследование клеток от конкретного пациента.

Настоящей революцией в клеточной биологии и регенеративной медицине стало получение плюрипотентных стволовых клеток млекопитающего (мыши) из фибробластов взрослого животного путём введения четырёх репрограммирующих транскрипционных факторов (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) [4]. Таким образом в клетках взрослого животного «стираются» дифференцировочные сигналы, полученные ими в ходе развития, и про такие клетки говорят, что они репрограммируются в эмбриональный плюрипотентный статус, заново приобретая возможность к дифференцировке в различных направлениях. Такие клетки были названы iPS от англ. «induced pluripotent cells», или ИПК — индуцированные плюрипотентные клетки. В 2008 году были впервые репрограммированы до плюрипотентного состояния соматические клетки взрослого человека [5]. Затем была показана возможность репрограммирования клеток от конкретных пациентов. Были получены репрограммированные плюрипотентные клетки от пациентов с различными наследственными заболеваниями, как менделирующими, так и имеющими комплексную наследственную природу [6]. Было показано, что такие клетки способны к дифференцировке во множественных направлениях, то есть являются истинно плюрипотентными.

Получение плюрипотентных клеток из соматических клеток взрослого организма имеет, несомненно, большой интерес с точки зрения фундаментальной науки и изучения процессов клеточной дифференцировки и дедифференцировки в ходе развития и функционирования многоклеточного организма. Однако возможность получения специфичных для пациента/заболевания плюрипотентных клеток открыло настоящую новую эру в изучении патогенеза заболеваний и исследования новых лекарственных препаратов.

За несколько лет, которые прошли с момента открытия репрограммирования при помощи эпигенетических факторов, в мировом научном сообществе достигнут большой прогресс. На моделях животных и человека интенсивно изучают процесс репрограммирования. ИПК человека получены из многих типов тканей [7], что чрезвычайно важно с точки зрения регенеративной медицины. Однако к настоящему моменту имеется ряд проблем и не решённых пока вопросов, связанных с получением ИПК как человека, так и других животных.

Само по себе определение плюрипотентности клетки, исходя из молекулярных характеристик, не имеет пока однозначного вида — как вследствие недостаточной изученности процессов дедифференцировки и репрограммирования, так и из-за межлинейных и межлабораторных различий [8]. Как следствие, существует сложность в признании данной клеточной линии истинно плюрипотентной.

Событие репрограммирования является достаточно редким — не более 5–10 % от клеточной популяции [9], а в некоторых клеточных популяциях человека — до 0,001–0,0002 [10]. Это затрудняет получение ИПК человека, особенно в целях регенеративной медицины.

Наиболее разработанные в настоящее время протоколы эпигенетического репрограммирования используют лентивирусы или ретровирусы в качестве носителя генетической информации. И те, и другие носители требуют встраивания вносимого гена в геном клетки-хозяина, а это, в свою очередь, может являться серьёзным препятствием для использования таких ИПК в терапевтических целях. В настоящее время появились работы, в которых используются методы внесения необходимых генов репрограммирования таким образом, что они не интегрируются в геном клетки хозяина [11].

Подавляющее большинство фундаментальных исследований процесса репрограммирования выполняется на клетках мыши — культивирование и

получение как эмбриональных стволовых клеток, так и ИПК больше распространено на клетках мыши в связи с большими возможностями экспериментов на животных по сравнению с человеком. Ключевые сигнальные пути плюрипотентности, отвечающие за поддержание способности к дифференцировке и самовозобновлению, различаются у мыши и человека [12, 13]. С этим связан тот факт, что не все результаты, полученные на клетках мыши, можно прямо экстраполировать на клетки человека.

ИПК человека также весьма непросто рутинно получать, так как это связано с тем, что для получения первичных клеток, из которых затем будут получаться ИПК, необходимо инвазивное воздействие, которое в случае внутренних тканей и органов весьма серьёзно и не всегда легко доступно.

Степень репрограммирования получаемых ИПК может весьма различаться даже в одном и том же эксперименте. Есть данные о том, что репрограммированные клетки, несмотря на экспрессию ряда плюрипотентных маркеров, могут, тем не менее, находиться на разной стадии репрограммирования, обладать разным потенциалом к дифференцировке, а также в ряде случаев сохранять «память о происхождении» — то есть иметь направленность дифференцировки, близкую к их изначальному происхождению. Показано также, что степень дифференцировки может быть связана с эффективностью репрограммирования [14], но есть также и данные о том, что степень дифференцировки никак не влияет на процесс репрограммирования [11].

Таким образом, репрограммирование соматических клеток взрослого организма является очень активно разрабатываемой областью с массой нерешённых к настоящему моменту вопросов. Тем не менее, очевидно, что разработка надёжных и простых в исполнении методов получения ИПС человека (ИПС, специфичных для пациента/заболевания) представляет несомненный интерес как для регенерационной медицины, так и для разработки новых лекарств.

Получение кардиомиоцитов из индуцированных плюрипотентных клеток

Открытие эмбриональных стволовых клеток, а затем и резидентных стволовых клеток ознаменовало новую эру в биологии и регенеративной медицине — возможность регенерации повреждённых тканей и органов. В настоящее время в мировом научном сообществе ведутся интенсивные разработки методов получения искусственных тканей при помощи эмбриональных стволовых и резидентных стволовых клеток.

Сердечно-сосудисистые заболевания являются ведущей причиной смертности в развитых странах. Многие пациенты выживают после инфаркта миокарда в современных условиях, но развивают прогрессирующую сердечную недостаточность. В связи с этим потребность в кардиомиоцитах, которые потенциально могут репарировать очаг повреждения, трудно переоценить. Кроме чисто практических целей регенеративной медицины, существует огромная потребность в знаниях о развитии ткани миокарда для понимания функционирования всего сердца в норме и при патологии. Учитывая тот факт, что дефинитивные кардиомиоциты неспособны к клеточному делению и практически не поддерживаются в культуре, изучение биологии их развития и функционирования на клеточном и молекулярном уровне крайне затруднено. Последние десятилетия многие лаборатории мира проводят в попытках разной степени успешности получить предшественники кардиомиоцитов и дифференцированные кардиомиоциты в культуре, главным образом с целью их дальнейшего использования для регенерации повреждённого миокарда.

Наиболее успешной стратегией до недавнего времени было использование эмбриональных стволовых клеток при индукции дифференцировки в направлении кардиомиоцитов с использованием различных генетических и биохимических факторов [15]. При пересадке обогащённой предшественниками кардиомиоцитов популяции клеток в очаг повреждения, такие кардиомиоциты способны образовывать межклеточные контакты с кардиомиоцитами хозяина и даже выступать в роли пейсмейкеров [16].

Наряду с эмбриональными стволовыми клетками для направленной дифференцировки кардиомиоцитов используют также и резидентные стволовые клетки различного происхождения, однако, при их дифференцировке и трансплантации на место повреждения возникают проблемы аритмий [17].

Опубликованы также методы получения предшественников кардиомиоцитов при помощи прямой диссоциации ткани миокарда и изолирования клеток предшественников кардиомиоцитов при помощи специфических маркеров, и дальнейшая дифференцировка в направлении кардиомиоцитов. Показано, что такие кардиомиоциты способны к поддержанию сократительной функции при трансплантации в очаг инфаркта [18]. Однако опубликованные протоколы получения таких клеток сильно варьируют и плохо воспроизводятся в разных лабораториях. Кроме того, эффект регенерации миокарда зачастую, очень короткий [19].

В связи с обсуждаемой выше возможностью получения индуцированных плюрипотентных клеток из клеток взрослого организма очень быстро возникла идея прямой трансдифференцировки одного типа клеток, минуя стадию плюрипотентности, в другой тип клеток. Действительно, был достигнут определённый прогресс в этом направлении. Так, например, из фибробластов удалось получить миоцит-подобные клетки, меланоцит-подобные клетки, нейрон-подобные клетки; из экзокринных клеток поджелудочной железы — эндокринные клетки; из клеток гранулёзы и теки — клетки Сертоли и клетки Лейдига [8].

Недавно была опубликована работа о получении кардиомиоцит-подобных клеток из клеток миофибробластов и из фибробластов хвоста мыши путём прямой трансдифференцировки при помощи трёх генетических факторов — Gata4, Mef2c и Tbx5 [20, 21]. Механизм, посредством которого это происходит, пока остаётся невыясненным, однако очевидно, что такой способ получения кардиомиоцитов перспективен как для фундаментальных целей, так и для фармакологии и регенеративной медицины, так как кроме всего прочего позволяет получить кардиомиоциты от конкретного пациента.

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (государственные контракты № 14.740.11.06 и № К-32-НИР/111-3).

Литература

1. *Hogan B.L.* Changes in the behaviour of teratocarcinoma cells cultivated in vitro // Nature. — 1976. — Vol. 263, № 5573. — P. 136–137.

2. *Evans M.J., Kaufman M.H.* Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. — 1981. — Vol. 292, № 5819. — P. 154–156.

3. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. — 1998. — Vol. 6, № 282. — P. 1145–1147.

4. *Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. — 2006. — Vol. 126, № 4. — P. 663–676.

5. *Park I.H., Zhao R., West J.A. et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // Nature. — 2008. — Vol. 451, № 7175. — P. 141–146.

6. *Park I.H., Arora N., Huo H., Maherali N. et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells // Cell. — 2008. — Vol. 134, № 5. — P. 877–886.

7. *Yamanaka S., Blau H.M.* Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches // Nature. — 2010. — Vol. 465, № 7299. — P.704–7012.

8. *Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R.* Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // Cell. — 2010. — Vol. 143, № 4. — P. 508–525.

9. *Hanna J., Saha K., Pando B., van Zon J. et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration // Nature. — 2009. — Vol. 462, № 7273. — P. 595–601.

10. *Staerk J., Dawlaty M.M., Gao Q. et al.* Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells // Cell. Stem. Cell. — 2010. — Vol. 7, № 1. — P. 20–24.

11. *Seki T., Yuasa S., Oda M. et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells // Cell. Stem. Cell. — 2010. — Vol. 7, № 1. — P. 11–14.

12. *Wray J., Kalkan T., Smith A.G.* The ground state of pluripotency // Biochem. Soc. Trans. — 2010. — Vol. 38, № 4. — P. 1027–1032

13. *Ruiz S., Panopoulos A.D., Herrerías A. et al.* A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity // Curr. Biol. — 2011. — Vol. 21, № 1. — P. 45–52.

14. *Eminli S., Foudi A., Stadtfeld M. et al.* Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells // Nat Genet. — 2009. — Vol. 41, № 9. — P. 968–976.

15. *Laflamme M.A., Zbinden S., Epstein S.E., Murry C.E.* Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms // Annu. Rev. Pathol. — 2007. — Vol. 2. — P. 307–339.

16. *Henning R.J.* Stem cells in cardiac repair // Future Cardiol. — 2011. — Vol. 7, № 1. — P. 99–117.

17. *Srivastava D.* Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis // Cell. — 2006. — Vol. 126, № 6. — P. 1037–1048

18. *Smits A.M., van Vliet P., Metz C.H. et al.* Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // Nat Protoc. — 2009. — Vol. 4, № 2. — P. 232–243.

19. *Alexander J.M., Bruneau B.G.* Lessons for cardiac regeneration and repair through development // Trends Mol. Med. — 2010. — Vol. 16, № 9. — P. 426–434.

20. *Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P. et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors // Cell. — 2010. — Vol. 142, № 3. — P. 375–386.

21. *Srivastava D, Ieda M.* Critical factors for cardiac reprogramming // Circ. Res. — 2012. — Vol. 111, № 1. — P. 5–8.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ С ПОСТОЯННО АКТИВНЫМ AKT1 КАК МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ ВАСКУЛЯРНОЙ НИШИ КОСТНОГО МОЗГА

И.А. Мельн, С.В. Жук, П.А. Бутылин, А.Ю. Зарицкий

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Мельн Ирина Андреевна — научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий и регенерации; *Жук Сергей Владимирович* — научный сотрудник лаборатории трансфузиологии; *Бутылин Павел Андреевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онкогематологии; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — профессор, доктор медицинских наук, директор Института гематологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Институт гематологии, НИЛ межклеточных взаимодействий и регенерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Бутылин Павел Андреевич).

Резюме

Актуальность. Изучение клеточных и молекулярных компонентов ниши косного мозга и их взаимной регуляции являются актуальными вопросами современной гематологии, решение которых способно дать ключ к пониманию процессов регуляции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в норме и патологии. Создание *in vitro* модели сосудистой ниши костного мозга на основе сокультивирования ГСК с эндотелиальными клетками даст возможность лучше исследовать процессы поддержания и дифференцировки ГСК. **Целью** работы являлось создание эндотелиальных клеток (ЭК) с конститутивно — активным AKT1, описание полученных клеток и изучение влияния повышенной экспрессии AKT1 в ЭК на экспансию ГСК. **Материалы и методы.** ЭК трансдуцировали конструкцией, содержащей миристилированый AKT1 (AKT1-ЭК); оценивали эффективность трансдукции микроскопически и методом проточной цитометрии; измеряли уровень экспрессии AKT1 методами ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресценции, оценивали фенотипические характеристики клеток после трансдукции. Для оценки роли AKT1 в поддержании ГСК проводили сокультивирование CD34+ ГСК пуповиной крови с AKT1-ЭК и оценивали изменения в популяциях ГСК. **Результаты.** Эффективность трансдукции составила от 60 до 95 % от общего количества ЭК. Увеличение экспрессии AKT1 в AKT1-ЭК напрямую зависело от эффективности трансдукции. При трансдукции 95 % экспрессия AKT1увеличивалась в 12 раз в AKT1-ЭК. Белок Akt1экспрессировался в AKT1-ЭК на высоком уровне. AKT1-ЭК экспрессировали три эндотелиальных маркера, уровень экспрессии CD146 и фактора Виллебранда уменьшался по сравнению с контрольными ЭК. CD31 равномерно распределялся по поверхности AKT1-ЭК. AKT1-ЭК сохраняли жизнеспособность в среде для культивирования ГСК и увеличивали количество популяции CD34+ клеток при сокультивировании. **Выводы.** Эндотелиальные клетки с конститутивно — активным AKT1 являются удобной моделью для изучения молекулярных процессов сосудистой ниши костного мозга *in vitro.*

Ключевые слова: сосудистая ниша in vitro, экспансия ГСК на ЭК, конститутивно-активный AKT1.

ENDOTHELIAL CELLS WITH CONSTITUTIVELY ACTIVATED AKT1 FOR GENERATION IN VITRO MODEL OF VASCULAR NICHE

I.A. Meln, S.V. Zhuk, P.A. Butylin, A.Yu. Zaritskey

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Pavel A. Butylin — senior staff scientist, laboratory oncohematology, Almazov Heart Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Investigation of interactions between cell and molecular processes within bone marrow niche are promising areas of current hematological research. Understanding of those mechanisms could broaden our knowledge about regulation of hematopoietic stem cells (HSCs). Generation of vascular niche in vitro by co-culturing HSCs with endothelial cells provides instructive platform for identifying factors which are involved in self-renewal and differentiation of HSCs. The purpose of this study was to generate endothelial cells (ECs) with constitutively activated AKT1 (AKT1-ECs), to describe their features and to investigate the effect of AKT1 over expression on expansion of HSCs. **Design and methods.** ECs were transformed with myrAkt1-carrying lentiviral particles, transduction efficiency was evaluated by fluorescence microscopy and FACS-analysis; level of AKT1 was measured by quantitative real-time PCR and immunofluorescence. Expression of the endothelial cell markers was analyzed by FACS-analysis and immunofluorescence. ECs viability after culturing in HSCs media was measured using the MTT assay. After long-term co-culturing with AKT1-ECs, HSCs from cord blood were analyzed by FACS-analysis. **Results.** Efficiency of transduction was 60-95 %. Expression of AKT1 in ECs depends on efficiency of transduction. AKT1 expression was increased 12-fold in cell population transduced with 95 % efficiency. Levels of Akt1 protein were significantly increased too. AKT1-ECs expressed tree endothelial markers, CD146 and von Willebrand factor were decreased compared to control ECs. CD31 was clustered around cell contacts in AKT1-ECs. Activation of AKT1 supported viability of ECs in HSCs media. AKT1-ECs increased expansion of CD34+HSCs during co-culturing. **Conclusion.** The data from this study suggest that endothelial cells with constitutively activated AKT1 may provide useful model for investigating of molecular processes within bone marrow vascular niche in vitro.

Key words: vascular niche in vitro, HSCs expansion on ECs, constitutively activated AKT1.

Статья поступила в редакцию 01.11.12, принята к печати 15.11.12.

Введение

Гемопоэз — это сложный многостадийный процесс образования и созревания клеток крови, происходящий на протяжении всей жизни человека. Физиологический баланс между поддержанием пула покоящихся гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их дифференцировкой в предшественники и зрелые клетки заключается в тонкой зональной регуляции. Принято разделять остеогенную и периваскулярную зоны костного мозга, имеющие морфологические, функциональные и молекулярные отличия [1].

В первую очередь остеогенная (эндостальная) зона располагается вблизи кости, а периваскулярная зона включает в себя разветвленную сеть особых синусоидальных сосудов костного мозга. Синусоиды лишены гладкомышечного слоя и базальной мембраны, а эндотелиальный слой в них состоит из фенестрированных клеток — синусоидальных эндотелиальных клеток (СЭК) с порами от 100 до 200 нм [2]. Все эти морфологические особенности позволяют эндотелию синусоидов не только пропускать крупные молекулы, эритроциты, но и регулировать выход (мобилизацию) и возвращение (хоуминг) гемопоэтических клеток.

В 2010 году было обнаружено, что ГСК, выделенные из разных регионов костного мозга, имеют различный гемопоэтический потенциал. Данные исследования показали физиологическую разницу между популяциями ГСК, имеющими одинаковые поверхностные маркеры (CD150+ CD48-) и находящимися в разных зонах костного мозга. ГСК из остеогенного региона проявляли больший пролиферативный потенциал и активность к миграции в строму косного мозга, чем ГСК из центрального сосудистого региона [3].

Так же стоит отметить, что существует молекулярный паттерн, присущий каждой зоне, а именно: ростовые факторы, молекулы адгезии и хемокины. СЭК экспрессируют на своей поверхности селектины: E-selectin и P-selectin, молекулы клеточной адгезии: VCAM1 и ICAM1, которые обычно представлены на поверхности других ЭК во время воспалительного ответа, но не в нормальном состоянии [1]. СЭК обеспечивают физиологическую регенерацию тканей после миелосупрессии [4, 5] и способствуют росту лейкемических клеток [6]. Было показано, что сокультивирование ГСК (Sca1 + c-Kit+ lin- клетки) с эндотелием из различных органов мыши, приводит к увеличению количества колониеобразующих единиц в метилцеллюлозе in vitro и в селезенке облученной мыши in vivo [7]. Данные процессы происходят не только за счет обеспечения ГСК и предшественников питательными веществами и кислородом, но и через продукцию эндотелиальными клетками ангиокринных факторов [8]. Множество исследований показало, что

существует двухстороннее взаимодействие между ЭК и ГСК. ГСК выделяют ангиогенные факторы, например, VEGF-A, что провоцирует ЭК синтезировать трофогены, необходимые для роста ГСК, такие как SDF-1, IL-6, IL-3, G-CSF, IL-1 и оксид азота (NO) [1]. Концентрация данных факторов может значительно изменять уровень пролиферации нормальных и лейкемических стволовых клеток. Таким образом, на данный момент в сформированной концепции ниш костного мозга, сосудистой зоне отводят значимое место в регуляции самообновления, дифференцировки и миграции ГСК.

Одним из важнейших направлений молекулярной гематологии последних пяти лет стало выявление факторов, производимых СЭК и задействованных в гомеостазе ГСК. Также были осуществлены опыты по экспансии ГСК на фидерном слое из эндотелиальных клеток [7]. Однако на пути этих исследований стояла техническая проблема, заключающаяся в том, что первичным эндотелиальным клеткам для поддержания в культуре необходимы сыворотка и коктейль ростовых факторов/цитокинов. Сыворотка ингибирует деления ГСК, а цитокины усиливают их, что не позволяет проводить экспансию ГСК в первом случае, оценку вклада факторов, выделяемых эндотелием — во втором. Перед учеными встала задача создания модели сокультивирования ГСК в бессывороточных условиях. Одним из подходов стало введение аденовирусной конструкции E4ORF1 (Adenovirus gene, early region 4 encoded open reading frame-1). Введение конструкции приводило, в том числе, к постоянной активации AKT1, что позволяло культивировать ЭК без сыворотки и цитокинов. [9, 10]. В 2010 году было доказано, что активация AKT1-киназного пути через mTOR, вызывает увеличение способности CD34-Flt3- популяции ГСК к долгосрочной репопуляции, в то время как активация MAPK-киназного пути в ЭК подталкивает ГСК к дифференцировке [11].

В данной работе мы использовали другой подход для создания фидерного слоя из ЭК с конститутивно- активным AKT1, а именно трансдукция первичной культуры эндотелиальных клеток человека генетической конструкцией, содержащей AKT1 с сигналом миристилирования (myrAkt1), что приводит к постоянному фосфорилированию Akt1 PI3 киназой.

Материалы и методы

1. Производство лентивирусных частиц.

В работе использовалась лентивирусная система второго поколения, состоящая из вектора (myrAKT1-LeGO-iG2) и пакующей системы (psPAX2 и pMD2G). Плазмида pMD2G кодирует гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV-G). VSV-G белок в составе оболочки вируса обеспечивает широкий тропизм к многим типам клеток, позволяя получать высокий процент трансдуцированных клеток. Вектор LeGO-iG2 содержит промотор SFFV. Клонирование myrAKT1 осуществляли в область находящуюся сразу после последовательности промотора. Благодаря наличию IREZ сайта (сайт для посадки рибосомы на РНК) после гена интереса и перед eGFP, под контролем промотора SFFV оказались оба гена, что обеспечило их одновременную экспрессию. Производство лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK293. Клетки рассеивали в концентрации 2,5–3,0*106 клеток на 10 см чашку в среде DMEM с добавлением 10 % ФБС, 2мМ глутамина и 20мкг/мл гентамицина. На следующий день среду меняли на 9 мл свежей с добавлением 25 мкм хлорохина. Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом; смесь плазмид (из расчета 15 мкг вектора, 9,35 мкг psPAX2 и 5,32 мкг pMD2.G на одну чашку) ресуспендировали в Tris-EDTA буфере, содержащем CaCl2, и добавляли к 2X HEPES буферу. Через 15 минут образовавшиеся комплексы ДНК и фосфатов кальция добавляли к клеткам. Через 16 часов клеткам меняли среду, после чего каждые 24 часа с чашек собирали супернатанты, содержащие вирусные частицы. Концентрирование вирусных частиц осуществляли ультрацентрифугированием на сахарозной подложке в течение 2 часов при 72.000g и +40°C. Полученные осадки вирусных частиц ресуспендировали в DMEM и хранили на −80°C. Измерение количества трансдукционных единиц осуществлялось по серийному разведению растворов с лентивирусами и с последующим заражением известного количества HEK293 клеток. Через 72 часа методом проточной цитометрии измерялся процент клеток экспрессирующих eGFP.

Плазмида 1036 pcDNA 3 myr ha akt1 (из плазмидной базы addgene) использовалась в качестве источника кодирующей последовательности ДНК. Вектор LeGO-iG2 был любезно предоставлен Dr. K.Weber, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Гамбург, Германия. Для клонирования использовались праймеры:

1) mAkt-F1 TAGAGAACCCACTGCTTACT

2) mAkt1-ecoR2 AGAATTCTCAGGCCGTGCCGCTGGC

После ПЦР по 1036 pcDNA 3 myr ha akt1 полученный продукт подвергался рестрикции по EcoR1 сайту, получившийся фрагмент вставляли в LeGO-iG2. Клонирование в LeGO-iG2 осуществлялось по

сайтам BamH1 и EcoR1 с сохранением последнего. Направление вставки было проверено секвенированием полученных плазмид.

2. Получение АКТ1-ЭК и LeGO-ЭК.

Эндотелиальные клетки выделяли из пуповинной вены новорожденного (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) и использовали клетки 2-го пассажа. HUVECs растили в Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell, Германия). Среда содержала 2 % сыворотки и факторы из набора: EGF (5 нг/мл), bFGF (10 нг/мл), IGF (20 нг/мл), VEGF (0,5 нг/мл), а так же аскорбиновую кислоту (1 мкг/ мл), гепарин (22,5 мкг/мл), гидрокортизон (0,2 мкг/мл). Все эксперименты по трансдукции ЭК проводились в условиях МЗ = 10 (множественности заражения). Для увеличения эффективности трансдукции в среду, содержащую вирус добавляли полибрен (гексадиметрина бромид) до 8 мкг/мл.

3. Проточная цитометрия.

3.1. Оценка эффективности трансдукции.

АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольные ЭК снимали раствором Версена, осаждали, затем растворяли в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и анализировали на Guava EasyCyte 8 (EMD Millipore, США). В качестве негативного контроля использовали контрольные ЭК, которые не содержат конструкции с eGFP.

3.2. Оценка поверхностных маркеров.

АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольные ЭК снимали раствором Версена, осаждали, затем красили конъюгированными с флуорохромом антителами CD146-PE (Dako, Agilent Technologies). Окраску проводили в темноте в течение часа на комнатной температуре с концентрацией антител, рекомендованной производителем. В качестве контроля использовали пробу, покрашенную IgG-PE. Процент CD146 клеток высчитывали, нормализуя на eGFP клетки.

ГСК собирали через каждые два дня, фиксировали в 2 % параформальдегиде (ПФА) (Sigma, США) и хранили до проведения анализа. Для окраски клеток использовали антитела, коньюгированные с флюорохромами: CD34-FITC (Miltenyi Biotec, Германия) и CD45-PE CD38-PC5 (Dako, Agilent Technologies). Окраску проводили в темноте в течение часа на комнатной температуре с концентрацией антител, рекомендованной производителем. В качестве контроля использовали пробу, покрашенную IgG- FITC, IgG-PE, IgG- PC5.

4. Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в реальном времени.

Для выделения РНК использовали наборы RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Затем производили измерение концентрации и чистоты полученной РНК на спектрофотометре Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, США). Синтезировали кДНК с помощью MMLV Reverse Transcriptase kit (Evrogen, Россия). Количественную ПЦР в реальном времени ставили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+ROX kit (Evrogen, Россия) в 20 мкл реакции с 0,8 мМ праймерами к АКТ1, 4 мкл кДНК и 4 мкл SYBR Green PCR Master Mix. Условия реакции были следующими: начальная денатурация 95°С 5 минут, затем 40 циклов — денатурация 95 °С (30 сек.), отжиг праймеров 60°С (30 сек.) и элонгация 72°С (45 сек.).

5. Иммунофлуоресцентная окраска клеток.

Лунки с клетками промывали однократным PBS дважды. Фиксировали в 4 % растворе ПФА на PBS в течение 10 мин на комнатной температуре. Клетки отмывали PBS 3 раза по 10 мин. Для образцов с внутриклеточной локализацией интересующих белков проводили пермеабилизацию 0,3 % раствором Triton X-100. Для предотвращения неспецифического связывания, образцы инкубировали в 10 % растворе не иммунизированной сыворотки донора вторых антител на 1 % бычьем сывороточном альбумине (БСА) в PBS в течение 30 мин. После этого наносили первые антитела в концентрации, рекомендованной производителем, разведенные на 1 % БСА, и инкубировали во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первых антител использовали следующие антитела: mouse anti-human CD31 (R&D Systems), mouse anti-human Von Willebrand factor (abcam), mouse anti-human AKT1 (Cell Signaling). Клетки отмывали от первых антител в PBS 3 раза по 10 мин и наносили вторые антитела, меченные флуорохромом; инкубировали в течение 40–50 мин в темноте, отмывали в PBS 3 раза по 10 минут и докрашивали ядра 4’,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Sigma, Германия) в концентрации 0,1 мкл/мл PBS в течение 20 мин. Затем образцы промывали 3 раза по 15 мин в PBS, заключали в специализированной среде для иммунофлуоресцентных препаратов (Dako, Дания). Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Observer D1 (Carl Zeiss, Германия). Обработку изображений производили с использованием программы Axio Vision Rel. 4.7.1.

5. Оценка жизнеспособности популяций клеток (МТТ тест).

Оценку жизнеспособности популяции производили колориметрическим методом с использованием реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид (Sigma, США)). Метод основан на том, что митохондриальные ферменты способны восстанавливать желтый МТТ до пурпурного формазана. Поскольку эта реакция

происходит только в живых клетках, количество формазана зависит от числа живых клеток в популяции. Отбирали среду и клеткам добавляли 100 мкл 0,5 мг/мл МТТ, растворенного в PBS, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в инкубаторе. Отбирали раствор МТТ, а образовавшийся осадок формазана растворяли, добавляя в лунку равный объем диметилсульфоксид (DMSO). Затем измеряли оптическую плотность (OD) образцов при длине волны 550 нм относительно клеток растворенных в DMSO без добавления МТТ на спектрофотометре Synergy 2 BioTeK.

6. Получение CD34+ГСК методом магнитной сепарации мононуклеарных клеток пуповинной крови.

Выделение мононуклеарных клеток пуповинной крови, полученной в Перинатальном центре ФГБУ «ФЦСКЭ им.Алмазова», производилось в градиенте плотности фиколла — Ficoll-Paque PLUS (GE Healtheare, Швеция) в соответствии с протоколом производителя. Для проведения магнитной сепарации использовали набор CD34+ MicroBead Kit и MS колонки (Miltenyi Biotec, Германия). Затем оценивали процентное содержание CD34+ ГСК методом проточной цитометрии с использованием коньюгированных антител CD34-FITC (Miltenyi Biotec, Германия). ГСК ресуспендировали в среде StemSpan SFEM содержащей 100нг/мл SCF, 100нг/мл FLT-3L, 50 нг/мл TPO и 30 нг/мл IL6 (все цитокины от R&D Systems, США).

7. Сокультивирование АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольными ЭК с CD34+ГСК.

На 24-луночную плату сажали АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольные ЭК по $1X10^5$ клеток на лунку. После прикрепления клетки инкубировали с растворенным митомицином С в среде (4 мкг/мл) в течение 2,5 часов, для предотвращения перерастания клеток в течение длительного сокультивирования. Отмывали клетки 3 раза PBS и высаживали на них ГСК в концентрации $3X10^4$ в среде StemSpan. 50 % объема среды с ГСК отбирали каждые 2–3 дня и добавляли 50 % объема свежей StemSpan.

Результаты

1. Оценка эффективности трансдукции АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК.

Для оценки эффективности трансдукции выявляли наличие экспрессии репорторного гена eGFP в полученных клетках после трех дней культивирования методами микроскопии и проточной цитометрии. На верхней панели рисунка 1 представлен фазовый контраст АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольных ЭК; на нижней панели показан сигнал флуоресцентного свечения от eGFP. Из полученных данных видно, что АКТ1-ЭК и LeGO-ЭК экспрессировали eGFP на высоком уровне, что свидетельствует об успешной трансдукции клеток.

Другой метод позволяющий проанализировать эффективность трансдукции АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК в сравнении с контрольными ЭК — это проточная цитометрия, которая оценивает соотношение клеток несущих eGFP к общему количеству клеток в образце. Данные изображены на рисунке 2. Нами

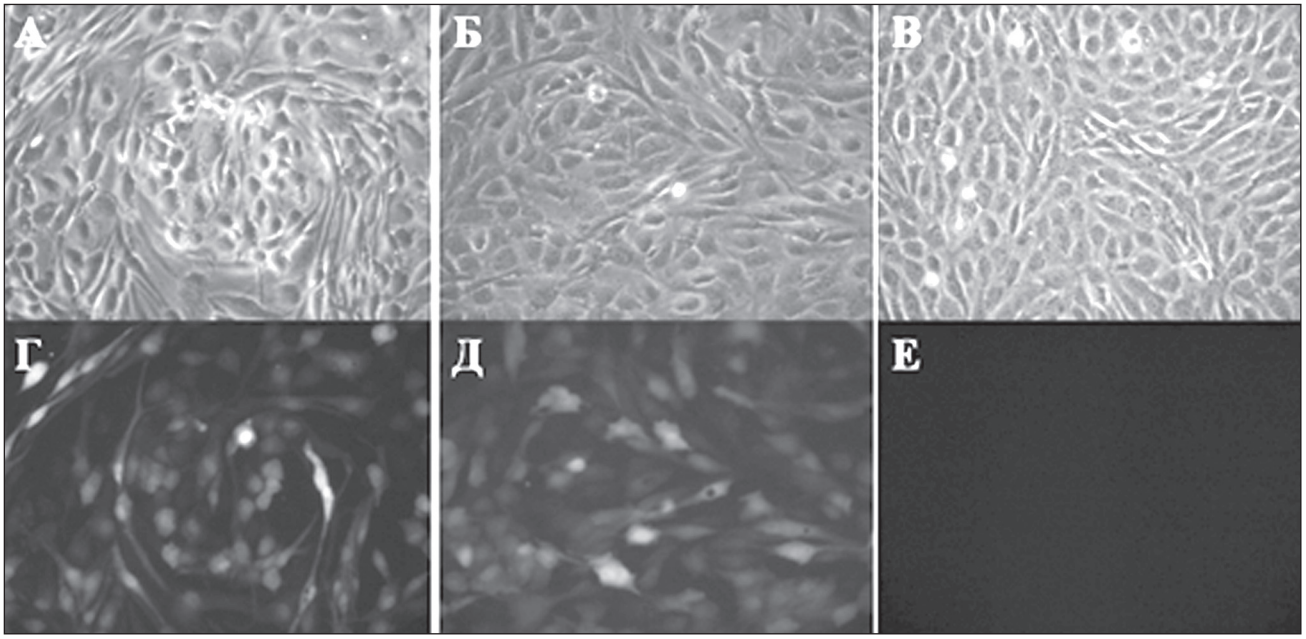


Рисунок 1. Микроскопическое исследование эффективности трансдукции. Верхняя панель (А, Б, В): фазовый контраст (Х200). Нижняя панель (Г, Д, Е): уровень экспрессии eGFP (Х200). А и Г- АКТ1-ЭК, Б и Д- LeGO-ЭК, В и Е — контрольные ЭК.

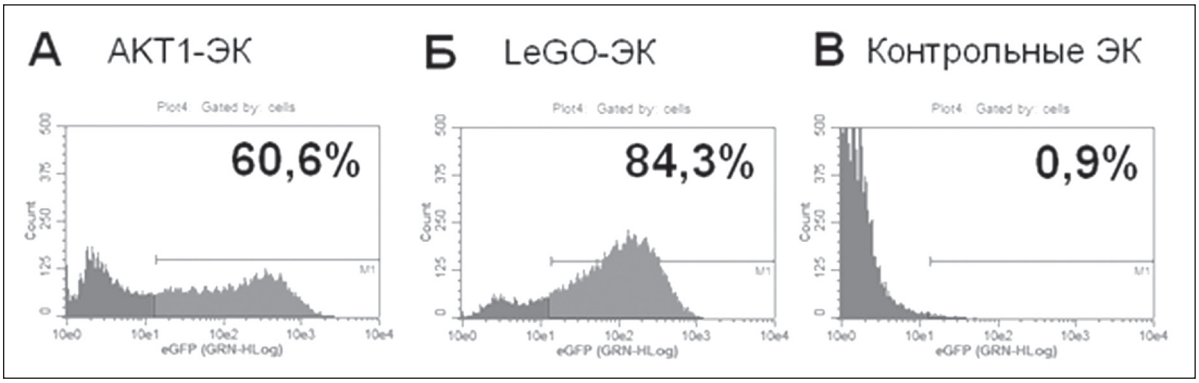


Рисунок 2. Анализ экспрессии eGFP в АКТ1-ЭК (А), LeGO-ЭК (Б) и контрольных ЭК (В) методом проточной цитометрии. На гистограммах на оси абсцисс отложен уровень экспрессии eGFP, на оси ординат отложено количество событий. Над графиками указано процентное содержание клеток, несущих eGFP от общего количества проанализированных клеток образца.

было показано, что 60,6 % популяции АКТ1-ЭК экспрессировали eGFP, в то время как эффективность трансдукции LeGO-ЭК была выше на 28,5 % и составляла 84,3 %.

Как изложено выше мы показали двумя методами, что через три дня после трансдукции большая часть клеток популяции несла в себе конструкцию, содержащую репортерный ген eGFP. Далее мы приступили к проверке зависимости экспрессии гена интереса, находящегося в данной конструкции, а именно АКТ1, от эффективности трансфекции.

2. Оценка экспрессии АКТ1 в АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК.

На первом этапе работы мы показали, что достигли высокой эффективности трансдукции — более 60 % АКТ1-ЭК несли в себе конструкцию, содержащую АКТ1. Далее было необходимо доказать, что конструкция работает в клетках и приводит к повышенной экспрессии АКТ1. Для сравнения уровня экспрессии АКТ1 в АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольных ЭК мы оценили количество копий мРНК методом ПЦР в реальном времени (Real-time PCR). Мы использовали для сравнения два набора образцов с разной эффективностью трансдукции АКТ1-ЭК : 95 % и 60 %. Из данных изображенных на рисунке 3 видно, что АКТ1-ЭК (95 %) содержали в 12 раз больше копий гена АКТ1 в сравнении с клетками несущими пустой вектор LeGO и контрольными нетрансдуцированными ЭК. В то время как в АКТ1-ЭК (60 %) происходило увеличение экспрессии АКТ1 в 3,5 раза. Таким образом, трансдукция ЭК конструкцией несущей myrАКТ1 приводила к успешному увеличению экспрессии АКТ1, которая зависела от эффективности трансдукции.

Для подтверждения полученного результата было необходимо проверить, что оверэкспрессированная мРНК АКТ1 транслицируется в белок Akt1. Мы применили иммунофлуоресцентную окраску на белок Akt1 в АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК, данные микроскопии приведены

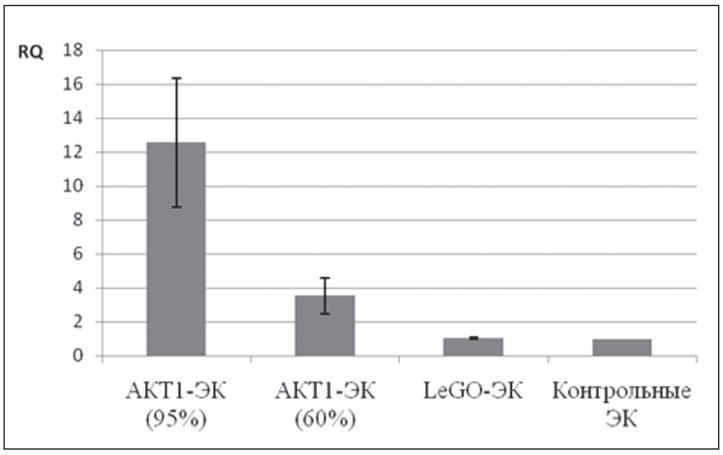


Рисунок 3. Количественный анализ экспрессии гена АКТ1 методом ПЦР в реальном времени (Real-time PCR). На гистограммах на оси абсцисс- АКТ1-ЭК 95 % (95 % клеток несут АКТ1), АКТ1-ЭК 60 % (60 % клеток несут АКТ1), LeGO-ЭК и контрольные ЭК, на оси ординат отложено RQ- относительный уровень экспрессии гена.

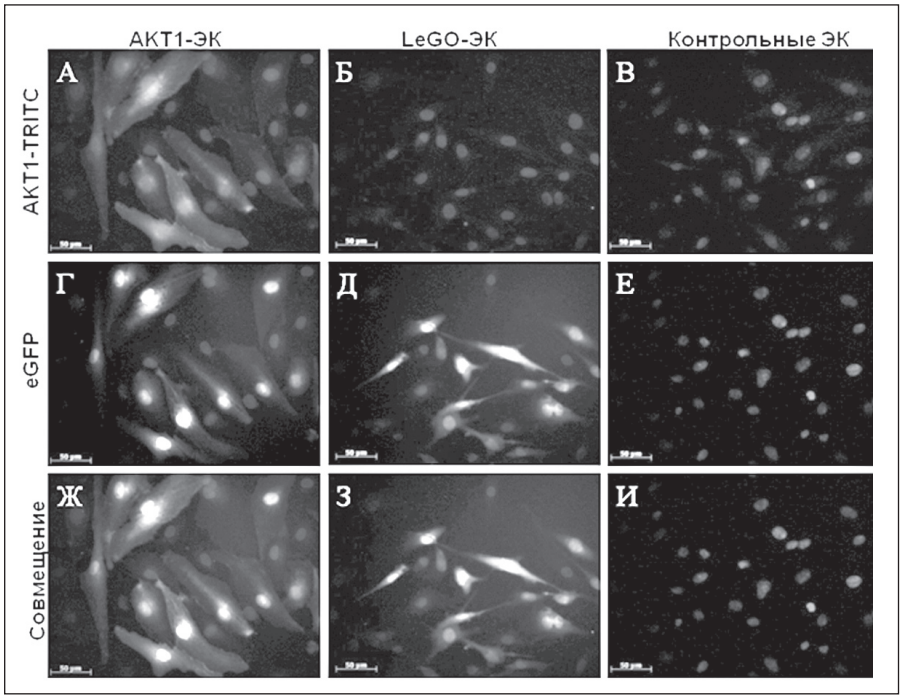


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентная окраска белка Akt1. Верхняя панель: белок Akt1-TRITC в АКТ1-ЭК (А), LeGO-ЭК (Б) и контрольных ЭК (В). Средняя панель: eGFP в АКТ1-ЭК (Г), LeGO-ЭК (Д) и контрольных ЭК (Е). Нижняя панель: совмещение сигналов от верхней и средней панели в АКТ1-ЭК (Ж), LeGO-ЭК (З) и контрольных ЭК (И).

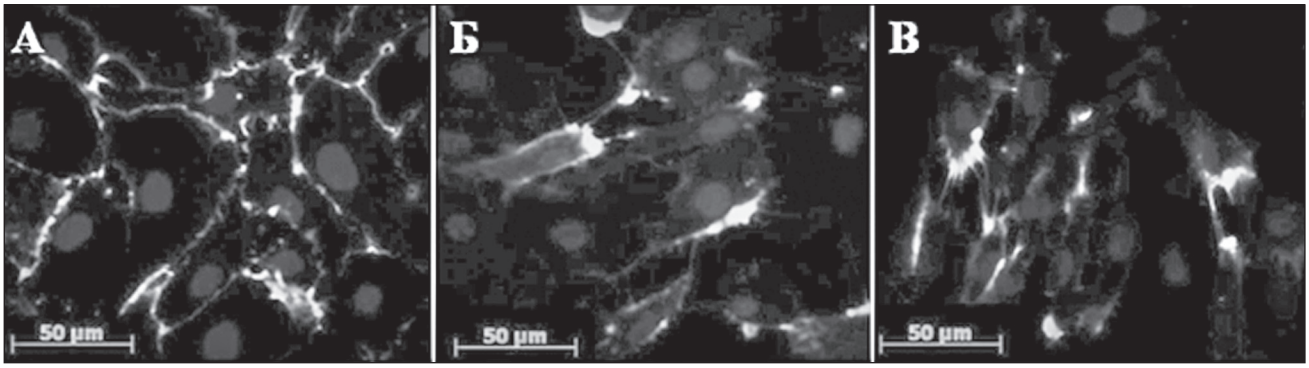


Рисунок 5. Иммунофлуоресцентная окраска на поверхностный маркер CD31. Белок CD31-TRITC в АКТ1-ЭК (А), LeGO-ЭК (Б) и контрольных ЭК (В). Голубое свечение — ядра клеток.

на рисунке 4 видно, что АКТ1-ЭК экспрессируют белок Akt1 на значительно более высоком уровне в сравнении с LeGO-ЭК и контрольные ЭК, что подтверждает предыдущие данные количественного ПЦР. Из рисунка 4 видно, что те АКТ1-ЭК, в которых обнаруживается сильный eGFP сигнал, так же экспрессируют АКТ1 на высоком уровне. Такая колокализация сигналов от eGFP и АКТ1 подтверждает, что конструкция работает и транскрибируется и далее процессируется в работающий белок.

3. Оценка фенотипических свойств АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК.

Мы провели фенотипическое исследование эндотелиальных клеток, несущих АКТ1, в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК. Оценивали экспрессию таких эндотелиальных маркеров как CD31 (Cluster of Differentiation 31, PECAM-1), CD146 (MCAM) и фактор Виллебранда.

Для изучения маркера межклеточных контактов ЭК CD31, мы выбрали визуальный метод иммунофлуоресцентной окраски с последующей микроскопией. Как отражено на рисунке 5, CD31 экспрессировался во всех трех типах клеток. Однако стоит отметить, что в АКТ1-ЭК CD31 распределялся равномерно в местах формирования клеточных контактов. В то время как в LeGO-ЭК и контрольных ЭК происходило неравномерное распределение CD31, что указывает на отсутствие протяженных контактов между клетками.

Экспрессию молекулы клеточной адгезии CD146 (MCAM), которая находится на поверхности эндотелиальных клеток в большом количестве, была

оценена методом проточной цитометрии. Нами было показано, что 63,9 % АКТ1-ЭК и 91,7 % LeGO-ЭК несли на своей поверхности CD146 и экспрессировали eGFP в сравнении с 97,8 % контрольных ЭК, отрицательные по eGFP. Из приведенных на рисунке 6 данных следует, что экспрессия активного АКТ1 снижала экспрессию эндотелиального маркера CD146 на 30,4 % в сравнении с ЭК, несущими вектором LeGO.

Далее мы исследовали экспрессию фактора Виллебранда (von Willebrand factor, vWF), который синтезируется в зрелом эндотелии в тельцах Вейбеля-Палладе. Мы обнаружили уменьшение экспрессии фактора Виллебранда в АКТ1-ЭК, в то время как в LeGO-ЭК он синтезировался на уровне контрольного эндотелия. На рисунке 7 видно, что только те АКТ1-ЭК, которые не несут конструкцию с АКТ1, экспрессируют фактора Виллебранда на высоком уровне. Напротив, АКТ1-ЭК с интенсивным зеленым свечением практически не содержат в цитоплазме красных гранул фактора Виллебранда. Среди популяции LeGO-ЭК практически все клетки формировали тельца Вейбеля-Палладе, содержащие фактора Виллебранда.

Таким образом, проведя анализ трех свойственных эндотелию маркеров, мы показали, что в АКТ1-ЭК уменьшается экспрессия CD146 и фактора Виллебранда в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК. Интересно отметить, что CD31 в АКТ1-ЭК равномерно распределялся по мембране клеток, участвуя в создании протяженных контактов между ними. Это согласуется с другими данными о том что, АКТ1-ЭК формируют плотный монослой и обладают большей жизнеспособностью, чем LeGO-ЭК и контрольные ЭК (данные не представлены).

4. Оценка жизнеспособности АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК в среде для культивирования ГСК.

Известно, что эндотелиальным клеткам для нормального поддержания жизнедеятельности необходим высокий процент сыворотки и богатый коктейль ростовых факторов в среде культивирования. Напротив, специальная среда для культивирования гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) не содер-

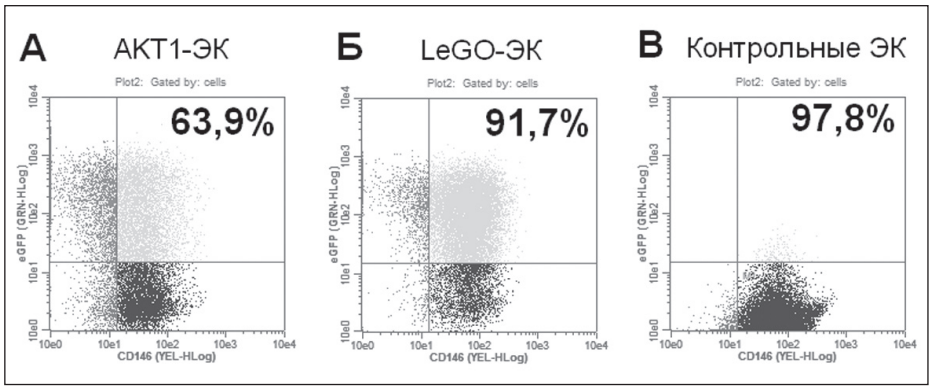


Рисунок 6. Анализ экспрессии CD146 в АКТ1-ЭК (А), LeGO-ЭК (Б) и контрольных ЭК (В) методом проточной цитометрии. На гистограммах на оси абсцисс отложен уровень экспрессии CD146, на оси ординат отложен уровень экспрессии репортерного гена eGFP. Над графиками указано процентное содержание клеток, несущих на поверхности CD146 от общего количества eGFP- позитивных клеток образца.

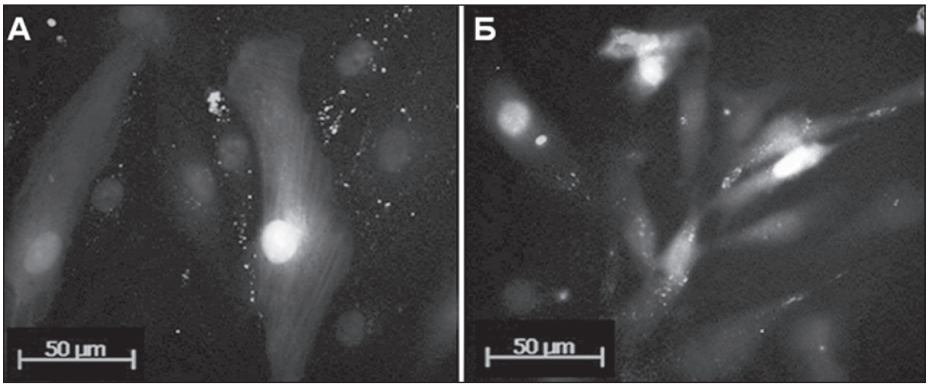


Рисунок 7. Иммунофлуоресцентная окраска фактора Виллебранда (vWF) в АКТ1-ЭК (А) и LeGO-ЭК (Б). Красное свечение гранул — vWF , зеленое свечение — eGFP, голубое свечение — ядра клеток.

жит сыворотки, т.к. она препятствует их росту. Необходимо было изучить способность трансдуцированных клеток оставаться в жизнеспособном состоянии при культивировании в среде для ГСК. Мы оценили способность АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК сохранять жизнеспособность в среде для культивирования ГСК StemSpan методом МТТ. На рисунке 8 видно, что только АКТ1-ЭК сохраняли жизнеспособность вплоть до четвертого дня культивирования в StemSpan. Уменьшение жизнеспособности АКТ1-ЭК на 2 день составило 1,4 раза. Напротив, жизнеспособность LeGO-ЭК и контрольных ЭК уменьшалась в 42,7 и 4,2 раза соответственно на 2 сутки культивирования в среде StemSpan.

5. Влияние экспрессии эндотелиального АКТ1 на экспансию гемопоэтических стволовых клеток.

Для исследования влияния экспрессии АКТ1 в ЭК на экспансию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) использовали модель совместного культивирования. Эксперимент состоял из следующих этапов: получение CD34+ клеток из пуповинной крови методом магнитной сепарации, совместное культивирование CD34+ клеток на фидерном слое из АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК, контрольных ЭК и без фидерного слоя, анализ полученной популяции ГСК каждые 2–3 дня методом проточной цитометрии.

Для получения популяции ГСК мы выделили мононуклеарные клетки пуповинной крови и провели магнитную сепарацию клеток по маркеру CD34. Далее анализировали полученную популяцию по маркеру CD34 методом проточной цитометрии, процент CD34 составлял 98 % (данные не представлены).

Высаживали CD34+ ГСК на АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольный ЭК, а так же просто на пустую лунку не покрытую фидерными клетками. Отбирали половину суспензионной популяции каждые 2–3дня и анализировали на маркеры CD34 и CD38. На рисунке 9 отображены результаты цитометрического анализа после 5 дней сокультивирования. Мы показали, что процент ГСК CD34+CD38- уменьшался после сокультивирования с АКТ1-ЭК и составлял 16,5 % в сравнении с LeGO-ЭК (34,2 %), контрольными ЭК (32,1 %) и без ЭК (32,4 %). В то же время процент клеток позитивных по CD34+CD38+ возрастал после сокультивирования с АКТ1-ЭК и составлял 30,5 % в сравнении с LeGO-ЭК (3,7 %), контрольными ЭК (0,8 %) и без ЭК (1,3 %). Таким образом, суммарные проценты CD34+CD38+ и CD34+CD38- популяций были 47 % (АКТ1-ЭК), 37,9 % (LeGO-ЭК), 32,9 % (контрольными ЭК) и 33,7 % (без ЭК). Суммарный процент популяция CD34+ возрастал в 1,4 раза после сокультивирования с АКТ1-ЭК в сравнение с культивированием ГСК на пластике без фидерного слоя.

Обсуждение

В лабораторной практике принято считать что, трансдукция прошла эффективно и все условия оптимизированы, если более 95 % клеток популяции экспрессируют репортерный ген. Мы обнаружили, что после оптимизации условий на HUVEC, эффективность трансдукции была только 60 %. Надо отметить, что первичные культуры клеток, такие как HUVEC, проходят процесс трансдукции хуже, чем иммартализованные линии. В последующих экспериментах мы получали эффективность трансдукции 95 %, при этом наблюдали сильный токсический эффект на ЭК. Особенно это затронуло контрольные клетки (LeGO-ЭК), которые были трансдуцированны пустой конструкцией, содержащей только репортерный ген. Таким образом, что бы получить

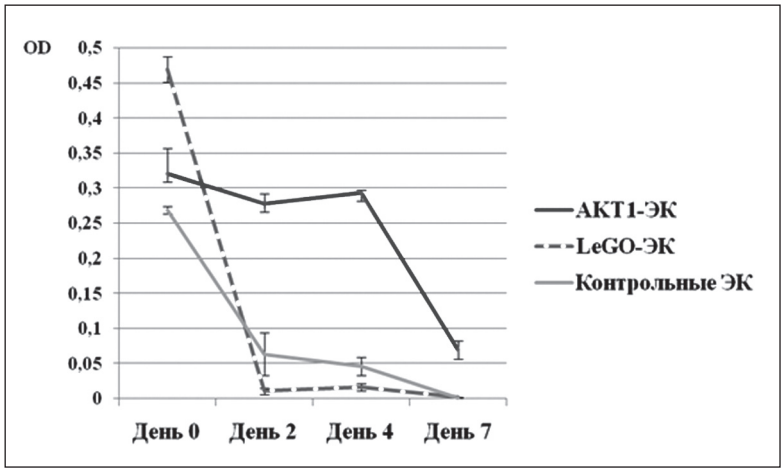


Рисунок 8. График оценки жизнеспособности АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК и контрольных ЭК методом МТТ после культивирования в среде StemSpan. По оси ординат отложена оптическая плотность (OD).

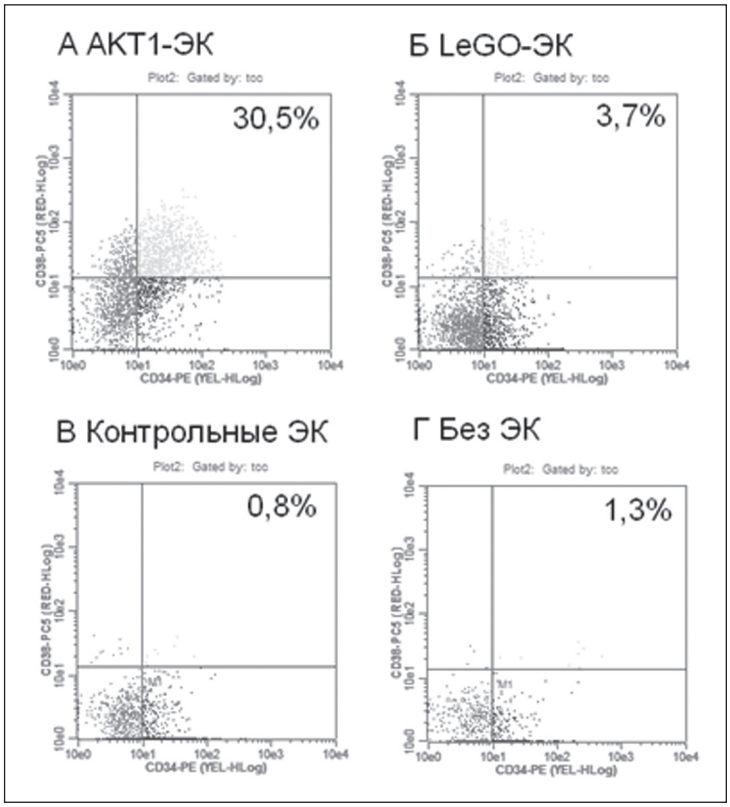


Рисунок 9. Анализ популяции ГСК на 5 день сокультивирования с АКТ1-ЭК (А), LeGO-ЭК (Б), контрольными ЭК (В) в сравнении с отсутствием ЭК (Г) методом проточной цитометрии. На гистограммах на оси абсцисс отложен уровень экспрессии CD34, на оси ординат отложен уровень экспрессии CD38. Указан процент ГСК с двойным позитивным сигналом CD34 CD38 от общего количества клеток.

жизнеспособные контрольные LeGO-ЭК, мы снизали количество трансдуцирующих частиц.

При анализе экспрессии белка Akt1 в АКТ1-ЭК мы обнаружили, однозначную колокализацию свечения eGFP и АКТ1. Только в тех АКТ1-ЭК, которые экспрессировали eGFP мы детектировали АКТ1. Данный факт свидетельствует о том, что только в тех клетках, в которых экспрессируется конструкция с АКТ1, происходит накопление белка Akt1. В контрольных ЭК и LeGO-ЭК был выявлен низкий базальный уровень белка Akt1.

Известно, что при трансдукции часто происходят изменение функциональных свойств и поверхностных маркеров клеток. Мы показали, что АКТ1-ЭК несли на своей поверхности маркеры эндотелиальных клеток, такие как CD31, CD146 и фактор Виллебранда. При этом происходило уменьшение экспрессии последних двух маркеров. Фактор Виллебранда маркирует функционально зрелые ЭК с тельцами Вейбеля-Палладе. Известно, что терминальная дифференцировка свойственна неделящимся клеткам. В наших экспериментах АКТ1-ЭК делились активно и не зависимо от наличия сыворотки в среде культивирования. Можно предположить, что трансдукция АКТ1 приводит к снижению молекул присущих дифференцированным ЭК.

С другой стороны CD31 в АКТ1-ЭК был на схожем уровне, что и в LeGO-ЭК и контрольных ЭК. CD31 был выявлен на протяжении всех клеточных контактов, что согласуется с нашими данными о цитоскелете АКТ1-ЭК с множеством крупных актиновых стрессфибрилл (данные не были представлены).

Известно, что киназа АКТ1 является ключевым звеном сигнального пути PI3K/AKT и вовлечена в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток. Таким образом, ЭК с постоянно активной киназой АКТ1 приобретали независимость от факторов среды. Что и было продемонстрировано в эксперименте с выживаемостью клеток на бессывороточной среде для ГСК -StemSpan. В таких условиях АКТ1-ЭК сохраняли жизнеспособность и даже пролиферировали, что и было необходимо для постановки совместного культивирования с ГСК.

При постановке сокультивирования АКТ1-ЭК с CD34+ клетками пуповинной крови, мы обнаружили, что после пяти дней эксперимента, суммарная популяция CD34+ возросла в 1,4 раза. Мы отметили, что при этом большая часть клеток

(30,5 %) несли на своей поверхности так же CD38+, что говорит о линейной дифференцировке клеток. Известно, что совместное культивирование ГСК с ЭК с конститутивно-активным АКТ1 способствует экспансии ранних стволовых клеток [11]. В наших экспериментах мы наблюдали увеличение популяции более поздних предшественников, имеющих на поверхности маркеры линейной дифференцировки. Надо отметить, что в своей работе мы не проводили удаление предшественников и линейных клеток популяции (Lin-), а сортировали клетки только по маркеру CD34+. Таким образом, часть CD34+ клеток несла на своей поверхности и CD38+.

Мы показали, что внося конструкцию с АКТ1 в ЭК, увеличивается экспрессия гена АКТ1 и происходит накопление белка Akt1, что позволяет клеткам существовать в бессывороточной среде, необходимой для экспансии ГСК. Таким образом, примененный подход является удобным средством изучения взаимодействия гемопоэтических стволовых клеток и предшественников различной иерархии с васкулярной нишей in vitro. В дальнейшем мы планируем изучить факторы, секретируемые АКТ1-ЭК и выявить их роль в регуляции ГСК.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить коллектив сотрудников Перинатального центра ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова за оказанное содействие в наборе материала, а также сотрудников Института молекулярной биологии и генетики за помощь в получении генетических конструкций.

Финансовая поддержка исследования осуществляется за счет гранта «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологических изменённых тканей и органов с использованием стволовых клеток» Государственный контракт № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 г.

Литература

1. *Coskun S., Hirschi K.K.* Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments // Birth Defects Res. C. Embryo Today. — 2010. — Vol. 90. — P. 229–242.

2. *Tse D., Stan R.V.* Morphological heterogeneity of endothelium // Semin Thromb Hemost. — 2010. — Vol. 36. — P. 236–245.

3. *Grassinger J., Haylock D.N., Williams B., et al.* Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential // Blood. — 2010. — Vol. 116. — P. 3185–3196.

4. *Kopp H.G., Hooper A.T., Avecilla S.T., et al.* Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche //Ann. N.Y. Acad Sci. — 2009. — Vol. 1176. — P. 47–54.

5. *Hooper A.T., Butler J.M., Nolan D.J., et al.* Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells // Cell. Stem. Cell. — 2009. — Vol. 4. — P. 263–274.

6. *Dias S., Hattori K., Zhu Z., et al.* Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 106. — P. 511–521.

7. *Li W., Johnson S.A., Shelley W.C., et al.* Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells // Exp Hematol. — 2004. — Vol. 32. — P. 1226–1237.

8. *Butler J.M., Kobayashi H., Rafii S.* Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors // Nat. Rev. Cancer. — 2010. — Vol. 10. — P. 138–146.

9. *Seandel M., Butler J.M., Kobayashi H., et al.* Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. .A. — 2008. — Vol. 105. — P. 19288–19293.

10. *Butler J.M., Nolan D.J., Vertes E.L., et al.* Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells // Cell Stem Cell. — 2010. — Vol. 6. — P. 251–264.

11. *Kobayashi H., Butler J.M., O'Donnell R., et al.* Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells // Nat. Cell. Biol. — 2010. — Vol. 12. — P. 1046–1056.

РОЛЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ПОДДЕРЖАНИИ ЭКСПАНСИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

О.В. Кулемина, Р.И. Дмитриева, П.А. Бутылин, А.Ю. Зарицкий

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Кулемина Ольга Владимировна — клинический ординатор, младший научный сотрудник НИЛ онкогематологии Института гематологии; *Дмитриева Рената Игоревна* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы клеточной биологии Института молекулярной биологии и генетики; *Бутылин Павел Андреевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ онкогематологии Института гематологии; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — профессор, доктор медицинских наук, директор Института гематологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, НИЛ онкогематологии Института Гематологии, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Бутылин Павел Андреевич).

Резюме

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) обнаруживаются в костномозговой нише, которая обеспечивает не только их пролиферацию и дифференцировку, но и поддерживает ГСК в «покоящемся» состоянии. Несмотря на многочисленные исследования, механизмы взаимодействия между ГСК и компонентами ниши остаются неясными. Целью данного исследования являлась оценка динамики функционального состояния, клоногенных и иммунофенотипических характеристик ГСК под влиянием стромальных клеток при совместном культивировании в различных условиях. **Материалы и методы.** Взаимодействие CD34+ГСК и МСК костного мозга, в т.ч. дифференцированных, изучали в различных моделях в условиях совместного культивирования при нормальном и низком содержании кислорода. Экспансию, иммунофенотипические и клоногенные показатели оценивали в период 6 до 17 дней сокультивирования. **Результаты** Общая экспансия ГСК на ранних сроках сокультивирования не зависела от направленности дифференцировки МСК. Дифференцированные МСК оказались не способными поддерживать экспансию примитивной популяции CD34+CD38-. Сохранение CD34+CD38- происходило лучше в условиях гипоксии, а клоногенный потенциал ГСК превосходил в 2 раза ГСК, исследуемые в условиях нормоксии. Низкое напряжение O_2 способствовало нарастанию количества эритроидных прогениторов ГСК, полученных из адгезивной фракции. **Выводы** Дифференцированные МСК оказались не способными поддерживать эффективный гемопоэз. Моделирование условий гипоксии при совместном культивировании с МСК способствовало значительному повышению показателей экспансии ГСК благодаря сохранению примитивной фракции CD34+CD38- и высокой клоногенной способности ГСК.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, экспансия, дифференцированные МСК.

THE ROLE OF STROMAL BONE MARROW CELLS IN MAINTENANCE OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS EXPANSION IN COCULTURE MODEL IN VITRO

O.V. Kulemina, R.I. Dmitrieva, P.A. Butylin, A.Yu. Zaritskiy

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Pavel A. Butylin — senior staff scientist, laboratory of oncohematology).

Abstract

Hematopoietic stem cells located (HSC) in the specialized bone marrow niche, supposed to provide HSC proliferation, differentiation and maintain them quiescent. Despite numerous studies, mechanisms of cell-cell interaction between HSC and niche microenvironment are not clear.

Objective. To estimate the impact of stromal feeder layer on the functional, phenotypic, and clonogenic parameters of HSC. **Design and methods.** We investigated the interaction between CD34+HSC and non-differentiated MSC versus MSC differentiated into adipocytes and osteoblasts in diverse coculture systems, including low and atmosphere oxygen tension conditions. HSC parameters such as expansion, phenotypic and clonogenic characteristics were evaluated after 6 to 17 days coculture. **Results.** Total expansion of HSC did not depend on differentiation of MSC in early terms of co-culture. Differentiated MSC were not able to maintain CD34+CD38- expansion. Primitive population CD34+CD38- preserved better under hypoxia conditions. HSC clonogenicity was 2-fold increased as compared with HSC cultured in atmosphere O_2. Low oxygen tension favored to increase erythroid progenitors from adhesion fraction of HSC. **Conclusion.** Differentiated MSC were not able to maintain efficient hematopoiesis. Low oxygen tension in designed coculture system promoted significant increase of HSC expansion because of CD34+CD38- preservation and staying high HSC clonogenicity.

Key words: Hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, ex vivo expansion, differentiated MSC.

Статья поступила в редакцию 02.11.2012, принята к печати 20.11.2012.

Список сокращений

ГСК — гемопоэтические стволовые клетки
КМ — костный мозг
МСК — мезенхимные стволовые клетки
МСК — адипо — мезенхимные стволовые клетки, дифференцированные в адипоцитарном направлении
МСК — остео — мезенхимные стволовые клетки, дифференцированные в остеогенном направлении
МСК — н/д — мезенхимные стволовые клетки без индуцированной дифференцировки
МНК — мононуклеарные клетки
SA — β — gal — бета — галактозидаза, ассоциированная со старением
CFU — GM — colony forming units — granulocytes, macrophage, колониеобразующие единицы гранулоцитов, макрофагов
CFU — GEMM — colony forming units — granulocytes, erythrocytes, monocytes, megakaryocyte, колониеобразующие единицы гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, мегакариоцитов
CFU — G — colony forming units — granulocytes, колониеобразующие единицы гранулоцитов
CFU — M — colony forming units — macrophages, колониеобразующие единицы макрофагов
CFU — E colony forming units — erythrocytes, колониеобразующие единицы эритроцитов
BFU — E — burst — forming units — erythrocytes, бурст-образующие единицы эритроцитов

Введение

В физиологических условиях гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) поддерживают равновесие зрелых клеток крови с помощью достижения баланса между «покоящимися» в костномозговой нише и активно пролиферируюшими ГСК. Взаимодействие собственно гемопоэтических клеток и иных компонентов ниши играет важную роль в запуске сигнальных путей, регулирующих гемопоэз не только в норме, но и при патологических состояниях.

Гемопоэтическая ниша является сложно функционирующим механизмом, необходимыми элементами которого являются клеточное микроокружение и компоненты внеклеточного матрикса, обеспечивающие баланс между ГСК в состоянии покоя с одной стороны, и пролиферацию и дифференцировку в более зрелые прогениторы — с другой. В настоящее время существует представление о наличии в гемопоэтической нише двух компартментов: остеобластного (эндостийного) и сосудистого [1–3]. Межклеточные взаимодействия, реализуемые в эндостийном пространстве гемопоэтической ниши в виде взаимодействий рецептора Tie-2 ГСК с лигандом ангиопоэтин-1, экспрессирующимся остеобластами [4], а также N-cadherin — опосредованное взаимодействие между ГСК и клетками стромы, обеспечивают адгезию ГСК и поддержание их в «покоящемся» состоянии [5].

Помимо перечисленных межклеточных взаимодействий, важную роль в поддержании состояния покоя гемопоэтических клеток играет низкое напряжение кислорода. Выяснено, что наиболее медленно делящиеся и «покоящиеся» ГСК [6], занимают пространство в кроветворной нише с наиболее низким напряжением O_2 [7, 8], что, в первую очередь, связано с протективным действием гипоксии от повреждающего действия свободно радикальных форм кислорода на ранние ГСК.

ГСК также обнаруживаются и в сосудистой нише — в окружении эндотелиальных клеток си-

нусоидов и перицитов. Предполагают, что эта ниша формирует микроокружение, способствующее пролиферации, дифференцировке и трансэндотелиальной миграции гемопоэтических клеток [9].

Несмотря на большое количество исследований, направленных на изучение межклеточных взаимодействий в кроветворной нише костного мозга, конкретные механизмы реализации контроля гемопоэза клетками гемопоэтической ниши до сих пор остаются неясными.

Одним из основных вариантов изучения этих механизмов и моделирования гемопоэтической ниши in vitro остается культивирование ГСК на различных вариантах «питающей» стромы.

Dexter впервые описал возможность поддержания продукции гранулоцитов на различных стадиях зрелых клеток в течение 10 недель с помощью совместного культивирования ГСК костного мозга с клетками тимуса [10]. Подобные эксперименты продемонстрировали, что «фидерный» слой клеток может служить элементом микроокружения для поддержания примитивной фракции гемопоэтических клеток [11].

Позже Fridenstein показал, что стромальные фибробласты костного мозга (КМСФ) играют существенную роль в поддержании гемопоэза в гетеротопной модели с формированием активных очагов кроветворения реципиента через 6 недель после трансплантации донорских КМСФ [12].

Характеристиками ранее описанных КМСФ обладают мезенхимные стволовые клетки (МСК). Известно, что МСК способны к мультипотентной дифференцировке [13] и являются важным компонентом гемопоэтической ниши. Кроме того, они способствуют поддержанию ГСК in vitro не только благодаря формированию межклеточных взаимодействий, но и секреции факторов, оказывающих регуляторные действие на ГСК [14–16, 25].

Гемопоэтические прогениторные стволовые клетки костного мозга характеризуются наличием CD34 антигена, в тоже время, представляя собой гетерогенную популяцию клеток, большая часть которых является коммитированными предшественниками в эритроидном, лимфоидном или миело-моноцитарном направлениях [17]. Мультипотентная природа ГСК становится очевидной по мере восстановления нормального поликлонального гемопоэза у реципиента после успешно проведенной трансплантации ГСК, что является критерием ее эффективности. По мере приобретения признаков функционально более зрелой клетки определенной линии дифференцировки, ГСК вначале теряет способность к самообновлению, а затем и пролиферативную активность. Первым на коммитированных предшественниках появляется CD38 антиген, который характеризует дальнейшее направление дифференцировки клетки в коэкспрессии с другими линейными маркерами [18]. Таким образом, популяция CD34+CD38- ГСК является примитивной, обладающей высоким клоногенным потенциалом, что позволяет использовать ее для достоверной оценки динамики гемопоэза in vitro.

В нашем исследовании мы рассматривали несколько вариантов in vitro моделей гемопоэтической ниши, чтобы оценить влияние различных стромальных клеток на кинетику субпопуляций ГСК, полученных в результате экспансии в условиях совместного культивирования, в т.ч. при низком напряжении O_2.

Материалы и методы

Получение CD34+ гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга

Аспират костного мозга получали от гематологически здоровых доноров, подписавших информированное согласие, путем проведения пункции гребня подвздошной кости. Полученный материал переносили в пробирки с K_2ЭДТА и тщательно перемешивали путем многократного переворачивания пробирки. Выделение МНК костного мозга проводилось по стандартному протоколу с использованием осаждения по градиенту плотности (Ficoll — Paque PLUS, GE Healthcare, Великобритания). Для свежевыделенных МНК по CD34+ использовали магнитный активированный клеточный сортинг (MACS) на колонках MS для системы MiniMACS Separator (Miltenyi Biotec, Германия) со специфическим набором для получения CD34+ клеток согласно протоколам производителя.

Получение культуры мезенхимных стволовых клеток костного мозга

Мезенхимные стволовые клетки костного мозга получали из мононуклеарной фракции костного мозга гематологически здоровых доноров согласно стандартным протоколам [19]. Фенотипический контроль образцов МСК производился с помощью флуоцитометрии со стандартной панелью антител: все образцы были позитивны по CD90, CD105, CD73 и CD146, негативны — по CD34 и CD45. В качестве питающей стромы использовали МСК второго пассажа. Старение МСК оценивалось визуально с помощью биомаркера β — галактозидазы, ассоциированной со старением (SA — β — gal), ввиду активности лизомального фермента SA-β-gal в «стареющих» человеческих фибробластах, но

не в покоящихся и дифференцированных клетках [21]. Количество позитивных SA-β-gal+ МСК не превышало 5 %.

С целью моделирования гемопоэтической ниши, в качестве питающей «подложки» использовали также МСК, дифференцированные в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Индукция дифференцировок проводилась по стандартным протоколам в питательной среде αMEM, обогащенной 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone, Thermo Scientific, США) с добавлением 1 % раствора L-глутамина и 1 % раствора пенициллин/стрептомицина, содержащей: 1 — метил — 3 — изобутилксантин 0,5 мМ, дексаметазон 100 нМ, инсулин 10мкг/мл для адипоцитарной; дексаметазон 100нМ, L — аскорбиновая кислота 50 мкМ, β — глицерол фосфат 10 мМ — для остеогенной дифференцировок [13]. Для получения индуцированного фенотипа МСК культивировались при стандартных условиях (pCO_2 = 5 %, t^0 = 37^{0}C) в течение 7 — 10 дней.

Сокультивирование CD34+ ГСК с МСК костномозгового происхождения

МСК без индуцированной дифференцировки (далее — МСК — н/д) высаживались в 12–24 — луночные планшеты по 30000 — 60000 клеток в каждую лунку и культивировались до достижения конфлюентности. Далее, с учетом вариантных условий моделирования гемопоэтической ниши, МСК подвергались индуцированной дифференцировке, как описано ранее. Суспензия CD34+ГСК высаживалась на поверхность МСК в количестве 20000–30000 клеток/лунку. Дальнейшее сокультивирование производилось в бессывороточных гемопоэтических средах: StemSpan (Stemcell, Канада), обогащенной IL — 3 50 нг/мл, SCF 150 нг/мл, Flt-3L 150 нг/мл и HPC — expansion media (Promocell, Германия), с добавлением стандартной цитокиновой смеси Cytokine Mix E. Смена ½ объема среды проводилась каждые 72 часа.

Для оценки влияния низкого парциального давления O_2, часть экспериментов проводилась в условиях гипоксии: pCO_2 = 5 %, pN_2 = 90 %, инсуффляции кислорода с pO_2 = 5 %. Время сокультивирования определялось выбранными условиями эксперимента и варьировало от 6 до 17 дней.

Получение ГСК после сокультивирования с МСК

Для анализа использовали 2 фракции ГСК: суспензионную и адгезивную.

Суспензионная фракция собиралась путем аккуратного отбора среды над поверхностью МСК и трехкратного промывания прикрепленных клеток фосфатно-солевым буфером. Адгезивную фракцию получали энзиматическим путем с помощью добавления 0,05 % трипсина и инкубации при 37^{0}C и 5 % CO_2 в течение 5 минут.

Иммунофенотипирование полученных фракций ГСК

После сбора каждая фракция ГСК оценивалась на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, Becton Dickinson, США; Guava EasyCyte, США) с предварительным инкубированием по протоколу производителя со следующим набором антител: CD45-FITC (Dako, США), CD38-PC5 (Beckman Coulter, США), CD34-PE (Dako, США) и изотипическими контролями. Оценивалось количество ГСК с примитивным иммунофенотипом CD34+CD38-. Прирост общего количества культивируемых ГСК и CD34+CD38- оценивался отношением конечного количества ГСК и CD34+CD38- клеток после культивирования к этим же параметрам в исходном образце.

Оценка клоногенной способности ГСК

Функциональная активность ГСК адгезивной и суспензионной фракций оценивалась по способности образовывать колонии прогениторных клеток в бессывороточной среде Methocult (Stemcell, США) согласно протоколу производителя. По истечении сроков инкубации (12 дней, pCO_2 = 5 %, t^0 = 37^{0}C) анализировали колонии визуально с подсчетом количества CFU-GM, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M, CFU-E и BFU-E.

Статистический анализ

Все эксперименты были выполнены в 2–5 кратных повторах. Значения представлены как среднее значение ± стандартное отклонение от среднего значения. Достоверность различий определяли с использованием парного критерия Стьюдента. Полученные значения относили к статистически достоверным при p менее 0,05.

Результаты

Взаимодействие между стромальными клетками и CD34+ГСК исследовалось в трех последовательных моделях.

В первой модели проводилось сокультивирование CD34+ ГСК с МСК без индуцированной дифференцировки и дифференцированными в остеогенном и адипоцитарном направлениях. Общая экспансия CD34+ ГСК при сокультивировании в течение 6 дней с как МСК-н/д, так и МСК — адипо и МСК — остео существенно не отличалась и увеличилась в 5,2 ± 0,2 раз, 5,73 ± 0,2 раз, 6,7 ± 0,2 раз, соответственно.

При контрольном культивировании CD34+ ГСК без питающей стромы уровень прироста оказался существенно ниже, увеличение произошло в 2,5 ± 0 раза (Рис. 1.) n = 5, p<0,05.

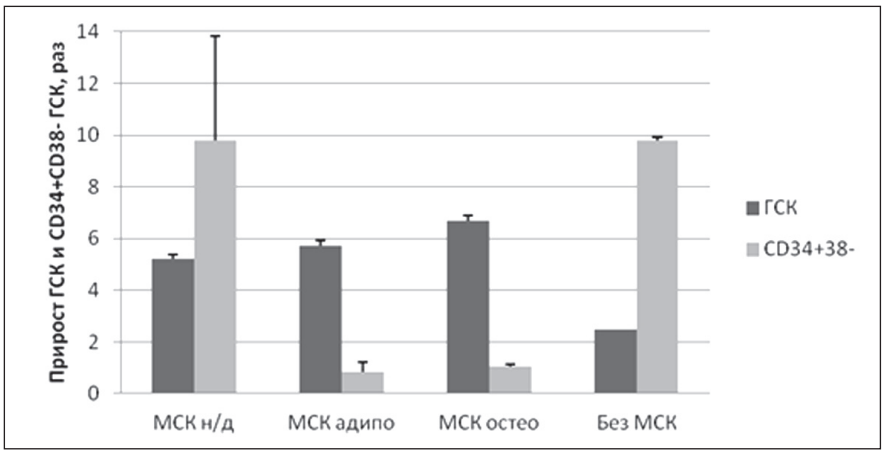


Рисунок 1. Динамика прироста общего количества ГСК и CD34+38- фракции при культивировании с дифференцированными и недифференцированными МСК

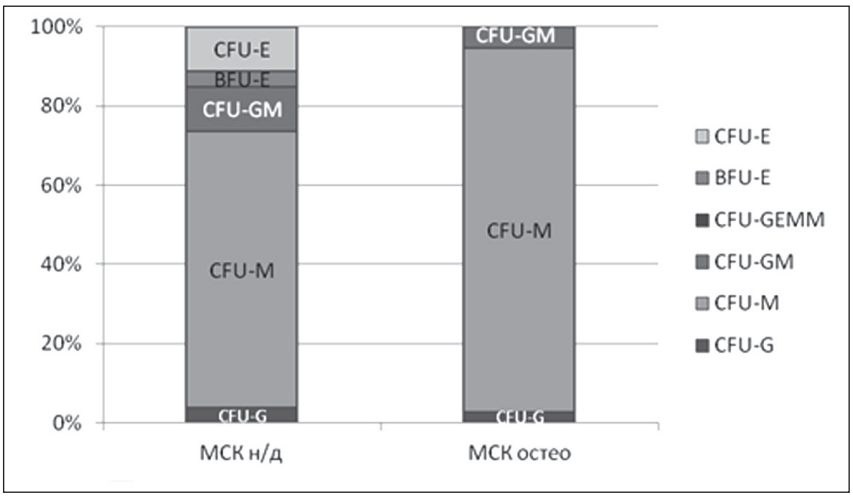


Рисунок 2. Клоногенность ГС'К КМ при сокулытивировании с МСК недифференцированных н дифференцированных в остеогенном направлении в условиях нормоксии

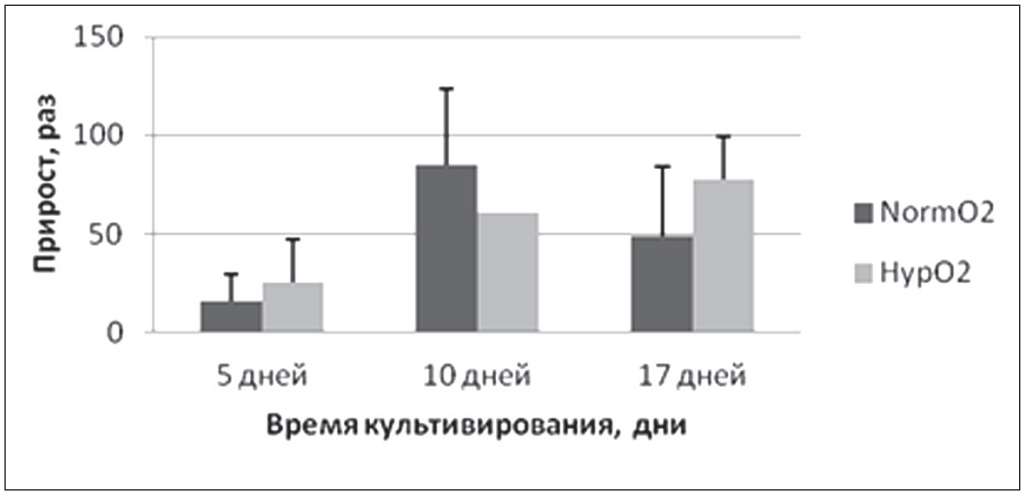


Рисунок 3. Сравнение динамики прироста CD34+CD38-при культивировании с МСК в условиях нормоксии и гипоксии

Оценка примитивной фракции ГСК с иммунофенотипом CD34+CD38- в данной модели оказалась более демонстративной: наибольший прирост CD34+CD38- ГСК выявлен при культивировании без МСК и на поверхности МСК, не подвергавшихся дифференцировке и составил 9,8 ± 4,0 раз и 7,2 ± 0,1 раз, соответственно.

При сокультивировании с МСК, индуцированными к дифференцировке в адипоцитарном и остеогенном направлениях, популяция CD34+CD38- суспензионной фракции не претерпевала значительных колебаний от изначального уровня при сокультивировании с МСК — остео. При сокультивировании с МСК — адипо наблюдалось относительное уменьшение примитивной популяции в 0,86 ± 0,2 раза.

Во второй серии экспериментов проводилась оценка клоногенной способности ГСК, полученных в результате сокультивирования с МСК — остео. Несмотря на меньшее количество ГСК в суспензионной фракции к 12 дню сокультивирования с МСК-остео, клоногенная способность этих клеток оказалась вдвое выше, в сравнении с использованием МСК — н/д в качестве стромы для ГСК (280 ± 56,6 колоний против 132,5 ± 24,7 колоний). Необходимо отметить, что такая разница достигалась за счет превалирующего количества CFU — M (Рис. 2.) n = 2.

Третья серия экспериментов была направлена на изучение динамики количества и функциональной активности ГСК в зависимости от сроков культивирования и напряжения O_2.

Общее количество ГСК нарастало к 17 суткам культивирования, как при наличии МСК — н/д, так и при культивировании без стромальной поддержки: 157 ± 27,1 раз против 90 ± 10,8 раз ($p<0,05$). При сравнении экспансии ГСК при сокультивировании с МСК в разных условиях содержания O_2 наблюдали больший прирост ГСК при культивировании в условиях нормоксии (157 ± 27,1 раз), чем в гипоксии (110 ± 28,3раз), однако, различия оказались недостоверными ($p>0,05$).

Прирост CD34+CD38- фракции также оказался существенно выше при культивировании в присутствии стромальной поддержки (чем без нее). В условиях нормоксии к 17 дню составил 49 ± 35,3 раз против 14,25 ± 5,3 раз, а в гипоксии — 78 ± 21,4 раз против 19 ± 15,4 раз. Необходимо отметить, что нарастание CD34+CD38- фракции ГСК в условиях гипоксии происходило постепенно и к 17 дню превосходило показатели прироста при культивировании в условиях нормоксии. (Рис. 3.)

При анализе фракций в условиях нормоксии при сокультивировании с МСК наблюдали максимальное количество CD34+CD38- клеток, как суспензионной, так и адгезивной фракции к 10 дню, однако, соотношение этих фракции оказалось 5,8:1, а к 17 дню составило 13,1:1. В условиях гипоксии при сокультивировании с МСК отмечалось постепенное нарастание как суспензионной, так и адгезивной фракций CD34+CD38-ГСК, однако, их соотношение менялось: на 5 день — 7,1:1, на 10 день — 2,2:1, на 17 день — 1,6:1.

Клоногенная способность ГСК, принадлежащих суспензионной или адгезивной фракциям, снижалась по мере увеличения срока сокультивирования.

При анализе колоний заметно, что на ранних сроках сокультивирования (5 дней) с МСК в условиях нормо — и гипоксии ГСК обеих фракций способны образовывать полиолигопотентные колонии (CFU — GM и CFU — GEMM) в сравнимых соотношениях. Но в тоже время, заметна и избирательность влияния гипоксии на формирование эритроидных предшественников в сторону их увеличения в адгезивной фракции ГСК, что сохраняется и к 17 дню сокультивирования (Рис. 4.).

Обсуждение

Несмотря на то, что накоплено много данных о возможности экспансии ГСК в средах, обогащенных факторами роста, такой вариант культивирования подразумевает постепенное нарастание пролиферативного потенциала и дифференцировку в прогениторные клетки с потерей черт «стволовости».

Одним из главных признаков эффективного гемопоэза является не просто увеличение количества гемопоэтических клеток, но и сохранение «покоящихся», способных к самоподдержанию ГСК. Для обеспечения эффективного гемопоэза ex vivo и in vivo требуется стромальная «поддержка» ГСК, функции которой могут выполнять МСК [9, 21, 22]. Было показано, что МСК не только участвуют в формировании межклеточных взаимодействий, но и секретируют специфические лиганды и хемокины, способствующие поддержанию ГСК [23]. В данном исследовании продемонстрировано влияние различных вариантов стромы на функциональное состояние ГСК, иммунофенотипические характеристики и клоногенные параметры ГСК.

Мы исследовали различные варианты взаимодействия МСК, выбранных в качестве стромальной «поддержки» CD34+ГСК в попытке воссоздания гемопоэтической ниши in vitro. Было показано, что на ранних сроках сокультивирования, вне зависимости от направления дифференцировки МСК, экспансия ГСК происходит практически на одном уровне.

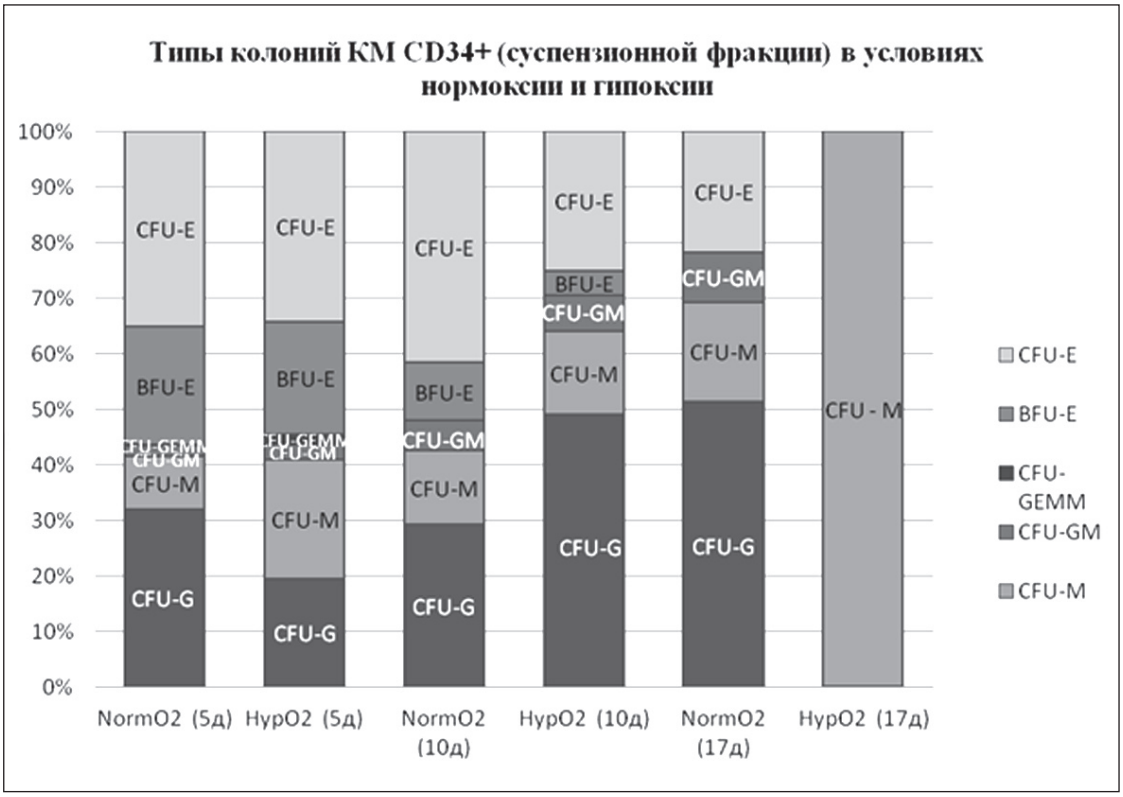
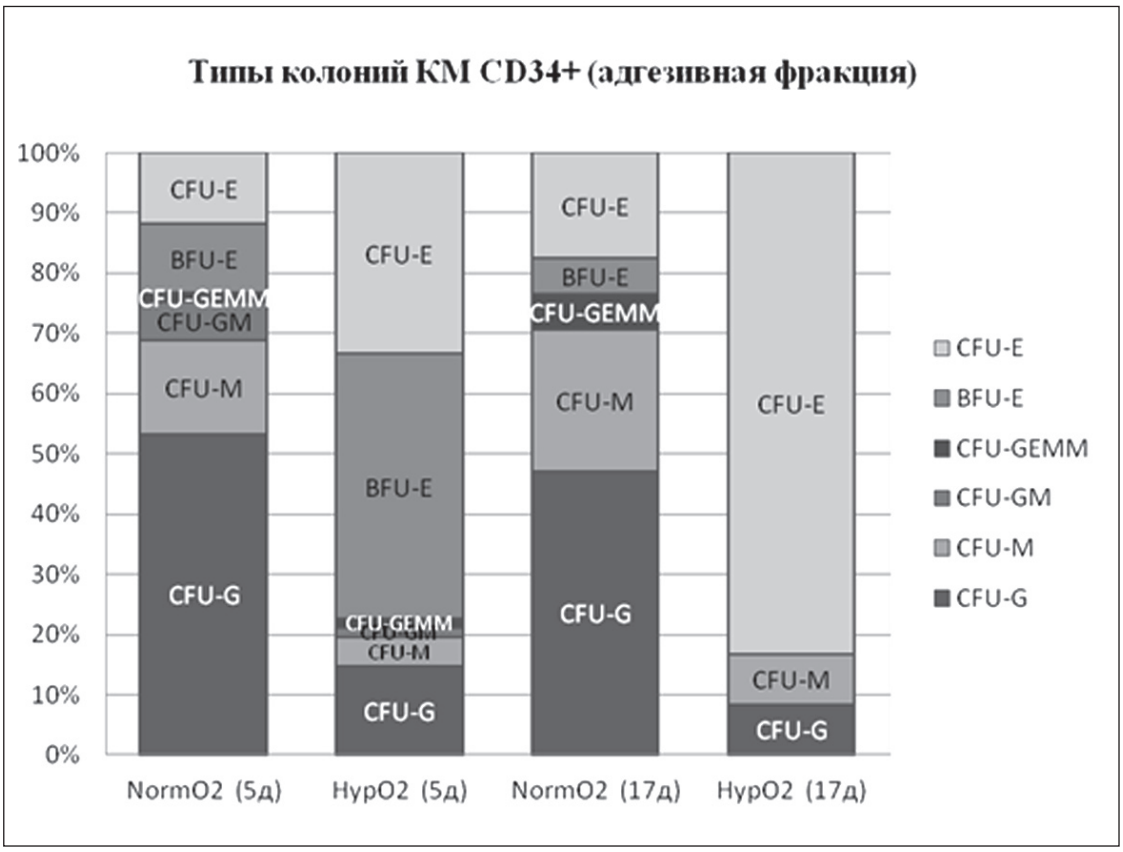


Рисунок 4. Типы колоний КМ CD34+ (суспензионной фракции) в условиях нормоксии и гипоксии



Типы колоний КМ CD34+ (адгезивная фракция)

Однако, при оценке примитивной популяции CD34+CD38- оказывается, что дифференцированные в остеогенном и адипоцитарном направлениях МСК не способны поддерживать экспансию этой популяции. Эти данные находят подтверждение при оценке колониеобразующей способности ГСК, после сокультивирования с МСК, дифференцированными в остеобласты: несмотря на увеличение количества образованных колоний в 2 раза, состав колоний отличался преобладанием колоний уни — и олигопотентных прогениторов. Отсутствие колоний типа CFU — GEMM, являющихся первичными мультипотентными прогениторами ГСК, свидетельствует о дифференцировке ГСК в сторону более зрелых прогениторов, а также об истощении пула примитивных ГСК, способных к самоподдержанию, а значит и поддержанию гемопоэза.

При изменении условий сокультивирования с целью оценки влияния гипоксии было замечено, что низкое pO_2 способствует лучшему сохранению и воспроизведению примитивной популяции CD34+CD38- даже при длительных сроках культивирования.

Известно, что наиболее ранние прогениторы в исследованиях ex vivo экспансии ГСК обнаруживаются связанными со стромой. Нами показано, что адгезивная фракция ГСК не только сохраняется в условиях культивирования в гипоксии, но и постепенно нарастает к 17 дню сокультивирования, чего не было обнаружено в условиях атмосферного O_2. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [7].

Интересно, что с увеличением срока сокультивирования, в условиях гипоксии происходит нарастание количества эритроидных прогениторов ГСК, полученных из адгезивной фракции. Существуют противоречивые данные о роли фактора HIF-1 в регуляции гемопоэза у взрослых. Возможно, что стимуляция эритроидной дифференцировки под влиянием гипоксии может быть связана с контролем гена эритропоэтина и рецептора Epo факторами HIF-1α и HIF-2α [24].

Как в условиях нормоксии, так и в гипоксии даже на длительных сроках сокультивирования в адгезивной фракции ГСК сохранялись полиолигопотентные прогениторы. В суспензионной фракции с увеличением длительности культивирования в разных условиях напряжения O_2 закономерно уменьшалось количество мультипотентных прогениторов в сторону более коммитированных.

В качестве заключения следует отметить, что костномозговая ниша является сложной комплексной системой, необходимым элементом которой являются не только гемопоэтические клетки, но и МСК, что важно учитывать при моделировании ниши. В нашем исследовании дифференцированные МСК оказались не способными поддерживать эффективный гемопоэз. Использование гипоксии при совместном культивировании с МСК способствовало значительному повышению показателей экспансии ГСК, в первую очередь, благодаря сохранению примитивной фракции CD34+CD38-.

Благодарности

Авторы хотели бы выразить благодарность сотрудникам Института гематологии и содрудникам Перинатального центра за помощь в заборе материала для исследований.

Поддержка

Работа выполнена в рамках Государственного Контракта от 27 июля 2010 г. № 14.740.11.0004 «Изучение системных механизмов взаимодействия нормальных гемопоэтических стволовых клеток и лейкемических клеток с клетками костномозговой ниши»

Литература

1. *Jones D.L., Wagers A.J.* No place like home: anatomy and function of the stem cell niche // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2008. — Vol. 9. — P. 11–21.

2. *Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H. et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size // Nature. — 2003. — Vol. 425. — P. 836–841.

3. *Arai F., Hirao A., Suda T.* Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches // Int J Hematol. — 2005. — Vol. 82. — P. 371–376.

4. *Arai F., Hirao A., Ohmura M. et al.* Tie2 / angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche // Cell. — 2004. — Vol. 118. — P. 149–161.

5. *Wein F., Pietsch L., Saffrich R. et al.* N-cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells // Stem. Cell. Res. — 2010 — Vol. 4. — P. 129–139.

6. *Kubota Y., Takubo K., Suda T.* Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche // Biochem Biophys Res Commun. — 2008. — Vol. 366. — P. 335–339.

7. *Jing D., Wobus M., Poitz D.M. et al.* Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro // Haematologica. — 2012. — Vol. 97. — P. 331–339.

8. *Kalindi Parmar., Peter Mauch, Jo-Anne Vergilio, Robert Sackstein, and Julian D.* Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104. — P. 5431–5436.

9. *Sugiyama et al.* Maintenance of the haematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell nishes // Immunity. — 2006. — Vol. 25. — P. 977–988.

10. *Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G., Schofield R., Lord B.I.* Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells in vitro // J. Cell Physiol. — 1973. — Vol. 82. — P. 461–473.

11. *Dexter T.M., Wright E.G., Krizsa F., Lajtha L.G.* Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures // Biomedicine. — 1977. — Vol. 27. — P. 344–349.

12. *Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G.* Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro // Br. J. Haematol. — 1997. — Vol. 97 — P. 561–570.

13. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al.* Marshak. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells // Science 2. — 1999. — Vol. 284. — P. 143–147.

14. *Breems D.A., Blokland E.A., Siebel K.E. et al.* Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells // Blood. — 1998. — Vol. 91. — P. 111–117.

15. *Gottschling S., Saffrich R., Seckinger A. et al.* Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1 — integrin — dependent mechanism // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25. — P. 798–806.

16. *Wagner W., Roderburg C., Wein F. et al.* Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25. № 10. — P. 2638–2647.

17. *Civin I., Banquerigo M.L., Strauss L.C., Loken M.R.* Antigenic analysis of hematopoiesis. Characterization of MY10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. // Exp Hematol. — 1987. — Vol. 15. — P. 10.

18. *Terstappen L.W., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M. and MR.* Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells // Blood. — 1991. — Vol. 77. — P. 1218–1 227.

19. *Paulette A. Conget, José J.* Minguell. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells //Journal of Cellular Physiology. — 1999. — Vol. 181., — P. 67–73.

20. *Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 9363–9367.

21. *Battiwalla M., Hematti P.* Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation // Cytotherapy. — 2009. — Vol. 11. — P. 503–515.

22. *Devine S.M., Hoffman R.* Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation // Curr Opin Hematol. — 2000. — Vol. 7. — P. 358–363.

23. *Wagner W., Roderburg C., Wein F.. et al.* Ho. Molecular and Secretory Profiles of Human Mesenchymal Stromal Cells and Their Abilities to Maintain Primitive Hematopoietic Progenitors // Stem cells. — 2007. — Vol. 10. — P. 2638–2647.

24. *Percy M.J., Furlow P.W., Lucas G.S.et al.* A gain-of-function mutation in the HIF2α gene in familial erythrocytosis // N. Engl. J. Med. — 2008. — Vol. 358. — P. 162–168.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ТРОМБОЛИЗАТА — МОДЕЛЬ МИЕЛОФИБРОЗА IN VITRO

Е.Н. Булычева, А.Ю. Зарицкий, П.А. Бутылин

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Булычева Екатерина Николаевна — лаборант-исследователь, ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Институт гематологии, НИЛ онкогематологии; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — профессор, доктор медицинских наук, директор Института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Бутылин Павел Андреевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Институт гематологии, НИЛ онкогематологии.

Контактная информация:
ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Институт гематологии, НИЛ межклеточных взаимодействий и регенерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Бутылин Павел Андреевич).

Резюме

Разработка и изучение модели миелофиброза *in vitro* — актуальный вопрос, решение которого позволит выявить механизмы развития заболевания и потенциальные мишени для терапии. **Целью** работы является изучение свойств мезенхимных стволовых клеток (МСК) при культивировании их на человеческом тромболизате. **Материалы и методы.** МСК от здоровых доноров и пациентов с первичным миелофиброзом (ПМФ) культивировали на средах с различными концентрациями человеческого тромболизата (ТЛ). Оценивали пролиферативную активность, концентрацию белков внеклеточного матрикса (ВКМ), способность к остеогенной и адипогенной дифференцировке. Концентрацию ростовых факторов (bFGF, VEGF) в тромболизате от 11 больных ПМФ измеряли с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Пролиферативная активность МСК, культивированных на высоких концентрациях тромболизата (10–20 %), достоверно не отличалась от контрольных условий. Максимальное количество белков ВКМ было синтезировано клетками на средах с 15 % ТЛ. Использование ТЛ для культивирования не приводило к изменению их способности к дифференцировке в остеогенном направлении, но при повышении концентрации ТЛ способность к адипогенной дифференцировке снижалась. Концентрация bFGF в ТЛ от пациентов достоверно превышает таковое в ТЛ контрольной группы (172,67 пг/мл и 72,7 пг/мл, соответственно); концентрация VEGF также была достоверно выше (514,25 пг/мл и 205,26 пг/мл, соответственно). МСК от больных ПМФ имели тенденцию к большей пролиферативной активности при культивировании на ТЛ по сравнению с МСК от здоровых доноров. **Выводы.** Культивирование МСК на тромболизате может быть расценено как модель миелофиброза *in vitro*, так как приводит к профибротическим изменениям клеток стромы костного мозга.

Ключевые слова: первичный миелофиброз, тромболизат, мезенхимные стволовые клетки, модель миелофиброза *in vitro*.

CULTURING OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS USING HUMAN PLATELET LYSATE — A MODEL OF MYELOFIBROSIS IN VITRO

E.N. Bulycheva, A.Yu. Zaritskey, P.A. Butylin

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: butylin_pa@almazovcentre.ru (Pavel A. Butylin — senior staff scientist, laboratory of oncohematology).

Abstract

Study of the primary myelofibrosis (PMF) model *in vitro* is important, as it can lead us to the understanding of the PMF pathogenesis and finding new targets for therapy. **Objectives.** Here we study properties of mesenchymal stromal cells (MSC) while culturing them on human platelet lysate (HPL). **Design and methods.** Bone marrow MSC from healthy donors and patients with PMF were cultured in presence of varying concentrations of HPL. We measured proliferative activity, concentration of extracellular matrix proteins (ECM) and their capability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) was determined in HPL from eleven patients with PMF using specific ELISA kits. **Results.** The highest proliferative rate of MSC was reached in the culture condition with high HPL concentration (15–20 %). Amount of ECM was highest, when we used 15 % HPL. MSC did not lose their osteogenic differentiation capacity when using HPL, but there was a tendency to decrease in differentiation into adipogenic lineage. Further, we observed a significant increase in VEGF and bFGF concentration (2,5 and 2,4 fold, respectively, compared to the age-matched healthy controls, $p<0.01$) in HPL from patients with PMF. MSC from patients with PMF tended to proliferate more actively in comparison to the cells from healthy donors. **Conclusion.** Culturing the MSC using varying concentrations of HPL can be considered as a model of PMF *in vitro*, as it leads to the profibrotic changes in bone marrow stromal cells.

Key words: primary myelofibrosis, platelet lysate, mesenchymal stromal cells, model of PMF *in vitro.*

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 20.10.2012.

Введение

Первичный миелофиброз (ПМФ) — хроническое миелопролиферативное заболевание, особенностью которого является раннее и значительное развитие фиброза костного мозга.

Ежегодно количество случаев заболевания ПМФ составляет 0,3–0,4/100000 населения [1, 2]. Распространенное мнение о доброкачественности течения этого заболевания не относится ко всем больным и не подтверждается статистическими данными: медиана выживаемости варьирует от 1,4 до 9,1 года. Частота бластной трансформации достигает 30 % [3]. Общая средняя продолжительность жизни больных составляет всего 5 лет [4, 5].

В настоящее время считается, что одну из ключевых ролей в процессе миелофиброза играют вещества, продуцируемые мегакариоцитами, тромбоцитами и моноцитами [6, 7], однако механизмы, с помощью которых эти факторы выделяются в гемопоэтическую нишу, до сих пор остаются дискутабельными.

Клетки стромы костного мозга отвечают повышением фиброгенной активности в ответ на ростовые факторы, по тем или иным причинам выделяемые клетками гемопоэтического ряда. Среди них наибольший интерес представляют TGF-β, PDGF, bFGF, VEGF и PF-4. Примечательным является тот факт, что эти факторы, являющиеся регуляторами биосинтеза внеклеточного матрикса (ВКМ), также представляют собой медиаторы, влияющие на пролиферацию фибробластов и эндотелиальных клеток [8]. В настоящее время существует две модели *in vivo*, позволяющие получать у исследуемых объектов изменения, напоминающие первичный миелофиброз. Одна из этих моделей представляет собой мышей с гиперэкспрессией гена тромбопоэтина — основного физиологического фактора, стимулирующего мегакариопоэз [9]. Симптомокомплекс, развивающийся у этих животных, включает в себя значительно повышенный уровень тромбопоэтина, гиперплазию мегакариоцитов в костном мозге, селезенке, печени и лимфатических узлах, повышенное количество тромбоцитов, а также миелофиброз и остеосклероз, развивающийся через 10 недель после трансплантации.

Вторая модель, разработанная группой исследователей во главе с Vannucchi, свидетельствует о том, что дефект по гену GATA1 с течением времени приводит у мышей к клинической картине, соответствующей первичному миелофиброзу [10]. Фактор транскрипции GATA1 участвует в генерации из стволовой клетки мегакариоцитарных предшественников и эритроидно-мегакариоцитарных колоний. При дефекте данного гена у мышей наблюдалась тяжелая тромбоцитопения, однако количество мегакариоцитов в костном мозге и селезенке было значительно повышено. В культурах такие мегакариоциты обладали резко увеличенной пролиферативной активностью, однако формирование протромбоцитов было снижено. Фибро-остеосклеротические изменения в костном мозге начинались в возрасте 1 года и становились очевидными в течение последующих 6 месяцев. Миелоидная метаплазия, как правило, развивалась в селезенке и печени, реже — в легких.

Модель миелофиброза *in vitro* может быть сформирована при культивировании клеток стромы костного мозга в условиях, приводящих к усилению их профибротических свойств. Добавление тромболизата (ТЛ) в питательные среды может быть примером таких условий. Возможности использования человеческого тромболизата для культивирования МСК в настоящее время активно изучаются и представляются перспективными [11–13].

Тромболизат способствует более быстрому росту колоний МСК, но не увеличению их количества, так что время достижения конфлюэнтности уменьшается. По всей видимости, такой эффект реализуется за счет ростовых факторов (bFGF, TGFβ, PDGF и др.), количество которых в тромболизате достаточно для амплификации МСК, что делает культивирование в данных условиях экономически выгодным. Их функциональные характеристики, такие как способность к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке, согласно литературным данным, принципиально не изменялись [14], хотя различия тромболизатов от разных доноров могут вносить некоторую вариабельность [15].

Целью данной работы является изучение свойств мезенхимных стволовых клеток при культивировании их на человеческом тромболизате, как пример модели первичного миелофиброза *in vitro*.

Материалы и методы

1. Пациенты

Образцы периферической венозной крови объемом 8–12 мл были получены от 11 пациентов (6 мужчин и 5 женщин) с диагнозом «Первичный миелофиброз», средний возраст которых составил 57 лет (24–74 года). Средняя длительность заболевания от момента верификации диагноза составила 66 месяцев (1–252 месяца). Семеро пациентов на момент обследования уже получали химиотерапевтические средства (гидроксимочевина, преднизолон). Терапию дезагрегантами получали также 7 пациентов, при этом последний прием препарата приходился на вечер суток, предшествующих забору крови. Контрольные образцы были получены от семи доноров (3 мужчины и 4 женщины), не имеющих гематологических заболеваний. Средний возраст их составил 60 лет (55–65 лет).

2. Получение тромболизата

8–12 мл периферической венозной крови больных ПМФ и контрольной группы забирали в вакуумные пробирки с K_3ЭДТА. Затем центрифугировали при 300g в течение 10 минут для получения плазмы, богатой тромбоцитами, которую разводили 1:1 в фосфатно-буферном растворе и центрифугировали при 3000g 20 минут. Надосадочную жидкость убирали, а осадок замораживали при температуре -40^{0}С. Замораживание и оттаивание осуществлялось трижды для лизирования тромбоцитов, после чего полученный лизат центрифугировали для осаждения мембран тромбоцитов. Полученная надосадочная жидкость являлась тромболизатом. Тромболизат из пулированного тромбоконцентрата от 4 здоровых доноров был получен на Станции переливания крови ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова».

3. Получение МСК костного мозга

Аспирация костного мозга проводилась квалифицированным персоналом в условиях манипуляционной гематологического отделения. Забор образцов аспирата костного мозга для выделения клеточных популяций производился в пробирки с K_3ЭДТА. Для получения фракции мононуклеаров из костного мозга применяли метод фиколльного градиента. Для селекции по адгезии выделенные на фиколльном градиенте клетки высевали в культуральные флаконы и культивировали в минимальной среде Игла в модификации альфа с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), L-глутамина и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин, гентамицин). Через 24–48 часов неприкрепившиеся клетки отмывали. Смена питательной среды осуществлялась 1 раз в 2–3 дня. Для получения следующего пассажа МСК их переносили во фласк площадью 75 см^2 и далее культивировали с использованием культуральной среды во влажной атмосфере с 6 % CO_2 при 37 С^0.

4. Оценка пролиферативной активности МСК

Количество жизнеспособных клеток в культуре определяли колориметрически с помощью реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид; Sigma). Кристаллы МТТ растворяли в фосфатном буферном растворе (PBS) в концентрации 5 мг/мл. Полученный раствор разбавляли в 10 раз и добавляли к клеткам, после чего инкубировали их при 37^{0}С в течение 2 часов. Для растворения кристаллов формазана к клеткам добавлялся диметилсульфоксид (ДМСО). Спустя несколько минут при комнатной температуре, после того как все кристаллы растворились, измерялась интенсивность окрашивания при длине волны 570 нм на спектрофотометре Synergy 2 BioTeK.

5. Количественное определение белков внеклеточного матрикса

Для измерения концентрации белков внеклеточного матрикса МСК снимали с пластика с помощью холодного раствора Версена. Достоверность снятия всех клеток подтверждалась микроскопически. Затем белок растворялся с помощью 0,5 М раствора NaOH. К полученному раствору добавляли реагент

BCA (бицинхониновая кислота), инкубировали 30 минут при 37^0C, после чего регистрировали интенсивность окрашивания при 562 нм.

6. Определение способности к остеогенной и адипогенной дифференцировке

Для стимуляции адипогенной дифференцировки к обычной культуральной среде добавляли: 1мкМ дексаметазона (Sigma), 5 мкг/мл инсулина (Gibco-BRL; Carlsbad), 0,5 мМ изобутилметилксантина (Sigma). Для стимуляции остеогенной дифференцировки добавляли: 1 мкМ дексаметазона (Sigma), 10 mM бета-глицерофосфата (Sigma) и 50 мкМ аскорбиновой кислоты. Для этого заменяли культуральную среду в лунках на остеогенный или адипогенный дифференцирующий раствор и инкубировали во влажной атмосфере с 6 % CO_2 при 37^0C. Остеогенная дифференцировка индукторами длилась 3 недели. Адипогенная дифференцировка индукторами длилась 2 недели. Идентификация адипогенной дифференцировки проводилась с помощью красителя Oil Red, а остеогенной — Alizarin R. После окрашивания краситель удаляли и фотографировали лунки для получения результатов дифференцировки.

7. Измерение концентрации ростовых факторов в ТЛ больных ПМФ

Для иммунофлюоресцентного анализа (ИФА) с целью количественного определения ростовых факторов (bFGF, VEGF) в тромболизате больных ПМФ использовались стандартные наборы ELISA (R&D Systems). Для этого тромболизаты стандартизировали по количеству белка с использованием реагента BCA (методику см. выше); полученная концентрация тромболизатов соответствовала 5 % раствору тромболизата от здоровых доноров. Затем 100 мкл образца добавлялось в лунки 96-луночной платы, предварительно покрытые связывающими антителами. Спустя 2 часа лунки промывались и добавлялись меченые ферментом специфические антитела. После добавления субстрата (H_2O_2) и последующей остановки реакции интенсивность окраски растворов измеряли при длине волны 450 нм на спектрофотометре Synergy 2 BioTeK.

8. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программного пакета Microsoft Excel.

Результаты

1. Морфология клеток при культивировании в разных условиях

Фотографии клеток стромы костного мозга при микроскопии на третий день культивирования в разных условиях (10 % ФБС, 10 % ТЛ, 20 % ТЛ) представлены на рисунке 1. На стадии субконфлюэнтности клеток наблюдались некоторые различия их морфологии. При культивировании на 10 % ФБС чаще встречались крупные вытянутые клетки, расположенные менее компактно, чем при культивировании на ТЛ. При использовании 10 % и 20 % ТЛ форма самих клеток принципиально не отличалась: в основном встречались небольшие округло-веретенообразные клетки. Однако при более высокой концентрации ТЛ клетки приобретали

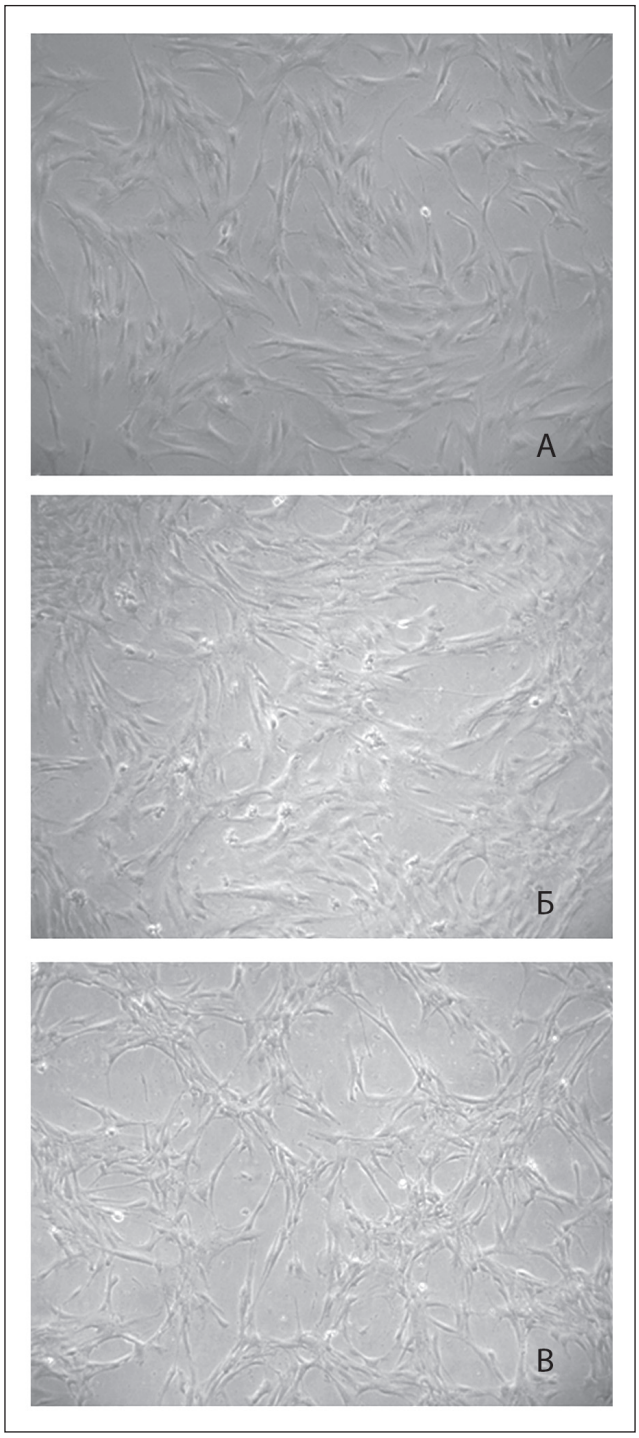


Рисунок 1.

тенденцию к более кучному и менее равномерному заполнению площади пластика. Представляет некоторые трудности количественное описание наблюдаемых различий, однако известно, что подобные типы субпопуляций МСК и их пространственного взаимодействия в культуре также были описаны в литературе [15].

2. Пролиферативная активность МСК

При культивировании МСК в средах с различным содержанием ТЛ мы наблюдали, что максимальное количество жизнеспособных клеток на 7–9 день наблюдалось при высоких концентрациях ТЛ, а именно 15–30 % (рис. 2). При данных концентрациях количество клеток достоверно не отличалось от такового при культивировании МСК на 10 % ФБС (по данным t-теста Стьюдента для 15 % ТЛ $p = 0,07$, для 20 % ТЛ $p = 0,12$, для 30 % ТЛ $p = 0,07$), в остальных случаях количество клеток было достоверно меньше ($p \leq 0,01$). В целом, полученные результаты сходны с известными из литературных источников [15], хотя некоторые авторы получали даже большую экспансию МСК при культивировании на тромболизате, чем при использовании ФБС [11].

3. Синтез белков ВКМ клетками стромы КМ

При культивировании клеток в средах с различной концентрацией тромболизата нами было обнаружено, что максимальное количество белков внеклеточного матрикса синтезируется клетками в случае 15%-ного ТЛ (рис. 3). Концентрация белков была вне пределов разрешения калибровочной кривой, в связи с чем не представляется возможным определить их точное количество. В целом, имелась тенденция к усилению выработки белков ВКМ с повышением содержания тромболизата, что может свидетельствовать о том, что факторы, содержащиеся в нём, способствуют более активной деятельности МСК по производству ВКМ, и в первую очередь — коллагена I типа (неопубликованные данные).

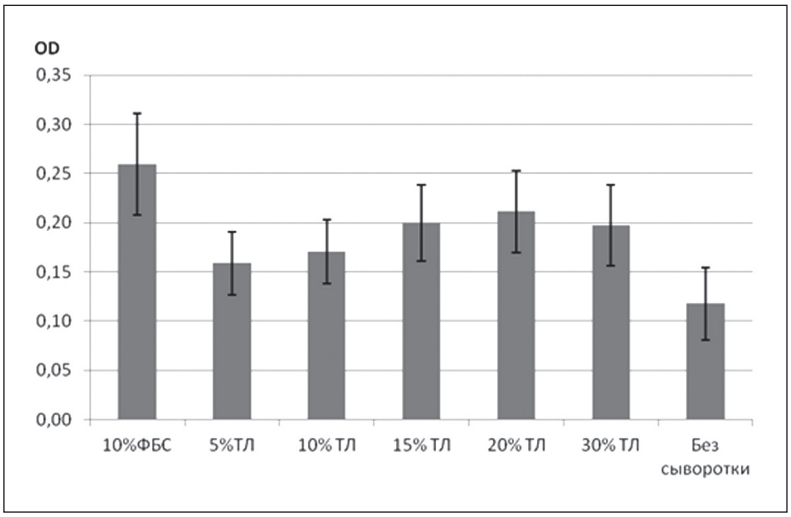


Рисунок 2.

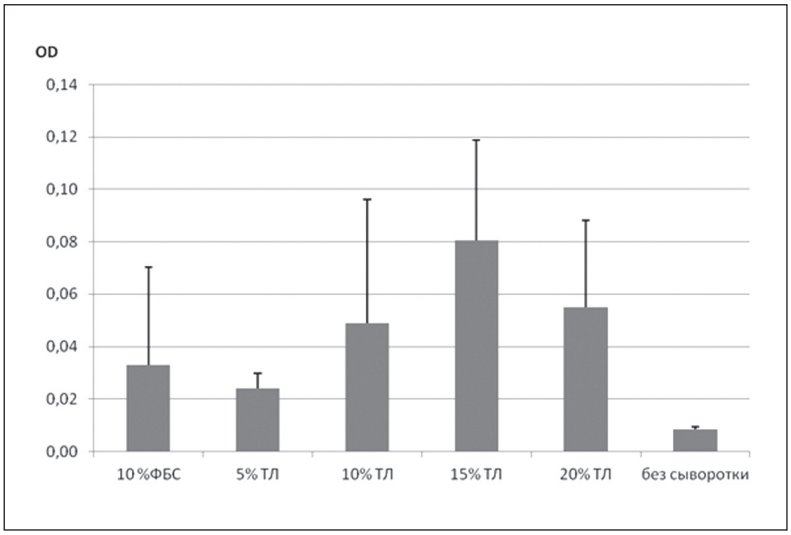


Рисунок 3.

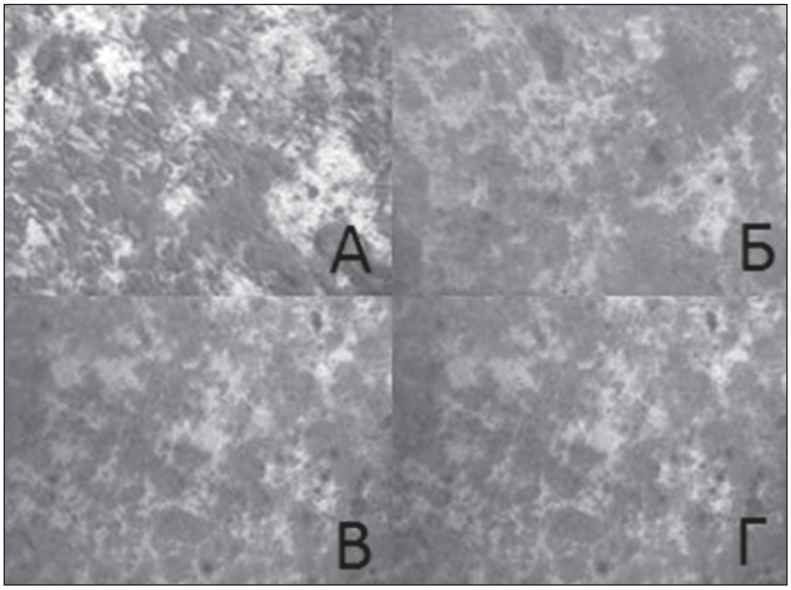


Рисунок 4.

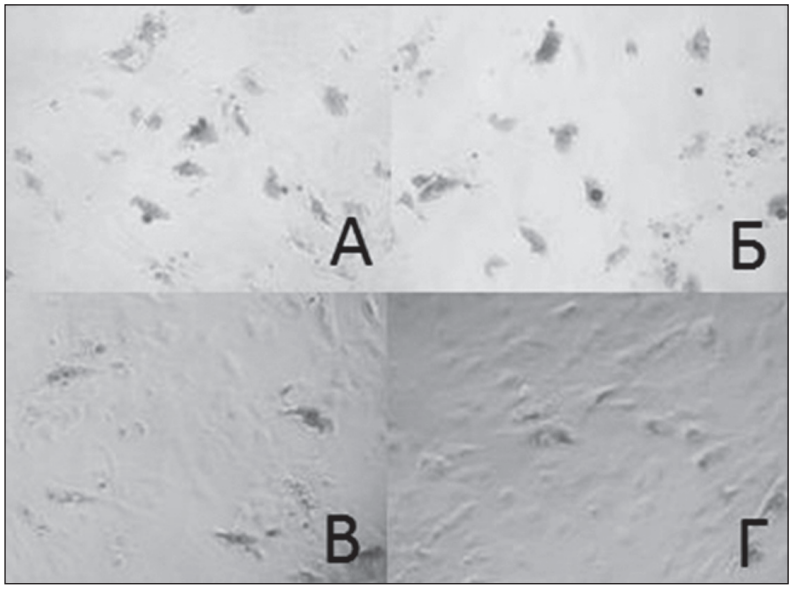


Рисунок 5.

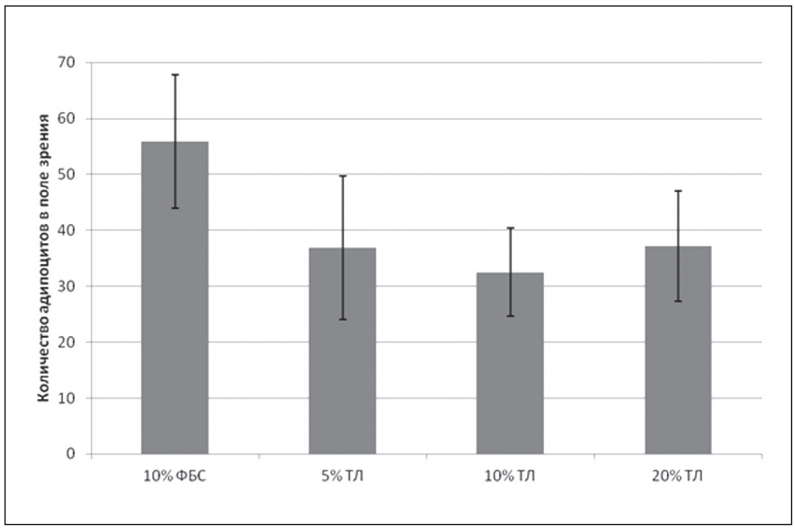


Рисунок 6.

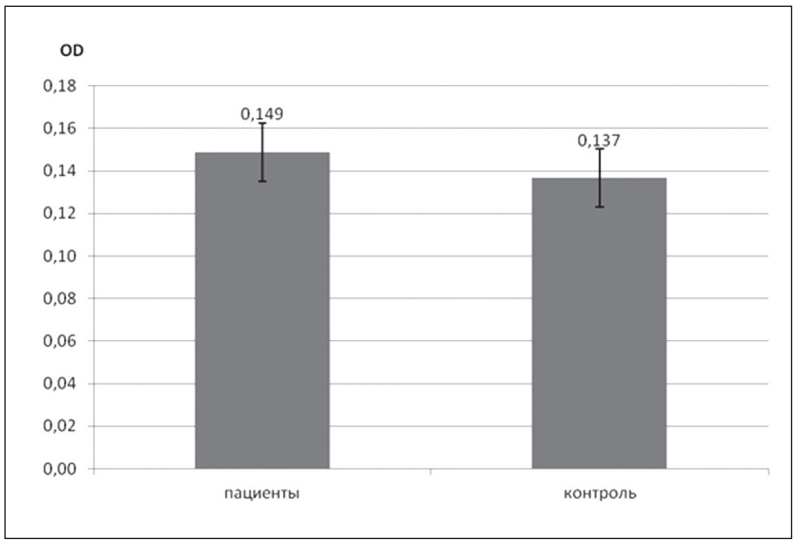


Рисунок 7.

4. Направления дифференцировки МСК

При микроскопии МСК, окрашенных ализарином красным, не было обнаружено тенденции к изменению остеогенной дифференцировки в зависимости от культуральных сред (рис. 4): количество субстрата, выраженно окрашенного ализарином, визуально было одинаковым во всех лунках, что свидетельствует о сохранении способности МСК к дифференцировке в остеобласты в различных культуральных условиях. Не исключено, что ТЛ способствует большей остеогенной дифференцировке, чем стандартная сыворотка, о чем свидетельствует мировая литература [11, 15], однако для подтверждения необходима количественная оценка. В отношении адипогенной дифференцировки визуально наблюдалась четкая тенденция к снижению количества адипоцитов, то есть клеток, окрашенных на жир красителем Oil Red, при повышении концентрации ТЛ в среде (рис. 5). Это также соотносится с данными вышеупомянутых авторов.

Визуальные данные о снижении адипогенной дифференцировки подтверждаются при прямом подсчете адипоцитов при микроскопии (рис. 6). В то время как количество адипоцитов при культивировании МСК на 5 % ТЛ достоверно не отличалось от стандартной 10 % ФБС ($p = 0,06$), при 10%-ном и 20 % содержании тромболизата в среде количество этих клеток было достоверно меньше ($p = 0,009$ и $p = 0,04$, соответственно).

5. Культивирование МСК на тромболизате от больных ПМФ

При культивировании МСК на тромболизате, полученном от больных ПМФ, на 3-ий день не было получено достоверных различий в количестве жизнеспособных клеток ($p = 0,2$), однако имелась неоспоримая тенденция, подтверждаемая неоднократными повторами опыта, к более активной пролиферации клеток стромы при культивировании их на тромболизате от больных (рис.7).

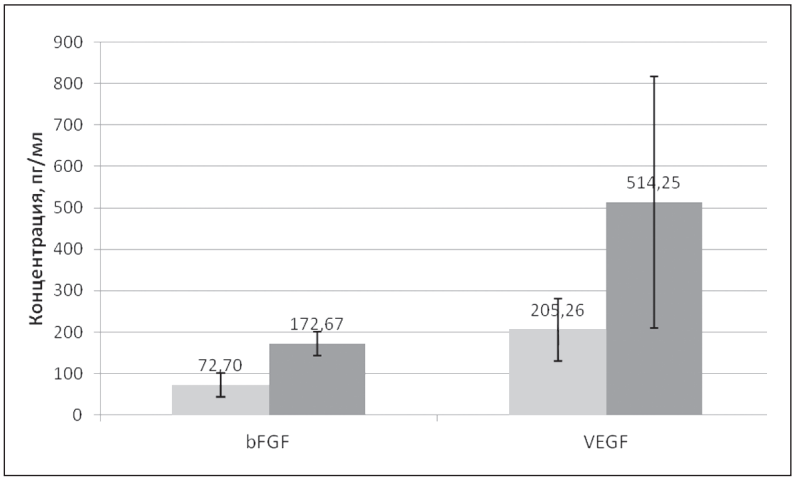


Рисунок 8.

6. Содержание ростовых факторов в тромболизате

Концентрация таких ростовых факторов, как bFGF и VEGF, которые вероятно играют определенную роль в патогенезе миелофиброза, была повышена в тромболизате от больных ПМФ по сравнению с пациентами контрольной группы. Среднее содержание bFGF при этом составило в группе больных 172,67 пг/мл, а в контрольной группе — 72,7 пг/мл (рис. 8). Различие между двумя группами было достоверно (p = 0,0009).

Различие между двумя группами было достоверно (p=0,0009).

Средняя концентрация VEGF также достоверно отличалась (p = 0,01). При этом в группе больных она составляла 514,25 пг/мл, а в контрольной группе — 205,26 пг/мл.

7. Культивирование МСК от больных ПМФ на тромболизате.

Получение МСК от больных первичным миелофиброзом представляет собой некоторые трудности, в связи с тем, что аспирация фиброзированного костного мозга не всегда оказывается возможной. Полученные МСК от больного ПМФ мы также культивировали на средах с различным содержанием тромболизата и 10 % ФБС в качестве негативного контроля (рис. 9). В целом, тенденция к возрастанию пролиферативной активности с увеличением концентрации ТЛ сохранялась. Достоверные отличия пролиферативной активности между МСК от здоровых доноров и от больного ПМФ были получены при культивировании клеток на 10 % и 20 % тромболизате (p = 0,03 и 0,04, соответственно), однако тенденция к более активному росту клеток от больного прослеживалась во всех случаях.

В настоящее время планируется продолжение опытов в этом направлении, а также культивирование клеток от разных больных ПМФ для выявления достоверных различий.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что тромболизат, как источник тромбоцитарных ро-

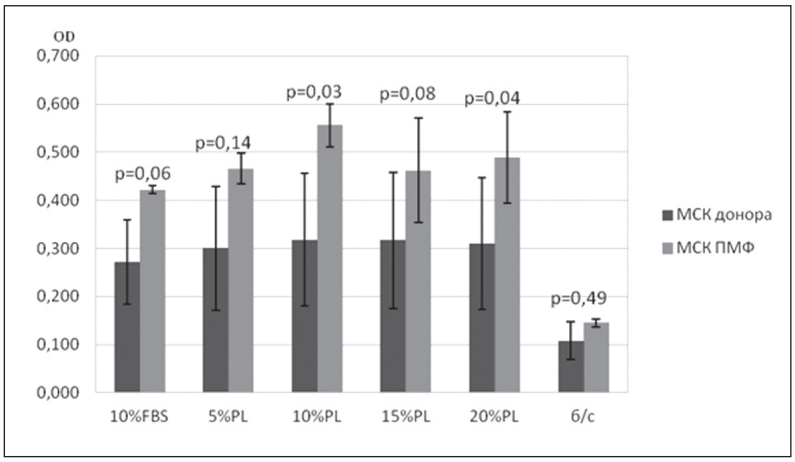


Рисунок 9.

стовых факторов, может оказывать стимулирующее влияние на клетки стромы костного мозга, в связи с чем культивирование мезенхимных стволовых клеток с добавлением человеческого тромболизата может рассматриваться, как модель миелофиброза in vitro.

Усиление пролиферативной активности, проявляющееся в увеличении количества жизнеспособных клеток при повышении концентрации тромболизата в среде, указывает на дозозависимое влияние в определенных границах тромбоцитарных факторов на способность клеток к митозу. Некоторое уменьшение интенсивности сигнала при максимальной (30%-ной) концентрации по сравнению с 15–20%-ным содержанием ТЛ при проведении теста МТТ может быть объяснено проявлением действия ингибирующих факторов, содержащихся в лизате, после вовлечения предельного количества рецепторов к активирующим ростовым факторам на МСК, однако эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

Значительное увеличение количества белков внеклеточного матрикса при культивировании МСК в средах с высоким содержанием тромболизата, по сравнению со стандартными условиями культивирования, позволяет предположить, что тромбоцитарные факторы роста могут иметь значение в фиброзировании костного мозга. Примечательным является тот факт, что в случае 15%-ного содержания ТЛ в среде количество синтезированного белка на единицу оптической плотности МТТ (то есть на клетку) превышало таковое по сравнению со стандартными условиями. Это означает, что тромбоцитарные факторы в значительной степени стимулируют синтетическую функцию МСК.

Снижение способности к адипогенной дифференцировке и сохранение (а, возможно, даже усиление) — к остеогенной объясняет возможность развития стадии остеомиелосклероза после миелофибротической под воздействием тромбоцитарных факторов, минуя выраженное жировое перерождение костного мозга.

Отсутствие значимых различий между пролиферативной активностью МСК при культивировании их на ТЛ от больных ПМФ и от контрольной группы, с одной стороны, может поддерживать ранее высказанную идею Schmitt о том, что содержание факторов в тромбоцитах больных не отличается от нормы, а нарушен только способ их высвобождения [16]. Наши результаты по прямому измерению количества тромбоцитарных факторов роста (bFGF, VEGF) в тромболизате свидетельствуют об обратном. Данное явление может быть объяснено недостаточным временем культивирования клеток в этих условиях, тогда возможно при увеличении продолжительности культивирования имеющаяся тенденция к усилению пролиферации на ТЛ от больных станет более очевидной.

Повышенное количество bFGF и VEGF в тромболизате больных ПМФ свидетельствует о важной роли этих факторов в изменении функционирования клеток стромы костного мозга. Целесообразно в дальнейшем изучить более широкий спектр факторов роста для всесторонней характеристики влияния содержимого альфа-гранул тромбоцитов и мегакариоцитов на МСК.

Тенденция к усилению пролиферативной активности МСК от больных первичным миелофиброзом, по сравнению с МСК от здоровых доноров, может свидетельствовать не только о влиянии микроокружения на клетки стромы, но и об изменениях в самих клетках, способствующих усилению их профибротических свойств. В дальнейшем планируется выяснение степени этого различия между пациентами в зависимости от мутационного статуса, а также гематологических показателей.

Благодарности

Выражаем благодарность сотрудникам НИЛ онкогематологии и НИЛ межклеточных взаимодействий ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» за оказание помощи в выполнении исследования, а также врачам отделения гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» и кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова за помощь в поиске пациентов с первичным миелофиброзом.

Финансовая поддержка исследования осуществляется за счет гранта «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологических изменённых тканей и органов с использованием стволовых клеток» Государственный контракт № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 г., а также «Субсидии молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2012 г.» от Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга.

Литература

1. *Kutti J., Ridell B.* Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis // Pathol Biol. — 2001. — Vol. 49. — P. 164–166.

2. *Johansson P., Kutti J., Andreasson B. et al.* Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative

(Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983–99 // Journal of Internal. Medicine. — 2004. — Vol. 256. — P. 161–165.

3. *Barosi G., Ambrosetti A., Finelli C. et al.* The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia // Br. J. Haematol. — 1999. — Vol. 104. — P. 730–737.

4. *Thiele J., Kvasnicka H.M., Schmitt-Graeff A., Diehl V.* Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: a follow-up study on 309 patients // Leuk Lymphoma. — 2003. — Vol. 44. — P. 949–953.

5. *Kvasnicka H.M., Thiele J., Werden C. et al.* Prognostic Factors in Idiopathic (Primary) Osteomyelofibrosis // Cancer. — 1997. — Vol. 80. — P. 708–719.

6. *Колосков А.В.* Мегакариоциты и фиброз костного мозга // Гематол. и трансфузиол. — 1997. — т. 42. — с. 29–31.

7. *Reilly J.T.* Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. // Hematol Oncol. — 2006. — Vol. 24. — P. 56–63.

8. *Le Bousse-Kerdilès M-C, Martyre M-C., Samson M.* Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review // Eur. Cytokine Netw. — 2008. — Vol. 19. — P. 69–80.

9. *Yan X.Q., Lacey D., Fletcher F. et al.* Chronic exposure to retroviral encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice // Blood. — 1995. — Vol. 86. — P. 4025–4033.

10. *Vannucchi A.M., Bianchi L., Paoleti F. et al.* Impaired GATA-1 expression and myelofibrosis in an animal model // Pathologie Biologie. — 2004. — Vol. 52. — P. 275–279.

11. *Xia W., Li H., Wang Zh. et al.* Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enchances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cell // Cell. Biology. — 2011. — Manuscript CBI20100361. — P. 1–10.

12. *Sankaranarayanan K., Chandana T., Gency Ponrose G. et al.* Humanized substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation // Cell Biology International. — 2011. — Manuscript CBI20100649.

13. *Jenhani F., Durand V., Ben Azouna N. et al.* Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells // Transplantation Proceedings. — 2011. — Vol. 43. — P. 639–643.

14. *Doucet Ch., Ernou I., Zhang Y. et al.* Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications // Journal of cellular physiology. — 2005. — Vol. 205. — P. 228–236.

15. *Horn P., Bokermann G., Cholewa D. et al.* Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells // Cytotherapy. — 2010. — Vol. 12. — P. 888–898.

16. *Schmitt A., Jouault H., Guichard J. et al.* Pathologic interaction between megacaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis // Blood. — 2000. — Vol. 96. — P. 1342–1347.

АУТОЛОГИЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: ОПЫТ УСПЕШНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕНАЛИДОМИДОМ

Д.В. Мещерякова, А.В. Петров, Д.В. Моторин

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

Мещерякова Диана Валерьевна — младший научный сотрудник научного отдела ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Петров Алексей Владиленович* — врач-гематолог ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Моторин Дмитрий Васильевич* — кандидат медицинских наук, научный сотрудник научного отдела, врач-гематолог ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: (812) 702–37–65. E-mail: dmotorin@mail.ru (Моторин Дмитрий Васильевич).

Резюме

Лечение пациентов с множественной миеломой является сложной медицинской проблемой. Обсуждаются варианты индукционной химиотерапии у больных множественной миеломой, являющимися кандидатами для проведения в дальнейшем ауто-ТГСК. Представлен литературный обзор о возможности затруднений при проведении мобилизации и цитафереза ГСКПК после применения новых препаратов в индукционной терапии.

Рассмотрены клинические случаи проведения успешной мобилизации ГСКК у пациентов, ранее предреченных леналидомид-содержащими режимами химиотерапии. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что использование новых препаратов на этапе индукционной терапии могут и должны применяться у пациентов с множественной миеломой, являющихся кандидатами для проведения аутологичной ТГСК.

Ключевые слова: миелома, трансплантация, леналидомид.

MULTIPLE MYELOMA AUTOLOGOUS SCT: EXPERIENCE OF SUCCESFUL TRANSPLANTATION AFTER LENALIDOMIDE TREATMENT

D. V. Mescheryakova, A. V. Petrov, D. V. Motorin

Almazov Federal Heart Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: dmotorin@mail.ru (Dmitrii V. Motorin — PhD., researcher of science department, hematologist).

Abstract

High-dose therapy followed by auto-SCT is considered the standard of care in the frontline treatment of eligible patients. Discusses option of initial therapy of myeloma for these group of patients and impact novel agents, particularly lenalidomide-containing regimens, on peripheral blood stem cell collection. Two clinical cases of patients treated with the combination of lenalidomide and low dose dexamethazone and successfully mobilized with G-CSF alone are reported. Conclusions: the use of lenalidomide-containing regimens as induction therapy for eligible patient and does not impair stem cell mobilization.

Key words: myeloma, transplantation, lenalidomide.

Статья поступила в редакцию 02.10.12, принята к печати 20.10.12.

Введение

Множественная миелома является В-клеточной злокачественной опухолью, с клональной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге и представленной, в основном, зрелыми плазматическими клетками, продуцирующими электрофоретически и иммунологически гомогенный протеин. Она составляет около 10–13 % среди всех онкогематологических заболеваний. При этом примерно 80 % впервые выявленных случаев множественной миеломы приходится на возраст 55–60 лет и заболеваемость увеличивается с возрастом [1].

Множественная миелома гетерогенна по своим клиническим проявлениям. Длительность общей выживаемости зависит от стадии заболевания, присутствии прогностических факторов риска. Известны различные прогностические факторы риска, связанные с плохим ответом на лечение, такие как пожилой возраст; плохой соматический статус (ECOG 3–4), повышение уровня ß-2 микроглобулина, снижение альбумина сыворотки крови (международная прогностическая система ISS) [2]; наличие цитогенетических поломок (del 17p, t(4;14), t(14;16), del 13, гиподиплоидия) [3–5]; высокий уровень индекса плазматических клеток (PCLI); наличие циркулирующих плазматических клеток в крови и плазмобластов в миелограмме; экстрамедуллярные опухолевые очаги; также высокий уровень СРБ, ЛДГ.

Несмотря на наличие множества прогностических факторов, по современным рекомендациям недостаточно доказательной базы для выбора риск — адаптированной терапии у пациентов с множественной миеломой [6]. Более важным прогностическим фактором является ответ на первичную терапию.

Принципы лечения множественной миеломы

До настоящего времени множественная миелома остается инкурабельным заболеванием. Хотя, следует признать, что за последние 10–15 лет достигнуты значительные успехи в лечении множественной миеломы благодаря лучшему пониманию патогенеза заболевания, введении программ лечения с включением новых препаратов (ингибиторы протеасом, иммуномодуляторы), увеличение количества аутологичных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), улучшение сопроводительной терапии [7]. Целью проводимого лечения миеломной болезни является купирование жизнеопасных состояний, улучшение качества жизни и увеличение беспрогрессивной (DFS) и общей выживаемости (OS). В связи с разработкой новых препаратов и схем терапии в последние десятилетия, стало возможным достижение у пациентов длительных полных ремиссий, что коррелирует с длительной OS и DFS. [8, 9].

Показанием к началу лечения является наличие продвинутой стадии II–III (по Duriae Salmon), симптоматической множественной миеломы с поражением органов и систем (CRAB-критерии) [10]. Прежде всего, для выбора варианта индукционной химиотерапии важно определить является ли пациент в последующим кандидатом для проведения ауто-ТГСК, принимая во внимание возраст пациента, наличие сопутствующих патологий, соматический статус пациента, агрессивность варианта течения миеломной болезни. При этом важно достижение высокого уровня общих ответов на начальную терапию в короткие сроки с минимальной токсичностью. Кроме того химиопрепараты, по-возможности, не должны нарушать функцию ГСК, сохраняя возможность успешной мобилизации ГСК на этапе проведения афереза [11, 12].

Индукционная терапия

Ранее широко применяемые режимы VAD (винкристин, адриамицин, дексаметазон)/VAMP или пульс-терапия дексаметазоном несмотря на достаточную эффективность (общий уровень ответов при применении в качестве 1 линии терапии 55–84 % /45–60 %, CR 8–28 %) в настоящее время практически не используются в качестве индукционной терапии в связи с появлением новых препаратов, дающих больший процент полных ремиссий общих ответов на индукционную терапию. К тому же на режимах VAD/VAMP наблюдалась значимая гематологическая и негематологическая токсичность (кардиотоксичность, нейротоксичность), необходимость в обеспечении центрального венозного доступа, что ассоциировалось с высоким процентом катетер-ассоциированных инфекций и тромбозов [13–16].

Широко применяющиеся в терапии множественной миеломы у пожилых пациентов схемы с мелфаланом, не используются у пациентов, которым планируется проведение ауто-ТГСК, поскольку длительная терапия мелфаланом в предтрансплантационный период ухудшает качество аутологичного трансплантата и снижает возможность мобилизации ГСК и эффективность ауто-ТГСК [9, 11].

Согласно европейским (ESMO), американским (NCCN), британским (BCSH & UKMF), а также международным (IMWG) рекомендациям в 1-ой линии терапии предпочтительным является включение в программы лечения новых перапаратов (ингибиторы протеосом, иммуномодуляторы).

В исследованиях показана высокая эффективность режимов VD, CTD/TAD, CyBorD/VCD, PAD, применяемых в качестве индукционной ХТ перед ауто-ТГСК [17–20].

Являясь более новым препаратом для лечения миеломной болезни, леналидомид в основном применяется в качестве 2-ой линии терапии при рецидивирующем, рефрактерном течении заболевания. Однако, согласно рекомендациям NCCN, схема леналидомида с низкими дозами дексаметазона может быть рекомендована в качестве терапии 1-ой линии с уровнем доказательства 2а. При отсутствии крупных рандомизированных сравнительных исследований различных режимов индукционных схем ХТ нет однозначных и убедительных данных о преимуществе одного режима с включением новых препаратов над другим.

Режимы индукционнй терапии с включением двух и более новых препаратов дают высокий уровень общих ответов, в том числе полных ответов (CR), однако, токсичность схем и их преимущество в достижении общей выживаемости и безпрогрессивной выживаемости (OS и PFS) после аутологичной трансплантации ГСК требует дальнейшего изучения [21].

Перед выбором схемы индукционной терапии у пациентов, годных к ауто-ТГСК, следует оценить наличие таких факторов как почечная дисфункция, наличие высокого тромботического риска, нейропатии [22]. При наличии некоторых цитогенетических поломок (t 4;14) [23–25], высоком риске тромбоэмболических осложнений рекомендуется применение бортезомиб-содержащих курсов ХТ. При наличии почечной дисфункции преимуществом обладают талидомид и бортезомиб-содержащие курсы ХТ [26–29]. При наличии или появлении полинейропатии рекомендовано в большей степени использование леналидомид-содержащих курсов ХТ.

При этом, конечно, следует принимать во внимание, что выбор индукционной химиотерапии основан на доступности препарата. Так, например в Великобритании перед ауто-ТГСК наиболее часто используется индукционная схема CTD [11]. В РФ препарат талидомид не зарегестрирован. Леналидомид успешно применяется в течении нескольких лет для лечения пациентов с миеломной болезнью, однако еще не зарегестрирован для терапии в 1-ой линии. При применении ленлидомид-содержащих курсов ХТ перед ауто-ТГСК мобилизацию ГСК рекомендуется проводить в первые 6 месяцев от начала лечения ввиду возможного потенциального ухудшения мобилизации ГСК на терапии леналидомидом [30]. Чаще всего в РФ применяют схемы VD, PAD, CyBorD/VCD.

Ответ на терапию рекомендовано оценивать после каждого курса ХТ [11] или после двух курсов ХТ [6]. Оптимальная длительность первичной терапии до максимального ответа не определена [6]. Несмотря на данные, что достижение CR перед высокодозной химиотерапией и ауто-ТГСК является хорошим прогностическим фактором, не получено подтверждения, что пролонгирование индукционной химиотерапии с целью достижения CR улучшает результаты лечения миеломной болезни [11].

Общими рекомендациями [11, 22] является проведение в среднем от 3 до 6 курсов индукционной ХТ, до достижения по крайней мере PR, что позволяет сохранить баланс между возможностью достигнуть максимальный ответ с наименьшей токсичностью перед ауто-ТГСК.

Критерии отбора пациентов на ауто-ТГСК

Проведение высокодозной химиотерапии с ранней ауто-ТГСК на этапе достижения первой ремиссии заболевания в качестве этапного лечения у пациентов, годных к интенсивному лечению, в настоящее время является доказанной рекомендацией [11, 6, 12] и имеет преимущество сравнении со стандартными программами химиотерапии в достижении длительной DFS и OS [11]. Также ауто-ТГСК рекомендована для пациентов с первично-рефрактерным течением множественной миеломы. В ряде исследований выявлено, что первичная рефрактерность к индукционным курсам химиотерапии может быть преодолена проведением высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТГСК [31–33].

Строгих критериев отбора пациентов на высокодозную химиотерапию с ауто-ГСКК нет. Общими рекомендациями являются: возраст < 65 лет, хороший соматический статус, отсутствие тяжелых поражений органов и систем. Ограничение возрастных рамок довольно условны и имеют тенденцию к увеличению в последние 20 лет. По данным Европейских рекомендаций допустимый возраст < 65 лет, по данным NCCN < 70 лет.

Режимы кондиционирования

В исследованиях, впервые показавших преимущество проведения ауто-ТГСК над стандартными режимами ХТ при миеломной болезни, изначально применялась схема кондиционирования мелфаланом в дозе 140 мг/м^2 и тотальным облучением тела в дозе 8 Гр. (MEL140/TBI 8 Gy) [34]. Однако, в дальнейшем в крупном сравнительном рандомизированном исследовании [35] MEL140/TBI против мелфалана в дозе 200 мг/м^2 (MEL200), было показано преимущество режима MEL200 при сопо-

ставимой эффективности в достижении CR, VGPR, DFS (более длительная OS, быстрое восстановление гемопоэза, ниже частота негематологической токсичности (мукозит)).

В настоящее время стандартным режимом кондиционирования перед проведением ауто-ТГСК является алкилирующий препарат мелфалан 200 мг/м^2. Исторически данный режим был введен в начале 1990 гг. [36].

В возрасте 65–70 лет также возможно проведение ауто-ТГСК с режимом кондиционирования мелфаланом в редуцированной дозе 140 мг/м^2, модифицированным двойным режимом кондиционирования (тандемная ауто-ГСКК с режимом кондиционирования с мелфаланом в редуцированной дозе 100 мг/м^2) [37]. У пациентов с почечной дисфункцией следует проводить редукцию дозы мелфалана в режиме кондиционирования до 140 мг/м^2 при скорости клубочковой фильтрации (СКФ) < 30 мл/мин [38–41] и быть готовыми к возможности проведения гемодиализа.

Заготовка гемопоэтических стволовых клеток

В качестве источника ГСК у пациентов с миеломной болезнью предпочтительным и являются мобилизированные гемопоэтические стволовые клетки периферической крови (ГСКПК), нежели костный мозг [11]. Чаще всего мобилизацию ГСКПК производят путем использования рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) с использованием высокодозной химиотерапии или без оной. Большинство руководств по трансплантации сходятся на том, что минимально допустимым количеством СД34$^+$ клеток в трансплантате являются 2 миллиона СД34+ клеток на килограмм веса пациента, «оптимальной» дозой является 4–6 миллионов СД34+ клеток на килограмм [42].

Общими факторами риска, снижающих успешность мобилизации ГСКПК является пожилой возраст [41], резерв костного мозга, вариант мобилизационного режима и вариант предшествующей терапии [1]. Как уже отмечалось ранее, терапия алкилирующими препаратами (мелфалан) в предтрансплантационный период ассоциируется с риском неудачной мобилизации.

Влияние леналидомида на аферез ГСКПК

Остается малоизученным вопрос о возможности проведения эффективной мобилизации ГСКПК у пациентов, получавших терапию леналидомидом. Ряд исследований показал, что у пациентов, длительное время предлеченных леналидомидсодержащими режимами химиотерапии снижается возможность мобилизации достаточного количества ГСКПК, увеличивается необходимое количество сеансов цитафереза при использовании стандартных режимов мобилизации G-CSF [43–45]. Однако, при этом не получено достоверных данных о негативном влиянии леналидомида на качество ГСКПК, что отражалось бы на кинетики приживления трансплантата [46–48]. Также не получено данных, что временная отмена терапии леналидомида перед аферезом ГСКК оказывает влияние на мобилизацию ГСКК [49].

Исследования по эффективности мобилизации ГСКПК у пациентов, получавших леналидомид достаточно противоречивы. В работе *Popat* [50] было показано, что применение стандартного режима мобилизации (монотерапия G-CSF) оказалось неэффективным у 25 % пациентов, предлеченных леналидомидом (в сравнении с 9 % пациентов, не получавшими леналидомид). При этом большое влияние оказывала длительность предшествующей терапии. Неудача мобилизации наблюдалась у 78 % пациентов, получивших > 3 курсов ХТ и только у 16 % пациентов, получивших < 3 курсов ХТ с леналидомидом. В другом исследовании *Kumar* [43] показл, что применение стандартного режима мобилизации (монотерапия G-CSF) оказалось неэффективным лишь у 7 % пациентов, предлеченных леналидомидом (в сравнении с 1 % пациентов, кто не получал прежде леналидомид). При этом все пациенты, предлеченные леналидомидом, у которых наблюдалась неэффективность мобилизации имели длительность терапии > 6 месяцев. Низкий процент неудач на терапии леналидомидом может быть объяснен тем, что всем пациентам включенным в исследование *Kumar* [43], аферез проводился ранее 12 месяцев от постановки диагноза.

В исследовании *Mazumder* [46] отмечалось, что применение стандартного режима мобилизации (монотерапия G-CSF) оказалось неэффективным у 45 % пациентов, предлеченных леналидомидом (в сравнении с 7 % пациентов, не получавших леналидомид).

Точные механизмы, снижающие мобилизационную способность ГСКПК у пациентов, предлеченных леналидомидом до конца не ясны. В исследованиях показано, что леналидомид, как и другие иммуномодуляторы (IMiD) — талидомид и помалидомид не обладают прямым токсичным действием на ГСК и не подавляет способность самообновления ГСК [51].

Возможным обьяснением является то, что леналидомид способен ингибировать миелопоэз, приводя к остановке созревания миелоцитов на ранних этапах. В культурах *in vitro* леналидомид

ингибировал критический транскрипционный фактор *PU.1*, учавствующий в регуляции миелопоэза, дифференцировки и созревании предшественников гранулоцитов/макрофагов [52].

Ингибирование транскрипционного фактора *PU.1* приводило к остановке созревания в костном мозге нейтрофильных гранулоцитов, чем объяснялась частая гематологическая токсичность (нейтропения) на фоне терапии леналидомидом. Вместе с тем в культурах ГСК, леченных леналидомидом наблюдалась высокая экспрессия эндогенных цитокинов G-CSF (на день 3 лечения в группе контроля — 140 пг/мл, в культуре леналидомида — 800 пг/мл, CC4047 (помалидомида) 1500пг/мл), что, вероятно, происходило компенсаторно в ответ на остановку созревания гранулоцитов [51]. Подобным механизмом можно объяснить также сниженную эффективность экзогенного G-CSF (резистентность на фоне режима мобилизации монотерапией G-CSF) .

Основываясь на том, что длительная терапия леналидомидом может затруднять проведение успешной мобилизации ГСКПК, в настоящее время рекомендациями панели экспертов *International Myeloma Foundation* (от 2008г.) и *IMWG* (от 2009г) [49] рекомендуется у пациентов, предлеченных леналидомидом производить мобилизацию ГСКПК в первые 6 месяцев от начала терапии [43].

У тех пациентов, которым не удалось заготовить достаточное количество ГСКПК могут успешно применяться другие режимы мобилизации — высокодозный Циклофосфан или Плериксофор. В исследовании *Popat* [53] было показано, что попытка ре-мобилизации с применением ХТ (CVAD/ CY/ ифосфомид + этопозид) в сочетании с G-CSF оказалось успешной у 77 % пациентов, предлеченных леналидомидом с неудачей мобилизации после стандартной терапии G-CSF. В исследовании *Mark* [54] неэффективная мобилизация ГСКПК G-CSF наблюдалась в 33 % случаев и было показано, что применение режима мобилизации ХТ в сочетании с G-CSF позволяет преодолеть возможный риск неэффективной мобилизации у предлеченных леналидомидом пациентов.

В других исследованиях также наблюдалась эффективная мобилизация в 85–71 % случаев при смене режима мобилизации на высокодозный циклофосфан и G-CSF у пациентов, имевших первоначально неудачу мобилизации на монотерапии G-CSF [55, 53]. Основываясь на этих исследованиях, показывающих, что применение ре-мобилизации ГСКПК с помощью режимов ХТ в сочетании с G-CSF могут быть эффективны у пациентов, предлеченных леналидомидом. Нет данных что дополнительное время от окончания терапии до мобилизации ГСКПК увеличивает вероятность успешной мобилизации.

В 2008 году группа экспертов разработали международные рекомендации по проведению мобилизации ГСКК у пациентов, предлеченных леналидомидом, бортезомибом, талидомидом. Поскольку новые лекарственные средства могут оказывать влияние на эффективность проводимой мобилизации ГСКПК рекомендуется проведение ранней мобилизация ГСКПК, после 3–4 курсов терапии. В качестве 1-ой линии мобилизации ГСКПК по рекомендациями *IMWG* рекомендуется [49]:

– У пациентов молодого возраста (< 65 лет), после индукционной ХТ < 4 леналидомид-содержащими курсами ХТ рекомендовано использовать режим мобилизации монотерапией G-CSF.

– У пациентов после ХТ > 4 леналидомид-содержащими курсами ХТ имеется высокий риск неэффективности мобилизации, в связи с чем такой группе пациентов рекомендован режим мобилизации циклофосфаном в сочетании с G-CSF, позволяющий уменьшить риск неэффективной мобилизации.

– У пациентов пожилого возраста (> 65 лет) рекомендовано использование режима мобилизации редуцированной дозой циклофосфана в сочетании с G-CSF или применение G-CSF -моно в комбинации с AMD-3100 (Плериксафор) перед 2-ым лейкоцитаферезом, если за 1 лейкоцитаферез набралось < 2 млн. $CD34^+$ клеток на килограмм веса пациента.

В ФЦСКЭ накоплен большой успешный опыт применения препарата леналидомид при лечении пациентов с миеломной болезнью. В ряде случаев леналидомид применялся у пациентов перед проведением ауто-ТГСК. У всех пациентов, которым проводился лейкоцитоферез было забрано количество $CD34^+$, достаточное для проведения ауто-ТГСК. В качестве примера предлагаем описание двух случаев успешного проведения афереза у пациентов, ранее получавших леналидомид.

Случай 1.

КАГ, 48 лет. Пациентка с установленным в ноябре 2010 года диагнозом: Множественная миелома, диффузно — очаговая форма, Ig D каппа вариант, IIA стадия, ISS 3. Диагноз был установлен на основании плазмоцитоза костного мозга (51 %), секреции моноклонального парапротеина в сыворотке крови, представленного IgD (уровень парапротеина 26,6 г/л), моноклонального парапротеина мочи, представленного каппа-цепью, выраженного остеодеструктивного синдрома.

Пациентке проводилась индукционная полихимиотерапия в режиме «VD» (бортезомиб + дексаметазон) в стандартных дозах, в количестве 6 курсов с достижением очень хорошего частичного ответа (VGPR, редукция уровня парапротеина сыворотки крови на 95 %, М протеин мочи < 100 мг/24 ч) от 24.04.2011 г. В качестве консолидации достигнутого ответа планировалось проведение высокодозной ХТ с аутологичной трансплантации ГСКПК.

Однако, в 07.2011 г зарегистрирован ранний рецидив заболевания (значимое нарастание уровня парапротеина сыворотки крови с 1,2 г/л до 6,3 г/л, нарастание секреции М-протеина в моче до 495 мг/24 ч, появление новых остеодеструктивных очагов в костях черепа).

Учитывая наличие раннего рецидива, молодой возраст пациентки и планируемое проведение ауто-ТГСК, согласно рекомендациям NCCN была начата индукционная полихимотерапия 2-ой линии в режиме «Rd» «леналидомид 25 мг Д1-21 + дексаметазон 40 мг 1,8,15,22». Всего было проведено 9 курсов с достижением максимального ответа в виде стабилизации заболевания.

В 02.2012 г., на фоне проведения терапии «Rd» была отмечена прогрессия заболевания (гиперкальциемия, появление новых литических очагов в костях, нарастание М-протеина мочи до 762 мг/сутки, М-протеин сыворотки крови 6 г/л).

Перед аутологичной трансплантацией ГСК с целью циторедукции опухолевой массы проведен 1 курс полихимиотерапии режиме EDAP «этопозид + дексаметазон + цитарабин + карбоплатин» с достижением стабилизации заболевания.

С целью мобилизации ГСКПК проводилась стимуляция G- CSF в дозе 10 мкг/кг/сут с последующим проведением цитафереза ГСКПК. За 2 сеанса цитафереза суммарно забрано 3,25 млн. СД34$^+$ 45$^+$ кл. на кг. веса пациентки.

31.05.12 г на фоне стабилизации заболевания выполнена аутологичная трансплантация ГСКПК, режим кондиционирования — Мелфалан 200 мг/м^2. Восстановление гемопоэза на Д+20.

В настоящее время по данным обследования через 6 месяцев после проведенной аутологичной ТПГСК имеет место достижение и сохранение очень хорошего частичного ответа (VGPR). Пациентка не получает поддерживающей терапии.

Случай 2.

БАВ, 30 лет. Пациент, с установленным в ноябре 2011г. диагнозом: Множественная миелома, диффузно — очаговая форма, Ig G каппа вариант, III B стадия, ISS 3.

Диагноз установлен на основании выявленного клонального плазмоцитоза костного мозга (31 %), секреции моноклонального парапротеина в сыворотке крови, представленного IgG (уровень IgG 83,48 г/л, гиперпротеинемией 110 г/л, гаммаглобулины 53,5 %, М-градиент), моноклонального парапротеина мочи, представленного каппа-цепью (протеинурия 3,3 г/л, по данным иммунофиксации выявлен белок Бенс-Джонса, каппа-вариант), ассоциированных органных дисфункций (выраженный остеодеструктивный синдром, гиперкальциемия, анемия 2 степени, почечная недостаточность).

Индукционная полихимиотерапия в режиме «PAD» (бортезомиб + дексаметазон + доксорубицин) в стандартных дозах, 4 курса с достижением максимального ответа в виде стабилизации заболевания (сохранение гиперпротеинемии 97,36 г/л, уровень IgG 63,8 г/л, протеинурия 1,26 г/л, сохранение гиперкальциемии, анемии 2 степени). Однако на фоне терапии бортезомибом удалось нормализовать степень клубочковой фильтрации.

Учитывая наличие бортезомиб-резистентности, пациенту была начата индукционная полихимотерапия 2-ой линии в режиме «Rd» (леналидомид 25 мг Д1-21 + дексаметазон 40 мг 1, 8, 15, 22 дни), 4 курса с достижением частичной ремиссии заболевания от 07.2012 г. (редукция уровня парапротеина, уровня IgG на 80 %, уровня М-протеина мочи > 90 %).

С целью мобилизации ГСКК проводилась стимуляция G- CSF в дозе 10 мкг/кг/сут с последующим проведением цитафереза ГСКК. За 2 сеанса цитафереза суммарно забрано 5,42 млн СД34$^+$45$^+$ кл. на кг. веса пациента.

08.10.12 г на фоне частичной ремиссии заболевания выполнена аутологичная трансплантация ПГСКК, режим кондиционирования — Мелфалан 200 мг/м^2.

Восстановление гемопоэза на Д+16. В настоящее время по данным обследования через 3 месяца после проведенной аутологичной ТПГСК имеет место достижение VGPR. .

Заключение

Лечение пациентов с множественной миеломой в настоящее время является сложной и полностью еще не решёной медицинской проблемой. В настоящее время в РФ у больных миеломой, которым планируется проведение ауто-ТГСК в качестве индукционной терапии 1-й линии применяются бортезомиб-содержащие режимы. В случае рефрактерности к бортезомибу или наличия ранних рецидивов после индукционной терапии бортезомиб-

содержащими режимами нами успешно применяется режим химиотерапии «Rd» (леналидомид + низкие дозы дексаметазона).

Основываясь на международных данных о возможности затруднений при проведении мобилизации и цитафереза ГСКПК после применения леналидомида мы провели попытки мобилизации ГСКПК у 4-х больных миеломной болезнью. У всех пациентов нам удалось забрать количество ГСКПК, достаточное для проведения успешной аутологичной ТГСК.

Мы считаем, что режимы ХТ с использованием леналидомида могут и должны применяться у пациентов с множественной миеломой, являющихся кандидатами для проведения аутологичной ТГСК.

Литература

1. *Alexander D.D., Mink P.J., Adami H.O. et al*. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature // Int. J. Cancer. — 2007. — Vol. 120. — P. 40–61.

2. *Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G. et al.* International staging system for multiple myeloma // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 15. — P. 3412–3420.

3. *Fonseca R., Barlogie B., Bataille R. et al.* Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report // Cancer. Res. — 2004. — Vol. 64. — P. 1546–1558.

4. *Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P. et al.* Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome // Blood. — 2007. — Vol. 109, № 8. — P. 3489–3495.

5. *Gertz M.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A. et al.* Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and −17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy // Blood. — 2005. — Vol. 106, № 8. — P. 2837–2840.

6. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Multiple Myeloma. — 2012. — Vol. 1.

7. *Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies // Blood. — 2008. — Vol. 111. — P. 2516–2520.

8. *Lahuerta J.J., Mateos M.V., Martínez-López J. et al.* Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: Sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival // J. Clin. Oncol. — 2008. — Vol. 26. — P. 5775– 5782.

9. *Barlogie B., Anaissie E., Haessler J. et al.* Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma // Cancer. — 2008. — Vol. 113. — P. 355–359.

10. *Kyle R.A., Durie B.G., Rajkumar S.V,et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management //Leukemia. — 2010. — Vol. 24, № 6. — P. 1121–1127.

11. *Bird J.M., Owen R.G., D'Sa S.,* Snowden *J.A.*, Pratt G. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma // British Journal of Haematology. — 2011. — Vol. 154. — P. 32–75.

12. *Harousseau J.-L., Dreyling M.* Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Annals of Oncology 21. — 2010. —Vol. 5 — P. 155–157.

13. *Gore, M.E., Selby, P.J., Viner, C. et al.* Intensive treatment of multiple myeloma and criteria for complete remission // Lancet. — 1989. — Vol. 2. — P. 879–882.

14. *Alexanian, R., Barlogie, B. & Tucker,* S. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma // American Journal of Hematology. — 1990. — Vol. 33. — P. 86–89.

15. *Samson D., Gaminara E., Newland A. et al.* Infusion of vincristine and doxorubicin with oraldexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma // Lancet. — 1989. — Vol. 2. — P. 882–885.

16. *Barlogie B, Smith L, Alexanian R.* Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents // New Engl. J. Med. — 1984. — Vol. 310. — P. 1353–1356.

17. *Lokhorst H.M., van der Holt B., Zweegman S., et al.* A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high-dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma // Blood. — 2010. — Vol. 115, № 6. — P. 1113–1120.

18. *Owen R.G., Jackson G.H., et al.* MRC Myeloma IX: preliminary results from the intensive pathway study [abstract] // Clin Lymphoma Myeloma. — 2009. — Vol. 9, № 1. — Abstract 546.

19. *Harousseau J.L., Mathiot C., Attal M. et al.* Bortezomib/dexamethasone is superior to vincristine-doxorubicin-dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantion in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005/01 phase 3 trial // Journal of Clinical Oncology. — 2010. — Vol. 28. — P. 4621–4629.

20. *Sonneveld P., van der Holt B., Schmidt-Wolf I.G.H. et al.* First analysis of HOVON- 65/GMMG-HD4 randomized phase III trial comparing bortezomib, adriamycine, dexamethasone (PAD) vs VAD as induction treatment prior to high dose melphalan (HDM) in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) // Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). — 2010. — Vol. 112. — Abstract 653.

21. *Lonial S., Cavenagh J.* Emerging combination treatment strategies containing novel agents in newly diagnosed multiple myeloma // British Journal of Haematology. — 2009. — Vol. 145. — P. 681–708.

22. *Cavo M.S., Rajkumar V., Palumbo A., Moreau P.* International MyelomaWorking Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation // Blood. — 2011. — Vol. 117. — P. 6063–6073.

23. *Sonneveld P., Schmidt-Wolf IGH, Van der Holt B., et al.* HOVON-65/GMMG-HD4 randomized phase III trial comparing bortezomib, doxorubicin, dexamethasone (PAD)

vs VAD followed by high-dose melphalan and maintenance with bortezomib or thalidomide in patients with newly diagnosed multiple myeloma [abstract] // Blood. — 2010. — Vol. 116, № 21. — Abstract 40.

24. *Cavo M., Tacchetti P., Patriarca F., et al.* Bortezomib, thalidomide and dexamethasone compared with thalidomide and dexamethasone as induction before and consolidation therapy after double autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results from a randomized phase III study // Lancet. — 2010. — Vol. 379, № 9758. — P. 2075–2085.

25. *Avet Loiseau H., Leleu X., Roussel M., et al.* Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) but not outcome of patients with del(17p) // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 30. — P. 4630–4634.

26. *Fortunato M.* Safety and efficacy of bortezomib-based regimens for multiple myeloma patients with renal impairment: a retrospective study of Italian Myeloma Network GIMEMA // European Journal of Haematology. — 2010. — Vol. 84. — P. 223–228.

27. *Chanan-Khan A.A., Kaufman J.L., Mehta J. et al.* Activity and safety of bortezomib in multiple myeloma patients with advanced renal failure: a multicenter retrospective study // Blood. — 2007. — Vol. 109, № 6. — P. 2604–2606.

28. *Jian Li, Expert Rev.* Bortezomib and Dexamethasone Therapy for Newly Diagnosed Patients With Multiple Myeloma Complicated by Renal Impairment // Hematol. — 2012. — Vol. 5, № 1. — P. 51–68.

29. *Eriksson T., Hoglund P., Turesson I.et al.* Pharmacokinetics of thalidomide in patients with impaired renal function and while on and off dialysis // Pharm Pharmacol. — 2003. — Vol. 55, P. 1701–1706.

30. *Kumar S., Giralt S., Stadtmauer E.A., Jean L.* Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide, lenalidomide or bortezomib — containing regimens // Blood . — 2009.

31. *Barlogie B., Kyle R.A., Anderson K.C.*. Standard Chemotherapy Compared With High-Dose Chemoradiotherapy for Multiple Myeloma: Final Results of Phase III US Intergroup Trial S9321 // J Clin Oncol . — 2010. — Vol. 24. — P. 929–936.

32. *Hahn T., Wingard J.R., Anderson K.C. et al.* The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of multiple myeloma: an evidence-based review. // Biol Blood Marrow Transplant. — 2003. — Vol. 9, № 1. — P. 4–37.

33. *Kumar S, Lacy M.Q., Dispenzieri A. et al.* High-dose therapy and autologous stem cell transplantation for multiple myeloma poorly responsive to initial therapy // Bone Marrow Transplant. — 2004. — Vol. 34, № 2. — P. 161–167.

34. *Attal M., Harrousseau J.L. et al.* A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplant and chemotherapy in multiple myeloma // N. Engl. J. Med. — 1996. — Vol. 35. — P. 91–97.

35. *Moreau P., Facon T., Attal M. et al.* Comparison of 200 mg/m(2) melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m(2) melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myélome 9502 randomized trial // Blood. — 2002. — Vol. 99, № 3. — P. 731–735.

36. *Cunningham D., Paz-Ares L., Milan S. et al.* High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma // — 1994. — Vol. 12, № 4. — P. 759–763.

37. *Palumbo A., Bringhen S., Petrucci M.T., Musto P.* Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial // Blood. — 2004. — Vol. 104. — P. 3052–3057.

38. *Tricot G., Alberts D.S., Johnson C. et al.* Safety of autotransplants with high-dose melphalan in renal failure: a pharmacokinetic and toxicity study // Clin Cancer Res. — 1996. — Vol. 2. — P. 947–952.

39. *San Miguel J.F., Lahuerta J.J., Garcia-Sanz R. et al.* Are myeloma patients with renal failure candidates for autologous stem cell transplantation? // Hematol J. — 2000. — Vol. 1. — P. 28–36.

40. *Knudsen L.M., Nielsen B., Gimsing P., Geisler C.* Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: outcome in patients with renal failure // Eur J Haematol. — 2005. — Vol. 75. — P. 27–33.

41. *Lee C.K., Zangari M., Barlogie B. et al.* Dialysis-dependent renal failure in patients with myeloma can be reversed by high-dose myeloablative therapy and autotransplant // Bone Marrow Transplant. — 2004. — Vol. 33, P. 823–828.

42. *Desikan K.R., Tricot G, Munshi N.C., Annaissie E., Spoon D., Fassas A. et al.* Preceding chemotherapy, tumour load and age influence engraftment in multiple myeloma patients mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone // Br. J. Haematol. — 2001. — Vol. 112. — P. 242–247.

43. *Kumar S., Dispenzieri A., Lacy M.Q., et al.* Impact of lenalidomide therapy on stem cell mobilization and engraftment post-peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed myeloma // Leukemia. — 2007. — Vol. 21. — P. 2035–2042.

44. *Mazumder A., Kaufman J., Niesvizky R. et al.* Effect of lenalidomide therapy on mobilization of peripheral blood stem cells in previously untreated multiple myeloma patients // Leukemia. — 2007. — Vol. 22. — P. 1280–1281.

45. *Paripati H., Stewart A.K., Cabou S., et al.* Compromised stem cell mobilization following induction therapy with lenalidomide in myeloma // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — P. 1281–1284.

46. *Mazumder A., Kaufman J., Niesvizky R. et al.* Effect of lenalidomide therapy on mobilization of peripheral blood stem cells in previously untreated multiple myeloma patients // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — P. 1280–1281.

47. *Paripati H., Stewart A.K., Cabou S., et al.* Compromised stem cell mobilization following induction therapy with lenalidomide in myeloma // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — P. 1282–1284.

48. *Rajkumar SV, Jacobus S, Callander N, et al.* Phase III trial of lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone in newly

diagnosed multiple myeloma (E4A03): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group // J Clin Oncol. — 2007. — Vol. 25, № 18. — P. 8025.

49. *Kumar S., Giralt S., Stadtmauer E.A., Harousseau J.L., Palumbo A.* Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 9. — P. 1729–1735.

50. *Popat U., Saliba R., Thandi R. et al.* Champlin R., Giralt S. Impairment of filgrastim-induced stem cell mobilization after prior lenalidomide in patients with multiple myeloma // Biol Blood Marrow Transplant. — 2009. — Vol. 15, № 6. — P. 718–723.

51. *Koh K.R., Janz M., Mapara M.Y., et al.* Immunomodulatory derivative of thalidomide (IMiD CC-4047) induces a shift in lineage commitment by suppressing erythropoiesis and promoting myelopoiesis. // Blood. — 2005. — Vol. 105. — P. 3833–3840.

52. *Anderson G., Gries M., Kurihara N., et al.* Thalidomide derivative CC-4047 inhibits osteoclast formation by down-regulation of PU.1 // Blood. — 2006. — Vol. 107. — P. 3098–3105.

53. *Popat U., Saliba R., Thandi R., et al.* Impairment of filgrastim-induced stem cell mobilization after prior lenalidomide in patients with multiple myeloma // Biol Blood Marrow Transplant. — 2009. — Vol. 15. — P. 718–723.

54. *Mark T., Stern J., Furst J.R., et al.* Stem cell mobilization with cyclophosphamide overcomes the suppressive effect of lenalidomide therapy on stem cell collection in multiple myeloma // Biol Blood Marrow Transplant. — 2008. — Vol. 14. — P. 795–798.

55. *Kumar S., Lacy M., Dispenzieri A., et al.* Stem Cell Mobilization Following Initial Therapy with Lenalidomide and Dexamethasone in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma // Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). — 2008. — Vol. 112. — P. 3467.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОГНОЗА И ПЕРСОНАЛИЗАЦИОННОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ ТЕРАПИИ РЕЦИДИВОВ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Л.Л. Гиршова, Е.Г. Романова, Е.Н. Горюнова, Р.И. Вабищевич, А.В. Петров, Д.В. Моторин, В.В. Иванов, И.В. Холопова, Т.С. Никулина, Ю.В. Миролюбова, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Гиршова Лариса Леонидовна. — врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Романова Екатерина Геннадьевна* – научный сотрудник Института гематологии, врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Горюнова Елена Николаевна* — врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Вабищевич Раиса Ипполитовна* — врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Петров Алексей Владиленович* — врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Моторин Дмитрий Васильевич* — кандидат медицинских наук, научный сотрудник Института гематологии, врач-гематолог отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации; *Иванов Владимир Вячеславович* – врач-реаниматолог, заведующий отделением гематологической реанимации; *Холопова Ирина Валерьевна* – младший научный сотрудник НИЛ онкогематологии, врач лаборатории иммунологии и генетики ЦКДЛ; *Никулина Татьяна Серафимовна* — младший научный сотрудник НИЛ онкогематологии, врач — лабораторный генетик лаборатории иммунологии и генетики ЦКДЛ; *Миролюбова Юлия Владимировна* — врач ЛКД ЦКДЛ; *Алексеева Юлия Алексеевна* — кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации, гематолог, онколог; *Зарицкий Андрей Юрьевич* – доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии, заведующий НИЛ онкогематологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А.Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел. (812) 702–37–65. E-mail: agirshov@mail.ru (Гиршова Лариса Леонидовна).

Резюме

Прогресс в понимании патофизиологии лейкоза и риск-адаптированная направленность лечения de novo ОМЛ позволили значительно улучшить результаты терапии в последние десятилетия. Однако, у большинства пациентов достигших ремиссии, в течение следующих 3 лет развивается рецидив заболевания. Выбор химиотерапевтической тактики в рецидиве является сложной и актуальной проблемой. Разработка и усовершенствование прогностических факторов позволяет определить оптимальную тактику и индивидуализировать терапию в данной группе. **Цель исследования**. Оценка эффективности проводимой противорецидивной терапии. Определение прогностических факторов оказывающих влияние на результаты лечения.

Материалы и методы. В проспективное исследование было включено 16 пациентов в возрасте от 18 до 64 лет с первым рецидивом ОМЛ. В качестве реиндукционных режимов использовались протоколы FLAG и HDAC. Медиана наблюдения составила 10 месяцев. **Результаты.** Вероятность достижения ремиссии составила 87,5 %. 78 % достигли ремиссии после первого индукционного курса. Медиана безрецидивной выживаемости соответствовала 11 неделям наблюдения. Вероятность общей выживаемости составила 42 %. Достоверной разницы в общей выживаемости пациентов при проведении ТКМ и у нетрансплантированных пациентов получено не было. Достоверно более высокая выживаемость была выявлена среди пациентов с нормализацией уровня WT1на 14 день индукционного курса терапии. **Выводы.** Режим «FLAG» является хорошо переносимым, эффективным режимом реиндукции ремиссии. Нормализация уровня экспрессии WT1 на14 день от начала терапии является фактором прогноза длительности общей выживаемости пациентов в первом рецидиве ОМЛ.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, рецидив, прогноз, FLAG, WT1.

CURRENT APPROACHES TO DEFINITION OF PROGNOSIS AND PERSONALIZATION OF TARGETED THERAPY OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA RELAPSES

L.L. Girshova, E.G. Romanova, E.N. Gorunova, R.I. Vabishevich, A.V. Petrov, D.V. Motorin, V.V. Ivanov, I.V. Kholopova, T.S. Nikulina, J.V. Mirolubova, Yu.A. Alexeeva, A.Yu. Zaritskey

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Institute of Hematology, 2 Akkuratova st., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: agirshov@mail.ru (Larisa L. Girshova — hematologist of chemotherapy of hematologic diseases department with transplantation unit).

Abstract

Understanding of the pathophysiology of leukemia and risk-adapted chemotherapy denovoAML significantly improved the results of the AML therapy in the last decade. However, relapse occurs in most of patients in a first remission within 3 years. Choice of chemotherapeutic tactic of AML relapse is a complex and important issue. Development and improvement of prognostic factors determines the optimal tactic and individualizes therapy in this group. **Purpose.** To evaluate the effectiveness of AML relapse treatment. To determinate prognostic factors that significantly influence to the outcome. **Materials and methods**. The prospective study included 16 adult patients with the first AML relapse. Standard regimens FLAG and HiDAC were used to relapse induction. **Results.** The probability of remission in the study group was 87,5 %. 78 % patients achieved remission after the first induction course. Median time to relapse was 36 weeks. The probability of overall survival was 42 %. There was no difference in overall survival in patients with relapsed AML and BMT and in patients without BMT. Significantly higher survival rate was found among patients with normal levels of WT1 on day 14 of induction therapy. **Conclusions.** FLAG regimen is well tolerated and effective to induction of remission in AML relapse. Normalization of WT1 level on day 14 of induction therapy is a prognostic factor for overall survival of patients with the first AML relapse.

Key words: Acute myeloid leukemia, relapse, prognosis, FLAG, WT1.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 20.10.2012.

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным вариантом острого лейкоза у взрослых с частотой, увеличивающейся с возрастом. Современные индукционные программы химиотерапии позволяют достигать полной ремиссии у 50–90 % пациентов с de novo ОМЛ. Прогресс в понимании патофизиологии лейкоза и риск-адаптированная направленность программной химиотерапии de novo ОМЛ, включающей в себя индукционный курс в режиме «7+3», проведение консолидирующих курсов с высокодозным цитозаром и/или выполнение аллогенной ТГСК позволило значительно улучшить результаты терапии в последние десятилетия. Однако, у большинства пациентов достигших ремиссии, в течение следующих 3 лет развивается рецидив заболевания. Вероятность развития рецидива заболевания зависит от молекулярно-цитогенетической группы риска, возраста и выбора постремиссионной тактики. Сохраняющаяся высокая частота рецидивов по-прежнему является основной причиной гибели пациентов.[1, 2] В целом, прогноз для пациентов после рецидива заболевания остается неблагоприятным, а результаты лечения неудовлетворительными [5, 6].

Проведение химиотерапии в 1 рецидиве заболевания приводит к достижению значительно меньшего процента ремиссий [3], а средняя продолжительность второго безрецидивного интервала, как правило, значительно короче первого [4].

Выбор химиотерапевтической тактики в рецидиве заболевания является достаточно сложной и актуальной проблемой. Проведение крупных многоцентровых контролируемых проспективных исследований в данной группе пациентов является редкостью, и соответственно не существует однозначных стандартов ведения пациентов с рецидивом ОМЛ. Достижение полной ремиссии (ПР) при рецидиве острого миелобластного лейкоза имеет решающее значение для улучшения прогноза и выживаемости пациентов [7–9]. Пациенты, достигшие второй ремиссии, являются кандидатами для выполнения аллогенной трансплантации ге-

мопоэтических стволовых клеток с достижением долгосрочной выживаемости 30–40 %.

Одним из наиболее эффективных препаратов в лечении ОМЛ является цитарабин [10–12]. Поэтому большинство химиотерапевтических режимов, используемых в терапии рецидивов ОМЛ, включает в себя высокие или средневысокие дозы цитозара в монорежиме или в сочетании с антрациклинами, этопозидом, флударабином [13].

Эффективность цитарабина значимо зависит от его внутриклеточного преобразования в активный метаболит — Ara-C 5-трифосфата (Ara-CTP). Было показано, что флударабин усиливает внутриклеточные накопления ара-CTP, тем самым увеличивая цитотоксический эффект цитарабина (16). Активный метаболит флударабина (Ф-ара-АТФ) оказывает непосредственно стимулирующий эффект на дезоксицитидинкиназу и опосредованно уменьшает концентрацию dCTP, конкурирующего с Ara-C за встраивание в ДНК и ингибирующего активность дезоксицитидинкиназы. Представленный в литературе анализ исследований in vitro и in vivo, достоверно показывает 2–3-х кратное увеличение аккумуляции активного метаболита цитозара в лейкемических бластных клетках при инкубации с флударабином и, соответственно, усиление цитостатического эффекта и апоптоза. Кроме того, за счет увеличения пула делящихся клеток более чувствительных к цитотоксическому действию препаратов под воздействием гемопоэтических факторов роста, предполагается дополнительное улучшение ответа на лечение [21–24]. G-CSF также потенцирует эффект цитарабина за счет увеличения его включение в ДНК [21–23]. В связи с синергичным действием этих препаратов, эффективность их комбинации изучали у пациентов с впервые выявленным ОМЛ высокой группы риска, рефрактерного течения и в качестве начальной терапии спасения при рецидиве ОМЛ [17–20]. Достижение CR в этих исследованиях находится в диапазоне от 36 до 80 % [17, 19, 25].

Таблица 1 [14]

	Режим терапии	**Кол-во пациентов**	**Медиана возраста (годы)**	**% Ремиссии**
Herzig et al 1985, нерандомизированное	Цитозар Цитозар+Доксорубицин или Даунорубицин	78	37	63/65
Vogler et al 1994, рандомизированное фаза III	Высокией дозы Цитозара Высокие дозы Цитозара + Этопозид	131	-	31/38
Kern et al 1998, рандомизированное фаза III	Высокие дозы Цитозара+Митаксантрон Средние дозы Цитозара + Митоксантрон	186	50	47
Ferrara et al 1999, нерандомизированное	FLAG	26	39	50
Estey et al 1993, фаза II	Флударабин+Цитозар	59	52	36
Pastore et al 2003, нерандомизированное	Флударабин + Цитозар + Идарубицин + Г-КСФ	46	41	52
Martin et al 2009, нерандомизированное	Флударабин+Цитозар + Идарубицин + гемтузумаб + Г-КСФ	71	48	29 (+гемтузумаб) 39 (без гемтузумаба)
Litzow et al 2010, рандомизированное фаза II	Средние дозы цитозара+гемтузумаб Средние дозы цитозара + липосомальный Даунорубицин Цитозар+Циклофосфан+ топотекан	82	60 52 53	12 7 4
Spadea et al 1993, нерандомизированное	Митоксантрон+Цитозар +Этопозид	74	36	55
Ohno et al 1994, рандомизированное фаза III	Митоксантрон+Этопозид + Цитозар +Г-КСФ	50	43/47	54/42
Thomas et al 1999, рандомизированное фаза III	Митоксантрон+Цитозар + Этопозид +Г-КСФ	192	47/46	65/59
Archimbaud et al 1995, фаза II	Митоксантрон+Цитозар + Этопозид	133	43	60

Таблица 2 [25]

	Дизайн исследования	**Режим**		**Ремиссия**	**Медиана БРВ**	**Медиана ОВ**
Estey et al 1993	Без сравнения	Флударабин 30 мг/м2 5 дней +цитарабин 0,5г/ м2/час 2–6 часа/ день 6 доз	Рефрактераные или рецидивные ОМЛ	21/59 (36 %)	39 недель	
Clavio et al 1996	Ретроспективно без сравнения	FLAG/FLANG	Рефрактераные рецидивы с факторами плохого прогнозы все пациенты	8/10 (80 %) 3/10 (30 %) 19/31 (61 %) 30/51 (59 %)		9 мес
Gobbi et al 1997	Ретроспективно без сравнения	FLAG/FLANG/FLAG Ida	Рефрактерные рецидивы	7/11(64 %) 34 %		
Nokes et al 1997	Ретроспективно без сравнения	FLAG	Рефрактерные рецидивы	4/4 (100 %) 13/19 (68 %)		
Montillo et al 1998	Проспективное без сравнения	FLAG	Рецидивы Рефрактерные все пациенты	14/22 (64 %) 7/16(44 %) 21/38 (55 %)	13 мес	9 мес
Ferrara et al 1999	Без сравнения	FLAG	Рецидивы после аллоТКМ	13/26 (50 %)	13 мес	6 мес

	Дизайн исследования	Режим		Ремиссия	Медиана БРВ	Медиана ОВ
Jackon et al 2001	Фаза II,без сравнения	FLAG	Поздний рецидив Ранний рецидив + рефрактерные все пациенты	17/21 (81 %) 13/44 (30 %) 46 %	8,2 мес 0	>16,2 мес 3 мес
Hanel et al 2001	Рандомизированное, пилотное	FLANG	Рецидивы ОМЛ, рефрактерные	17/29 (59 %)	3,2 мес	6,8 мес
Pastore et al 1999	Проспективное	FLAG-Ida	Рефрактерные рецидивы Все пациенты	5/10 (50 %) 19/36 (53 %) 24/46 (52 %)	12 мес	11 мес
Steinmetz et al 1999	Фаза II, без сравнения	FLAG-Ida	Рецидивы Рефрактерные	12/15 (80 %) 1/14 (7 %)		
Kern et al 1999	Проспективное, рандомизированное	Высокие дозы цитарабина + Флударабин	Рецидивы ОМЛ, рефрактерные	21/46 (46 %)		

Таблица 3 [15]

Прогностический фактор	Коэффициент	Баллы
Время от первой ремиссии д о рецидива, месс >18 7–18 </ = 6	 0 0,69 1,28	 0 3 5
Цитогенетика на момент диагноза Т(16,16) или inv16 Т(8:21) Другие	 0 0,68 1,19	 0 3 5
Возраст на момент первого рецидива, годы </ = 35 36–45 >45	 0 0,21 0,47	 0 3 5
ТКМ перед первым рецидивом Нет Да (ауто или алло)	 0 0,49	 0 2

Таблица 4 [15]

Переменные	Достоверность
Включены в финальную модель Возраст рецидива Безрецидивный интервал Цитогенетика Т(8:21) Т(16:16) или inv(16) Предшествующая ТКМ	 < ,00001 < ,00001 < ,00001 < ,00003
Не включены в финальную модель FAB классификация на момент диагноза Уровень лейкоцитоз при диагнозе >20*109/л Количество индукционных курсов первой ремиссии	,06 ,08 ,79

Таблица 5 [13]

Риск	Количество баллов	Вероятность выживаемости, %	
		12 мес	5 лет
Благоприятный (9 %)	0–6	70	46
Промежуточный (25 %)	7–9	49	18
Неблагоприятный (66 %)	10–14	16	4

Как и для пациентов с de novo ОМЛ, для определения оптимальной терапевтической тактики в рецидиве заболевания выделена группа прогностических факторов достоверно оказывающих влияние на результаты лечения, и позволяющих индивидуализировать терапию. На основании ретроспективного анализа данных Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group и Swiss Group for Clinical Cancer Research Collaborative

Group был разработан прогностический индекс для пациентов с рецидивом ОМЛ, включающий четыре клинически значимых параметра (время от 1 ремиссии до рецидива заболевания, возраст, цитогенетику, и предыдущие трансплантации) [15].

Предложенный прогностический индекс оценки больных ОМЛ в первом рецидиве позволяет дифференцировать прогноз пациентов с первым рецидивом ОМЛ, удобен для использования в клинической практике и позволяет дифференцированно подходить к определению терапевтической тактики.

Пациенты с относительно лучшим прогнозом в отношении выживаемости относятся к группам благоприятного и промежуточного риска (менее 10 баллов) и являются кандидатами для проведения интенсивного курса реиндукции ремиссии и аллогенной ТКМ. В противоположность этим группам, пациенты с высоким прогностическим индексом (более 10) имеют крайне неблагоприятный прогноз (6 % 5-летняя общая выживаемость при проведении только химиотерапии), несколько улучшающийся при проведении аллогенной ТГСК (26 % 5-летняя общая выживаемость) [15]. При отсутствии совместимых доноров пациенты данной группы могут являться кандидатами проведения экспериментальных методов лечения или паллиативной терапии.

ОМЛ является гетерогенной группой включающей в себя различные ЦГ и молекулярные аномалии, имеющие доказанную прогностическую значимость для пациентов с de novo ОМЛ, позволяющие оценить полноту ремиссии и осуществлять мониторинг МОБ. Однако, не смотря на прогресс в данной области, значительная часть пациентов не имеет таргентного молекулярного маркера, позволяющего оценивать МОБ. В качестве такого маркера было предложено использовать ген WT1. WT1– ген супрессор опухоли Вильмса у детей, локализованный на хромосоме 11p13 — кодирует транскрипционный фактор и репрессирует транскрипцию ростовых факторов PDGF-A цепи, CSF-1 и IGF-II, гена рецептора IGF-IR, генов RAR-α, c-myc и bcl-2. WT1 экспрессируется на нормальных CD34+ клетках-предшественнках и исчезает на этапе дифференцировки до зрелых лейкоцитов.

Повышение экспрессии гена WT1 определяется в 73–93 % ОМЛ [26] и может являться полезным маркером для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ). Количественное определение уровня транскрипта WT1 в периферической крови (ПК) и костном мозге (КМ) и степени его редукции на этапе восстановления после химиотерапии позволяет стратифицировать пациентов по группам риска. Отсутствие нормализации уровня WT1 в CR коррелирует с низким уровнем EFS и OS [27], а появление повышенной экспрессии маркера на фоне молекулярной ремиссии обычно позволяет оценить время до развития костно-мозгового рецидива. На сегодняшний день подавляющее большинство исследований посвященных прогностической значимости WT1 выполнено в группах пациентов с ОМЛ de novo. Рецидив ОМЛ традиционно рассматривается как прогностически неблагоприятное событие, требующее выполнения аллоТКМ.

Однако, в условиях современной практической медицины в РФ, с учетом времени необходимого на поиск и активацию неродственного донора в условиях региональных гематологических центров, актуальным остается вопрос оценки ожидаемой длительности второй ремиссии. В связи с этим ведется активный поиск достоверных прогностических маркеров, определяющих целесообразность проведения у таких пациентов родственной гаплоидентичной трансплантации или трансплантации пуповинной крови в качестве терапии спасения, предполагая априори невозможность дождаться активации максимально совместимого неродственного донора и высоковероятную смерть от инкурабельного течения ОМЛ в прогностически неблагоприятной группе.

Материалы и методы

За период с 2009 по 2012 год в гематологическом отделении ФГУФЦСКЭ пролечено 52 пациента с ОМЛ. 5 пациентов с М3-вариантом ОМЛ. 20 пациентов с рецидивом заболевания. Из них в проспективное исследование было включено 16 пациентов в возрасте от 18 до 64 лет с первым рецидивом ОМЛ. Медиана возраста 35,5 лет. Характеристика пациентов представлена в таблице 7. Ремиссия в соответствии с международными стандартами была верифицирована при уровне бластов в костном мозге не более 5 % на фоне как минимум умеренно клеточного костного моз-

Таблица 6 [15]

ОБЩАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ В ТРЕХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВАРИАНТА ТЕРАПИИ В РЕЦИДИВЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. P = 0,0008

Прогностическая группа	Терапия	Кол-во пациентов	Общая выживаемость, %	
			12 мес	5 лет
Благоприятный риск, А	Химиотерапия аутоТКМ аллоТКМ	14 14 17	64 100 88	33 55 88
Промежуточный риск, В	Химиотерапия аутоТКМ аллоТКМ	28 22 41	71 73 75	31 0 48
Неблагоприятный риск, С	Химиотерапия аутоТКМ аллоТКМ	34 28 51	49 54 55	6 9 26

Таблица 7

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

Медиана возраста на момент диагноза (лет)	35,5 (18–64)
Распределение по полу: мужчины:женщины	11:5
Распределение по группам риска А:В:С	3:7:6
Медиана наблюдения	40,19 недель
Ранний:поздний рецидив (до и после 6 мес от верификации ремиссии)	4:12
Медиана развития рецидива (мес.)	10,7 (2,2 – 51,2)
Предлеченность	1 пациент после родственной аллоТКМ.
Первый индукционный противорецидивный курс в режиме «FLAG»	13 (76 %)

га, восстановления уровня тромбоцитов более 100 × 10^9/л, уровня гемоглобина более 100 г/л. Рецидивом заболевания считалось повышение уровня бластоза костного мозга более 5 %, развитие экстрамедуллярных очагов поражения, в том числе нейролейкемии. Распределение по рецидивным группам риска производилось по критериям предложенным Breems et al.

В исследуемой группе всем пациентам проведено молекулярно-генетическое исследование (полимеразная цепная реакция, ПЦР в режиме реального времени). Количественная оценка уровня экспрессии WT1 была выполнена в образцах костного мозга полученных до начала курса химиотерапии, в день 14 и день 28 от начала лечения. Выделение WT1 проводилось согласно стандартному протоколу, разработанному Europe Against Cancer (EAC) с помощью набора реагентов profileQuant по протоколу [28]. Данная методика выполнялась на оборудовании Rotor-Gene 6000. Верхней границей нормальной экспрессии являлся уровень 250 WT1копий /10^4 копий ABL.

В качестве режима реиндукции использовались следующие протоколы ХТ:

Режим FLAG, в стандартных дозах (флюдарабин 30мг/ м^2 дни 1–5, Ara-C 2 г/м^2 через 4 часа после флюдарабина дни 1–5, G-CSF (в вариабельных дозах) с дня — 1(за 12–24 часа).

Режим «HDAC» Цитарабин — 3000 мг/м^2 внутривенная инфузия в течение 3 часов, каждые 12 часов на 500 мл физиологического раствора в дни 1,3 и 5.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи анализа выживаемости Kaplan Mayer Statistic версия 17.

Пациенты получали стандартные индукционные противорецидивные курсы терапии, возможность проведения стандартных высокодозных курсов терапии оценивалась по соматическому статусу и коморбидному фону.

Результаты

Частота достижения ремиссии в исследуемой группе составила 87,5 % (14/16), причем 11 из 14 пациентов (78 %) достигли ремиссии после первого индукционного противорецидивого курса и из них 90,9 % (10/11) пациентов — при использовании в качестве противорецидивного курса терапии по протоколу «FLAG» (Рис. 1, Рис. 3). Однако вероятность стабильного сохранения ремиссии составила всего 15 % с медианой наблюдения 27 недель среди пациентов с верифицированным рецидивом (n = 6) (Рис. 2). Достоверной разницы при оценке зависимости безрецидивной выживаемости от пола, возраста, времени развития рецидива получено не было. Вероятность общей выживаемости в исследуемой группе составила 42 % с медианой наблюдения 9 мес (1–27 мес) (Рис. 4). Так, к указанному сроку наблюдения частота случаев смерти составляет 50,0 % (8/16)), при этом 4 из 8 пациентов умерли от прогрессии острого лейкоза. Максимальный срок наблюдения пациентов в клинико-гематологической и молекулярной ремиссии составляет 30 месяцев.

7 из 16 (44,8 %) пациентов была выполнена аллогенная трансплантация ГСК (2 пациента гаплосовместимые родственные ТКМ). От разных осложнений посттрансплантационного периода погибло 4/7 пациентов, в том числе 2 пациента от неконтролируемой РТПХ IVст). У одного из пациентов развился рецидив ОМЛ в раннем посттран-

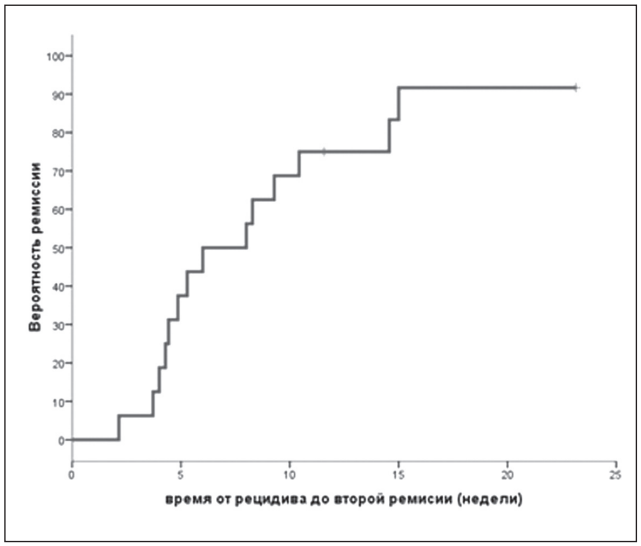


Рисунок 1. Вероятность достижения второй ремиссии

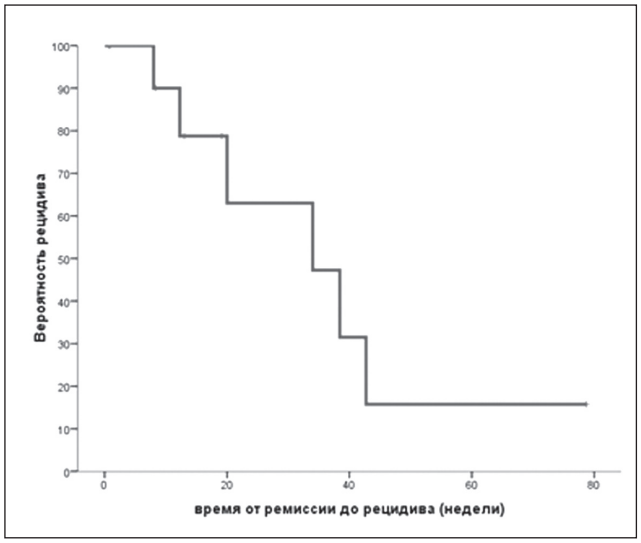


Рисунок 2. Вероятность безрецидивной выживаемости

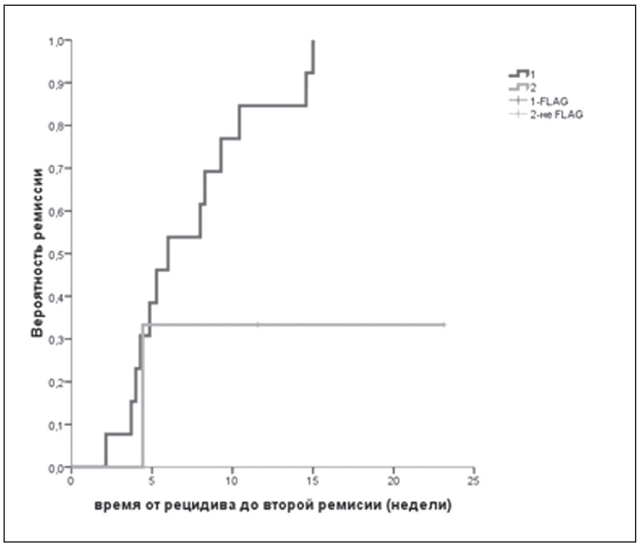


Рисунок 3. Вероятность достижения ремиссии в зависимости от режима первого индукционного курса (FLAG/не FLAG), p = 0,087

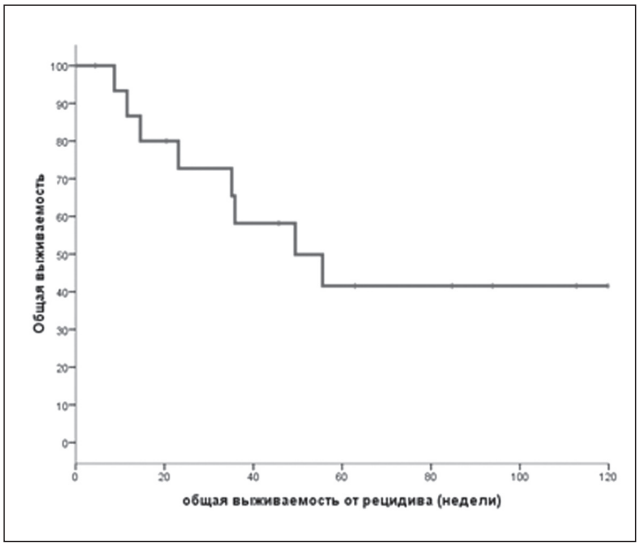


Рисунок 4. Вероятность общей выживаемости

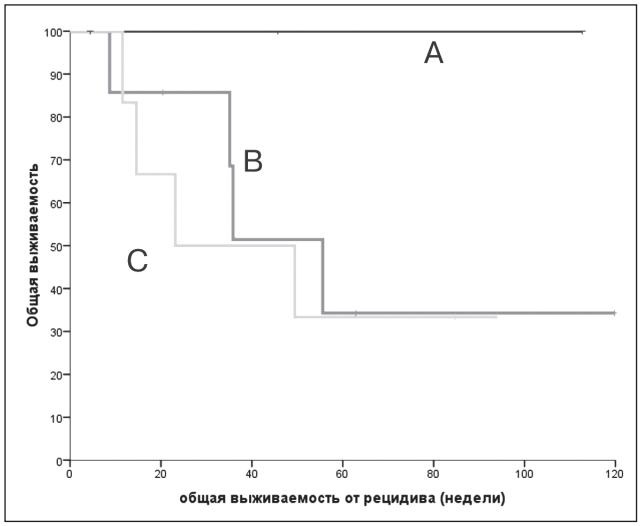


Рисунок 5. Общая выживаемость в зависимости от индекса рецидива (A, B, C), p = 0,42

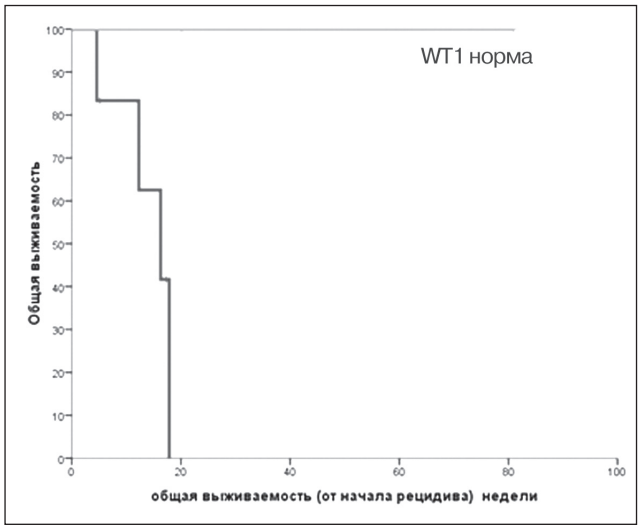


Рисунок 6. Общая выживаемость в зависимости от уровня WT1 на 14 день первого индукционного противорецидивного курса, p = 0,077

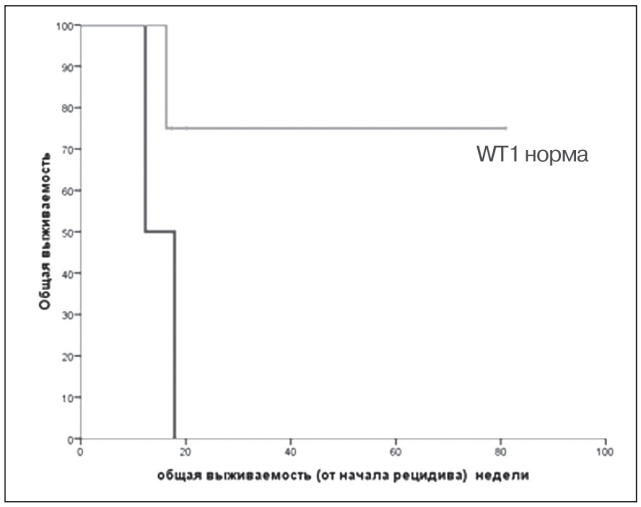


Рисунок 7. Общая выживаемость в зависимости от уровня WT1 на 28 день первого индукционного противорецидивного курса, p = 0,145

слантационном периоде. Достоверных отличий по общей выживаемости пациентов, получивших аллоТГСК или только интенсивную ПХТ, не получено. При этом следует отметить, что группы пациентов слишком небольшие для получения достоверных результатов.

При оценке прогностического индекса достоверно значимых различий в выживаемости пациентов в группах A и B/C получено не было (Рис. 5). Нельзя исключить погрешность измерений в связи с малым объемом исследуемой выборки.

Однако достоверно более высокая выживаемость была выявлена среди пациентов с нормализацией уровня WT1на 14 день индукционного курса терапии (2/2 и 4/6 соответственно, p = 0,07) (Рис. 6, Рис. 7).

Обсуждение

Несмотря на развитие целого ряда новых исследуемых методов лечения, терапия рецидивов ОМЛ по-прежнему остается сложной клинической проблемой.

Основным вопросом при определении тактики лечения пациентов с рецидивом ОМЛ остается выбор между стандартными интенсивными режимами реиндукции, (такими как FLAG или митоксантрон + этопозид) и паллиативным или экспериментальным видом лечения [29]. Режимы FLAG/FLANG являются одним из принятых стандартных вариантов реиндукционной терапии ОМЛ во многих европейских и американских гематологических центрах, позволяющие достигать до 80 % ремиссий. Полученные нами результаты (достижение CR, длительность CR) соответствуют опубликованным в литературе данным использования флюдаросодержащих режимов у пациентов с рецидивом ОМЛ.

В группе сопоставимых по возрасту пациентов с рецидивным и рефрактерным течением ОМЛ (15 пациентов), наблюдаемой нами в период с 1998–2007 гг. при использовании аналогичного режима терапии CR достигнута у 60 % пациентов, частичный ответ у 20 %. Рефрактерность была отмечена в 13,3 % случаев и один пациент (6,7 %) скончался от ранних осложнений (кровоизлияние в головной мозг). В 8 случаях CR была достигнута после первого курса химиотерапии. Длительность CR составляла в среднем 7,7месяцев (от 2 до 22 месяцев). У 4-х из 9 пациентов достигших CR зарегистрирован рецидив заболевания в сроки от 2 до 16 месяцев (в среднем 8месяцев). Медиана выживаемости составила 440 дней. Относительно более низкий процент полных ремиссий и их длительность в данном исследовании, вероятно, связан с

тем, что в группу были включены пациенты с более чем 1 рецидивом заболевания, а аллогенная ТГПСК была выполнена только 2 пациентам.

Режим «FLAG» является достаточно хорошо переносимым. В сравнении со стандартным индукционным режимом «7+3» при более длительном периоде панцитопении (28 дней против 24 дней p = 0·002) [30], негематологическая токсичность 3–4 степени наблюдается у достоверно меньшего количества пациентов и = значимо больший процент пациентов имеет достаточный уровень соматического статуса для проведения дальнейшей интенсификации и выполнения аллогенной ТКМ (89 % и 56 %, p = 0·0001) [30]. В проанализированной нами группе пациентов индукционной летальности отмечено не было.

Однако, как анализ литературных данных, так и собственных наблюдений данной группы пациентов, показывает, что при достаточно высокой вероятности достижения ремиссии при проведении интенсивных реиндукционных режимов, сохраняется высокий риск развития рецидивов в течение первого года. Актуальным остаётся вопрос и постремиссионной стратегии. Возможность проведения в дальнейшем на этапе консолидации своевременной аллогенной трансплантацией костного мозга или ПСК позволяет увеличить безрецидивную выживаемость в определенной группе пациентов.

Вероятность достижения второй ремиссии зависит от длительности первой ремиссии. По данным Estey и соавт. ремиссии достигали 60 % пациентов с длительностью 1 CR > 2 лет, 40 % с длительностью 1 CR 1–2 года и 15 % при длительности ремиссии < 1 года, соответственно (29). Предложенный Breems et al прогностический индекс для оценки прогноза в рецидиве заболевания позволяет более дифференцированно подходить к выбору тактики лечения. В полученных нами результатах оценки общей выживаемости в зависимости от прогностического индекса, не смотря на небольшую выборку пациентов и низкую достоверность отличий, прослеживается однозначная тенденция к достижению лучшего результата в группе благоприятного прогноза (группа А).

В 2010–2011 годах были опубликованы результаты двух больших ретроспективных исследований пациентов с 1 рецидивом ОМЛ.

Японские авторы представили анализ 1015 пациентов из 70 гематологических институтов. Мультивариантный анализ данных показал статистическую значимость ряда факторов (достижение CR2, выполнение ТКМ в 1 рецидиве после достижения ремиссии или как терапии спасения, длительность безрецидивного интервала, цитогенетическая группа риска, количество курсов до достижения 2CR) достоверно влияющих на общую выживаемость в 1 рецидиве заболевания [31], а так же возможность выбора оптимальной стратегии на основании цитогенетической группы риска заболевания.

В последние десятилетия все большее количество молекулярно-генетических аномалий, выявляемых при ОМЛ, получает доказательную базу их влияния на прогноз заболевания. Проведенные исследования позволили включить некоторые из них в классификацию ВОЗ 2008 года [32] и рекомендовать международной рабочей группе European LeukemiaNet использование их определения при стратификации ОМЛ de novo по группам риска [13]. В связи с этим, целью дальнейших проводимых исследований стала попытка инкорпорировать в прогностический индекс оценки рецидивов ОМЛ новых молекулярных маркеров.

Во Франко-Израильском исследовании, опубликованном в 2011году, наряду с двумя стандартными прогностическими факторами: длительность безрецидивного интервала (более 1 года или 6–12 месяцев и рефрактерные) и цитогенетическая группа риска (высокая или промежуточная + низкая), использовалось наличие мутации *FLT3ITD* как фактора неблагоприятного прогноза. На основании количества факторов прогноза было выделено 3 прогностических группы (0 баллов, 1 балл и 2–3 балла) имеющих ожидаемую 2-х летнюю выживаемость соответственно 58 %, 38 % и 12 %. Наличие мутации *FLT3ITD* (промежуточная-1 группа риска соответственно рекомендациям ELN) значимо ухудшало результаты терапии в данном исследовании, относя пациентов в группу неблагоприятного прогноза [38]. Важно отметить, что в отличие от предыдущих работ возраст не являлся важным прогностическим маркером в обоих исследованиях.

Многообразие молекулярно-генетических маркеров имеющих доказанное прогностическое значение и активно исследуемых в этом отношении, а так же вроятность приобретения дополнительных мутаций на этапе рецидива заболевания, заставляет вести поиск в направлении выявления наиболее универсального прогностического молекулярного маркера. Наиболее активно в настоящее время с этой точки зрения изучается прогностическая значимость оценки динамики экспрессии WT1.

На сегодняшний день развитие молекулярной биологии позволяет выявлять маркеры, отражающие объем персистирующего патологического клона ОМЛ на этапе клинико-гематологической ремиссии, и дает возможность предугадывать вероятность развития рецидивов заболевания. Неоспоримой является значимость таких факторов как уровень

бластоза [34, 35] и степень редукции WT1 на этапе проведения первого индукционного курса ОМЛ de novo для общей и безрецидивной выживаемости [37], дающая возможность своевременно-раннего эффективного начала очередного индукционного курса в случае молекулярно-прогнозируемого недостижения ремиссии. В то же время актуальной остается возможность оценки прогноза выживаемости для заведомо неблагоприятной группы риска пациентов с рецидивами ОМЛ. Исходя из мирового опыта и собственных наблюдений, складывается представление о прогностической значимости динамики экспрессии WT1 и для пациентов с рецидивами ОМЛ, что в свою очередь дает возможность раннего выбора дальнейшей лечебной тактики с учетом предполагаемых сроков общей выживаемости у таких пациентов.

Литература

1. *Löwenberg B., Downing J.R., Burnett A.* Acute myeloid leukemia // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 341. — P. 1051–1062.

2. *Burnett A.K.* Acute myeloid leukemia: Treatment of adults under 60 years // Rev. Clin. Exp. Hematol. — 2002. — Vol. 6. — P. 26–45.

3. *Leopold L.H., Willemze R.* The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: A com-prehensive review of the literature // Leuk Lym-phoma. — 2002. — Vol. 43. — P. 1715–1727.

4. *Lee S., Tallman M.S., Oken M.M., et al:* Duration of second complete remission compared with first complete remission in patients with acute myeloid leukemia // Leukemia. — 2000. — Vol. 14. — P. 1345–1348.

5. *Estey E.H.* Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukemia // Leukemia. — 2000. — Vol. 14. — № 3. — P. 476–479.

6. *Giles F., O'Brien S., Cortes J., et al.* Outcome of patients with acute myelogenous leukemia after second salvage therapy // Cancer. — 2005. — Vol. 104, № 3. — P. 547–554.

7. *Rowe J.M., Tallman M.S.* How I treat acute myeloid leukemia // Blood. — 2010. — Vol. 116. — P. 3147–3156.

8. *Burnett A., Wetzler M., Lowenberg B.* Therapeutic advances in acute myeloid leukemia // J. Clin. Oncol. — 2011. — Vol. 29. — P. 487–494.

9. *Gupta V., Tallman M.S., Weisdorf D.J.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns // Blood. — 2011. — Vol. 117. — P. 2307–2318.

10. *Bishop J.F., Matthews J.P., Young G.A., et al.* A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia // Blood. — 1996. — Vol. 87. — P. 1710–1717.

11. *Capizzi R.L.* Curative chemotherapy for acute myeloid leukemia: the development of high-dose ara-C from the laboratory to bed-side // Invest New Drugs. — 1996. — Vol. 14. — P. 249–256.

12. *Mayer R.J., Davis R.B., Schiffer C.A., et al.* Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331. — P. 896–903.

13. *Dohner H., Estey E.H., Amadori S., et al.* Diagnosis and manage-ment of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leuke-miaNet // Blood. — 2010. — Vol. 115. — P. 453–474.

14. *James K.* Mangan and Selina M. Luger. Salvage therapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia // Ther Adv Hematol. — 2011. — Vol. 2. — № 2. — P. 73–82.

15. *Dimitri A. Breems, Wim L.J. Van Putten, Peter C. Huijgens, Gert J. Ossenkoppele, Gregor E.G. Verhoef, Leo F. Verdonck, Edo Vellenga, Georgine E. De Greef, Emanuel Jacky, Johannes Van der Lelie, Marc A. Boogaerts, and Bob Löwenberg* Prognostic Index for Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse // J. Clin. Oncol. — Vol. 23. — P. 1969–1978.

16. *Gandhi V., Estey E., Keating M.J., et al.* Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy // J. Clin. Oncol. — 1993. — Vol. 11. — P. 116–124.

17. *Estey E., Plunkett W., Gandhi V., et al.* Fludarabine and arabinosylcytosine therapy of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia // Leuk. Lymphoma. — 1993. — Vol. 9, P. 343–350.

18. *Estey E., Thall P., Andreeff M., et al.* Use of granulocyte colony-stimulating factor before, during, and after fludarabine plus cytarabine induction therapy of newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes: comparison with fludarabine plus cytarabine without granulocyte colony-stimulating factor // J. Clin. Oncol. — 1994. — Vol. 12. — P. 671–678.

19. *Vidarsson B., Abonour R., Williams E.C., et al.* Fludarabine and cytarabine as a sequential infusion regimen for treatment of adults with recurrent, refractory or poor prognosis acute leukemia // Leuk. Lymphoma. — 2001. — Vol.41. — P. 321–331.

20. *Mehta D.R., Foon K.A., Redner R.L., et al.* Fludarabine and cytarabine in patients with acute myeloid leukemia refractory to two different courses of front-line chemotherapy // Leuk. Res. — 2011. — Vol. 35. — P. 885–888.

21. *Tafuri A., Andreef M.* Kinetic rationale for cytokine induced recruitment of myeloblastic leukemia followed by cycle-specific myelogenous leukemia during therapy // Leukemia. — 1990. — Vol. 4. — P. 826–834.

22. *Tafuri A., Lemoli R.M., Chen R., Gulati S.C., Clarkson B.C., Andreef M.* Combination of hematopoietic growth factors IL-3 induce acute myeloid leukemia cell sensitization to cycle specific and cycle non-specific drugs // Leukemia. — 1994. — Vol. 8. — P. 749–757.

23. *Boekhorst P.A., Lowenberg B., Sonneveld P.* Hematopoietic growth factor stimulation and cytarabine cytotoxicity in vitro: effects in untreated and relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia cells // Leukemia. — 1994. — Vol. 8. — P. 1480–1486.

24. *Van der Lely N., De Witte T., Wessels J., Raymakers R., Muus P., Preijers F.* In vitro response of blasts to IL-3, GM-CSF, and G-CSF is different for individual AML patients: factors that stimulate leukemic clonogenic cells also enhance Ara-C cytotoxicity // Ann. Hematol. — 1994. — Vol. 68. — P. 225–232.

25. *Graham H. Jackson.* Use of fludarabine in the treatment of acute myeloid leukemia // The Hematology Journal. — 2004. — Vol. 5, № 1. — P. 62–67.

26. *Owen C., Fitzgibbon J., Paschka P.* The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia // Hematol. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 1. — P. 13–19.

27. *Hans Beier Ommen.* Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals // British Journal of Haematology. — Vol. 141. — P. 782–791.

28. *Daniela Cilloni, Aline Renneville, Fabienne Hermitte et al.* Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27. — P. 5195–5201.

29. *Elihu H. Estey* Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management // Am. J. Hematol. — 2012. — Vol. 87. — P. 90–99.

30. *Domenico Russo, Michele Malagola, Antonio de Vivo et al.* Multicentre phase III trial on fludarabine, cytarabine (Ara-C), and idarubicin versus idarubicin, Ara-C and etoposide for induction treatment of younger, newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients // British Journal of Haematology. — Vol. 131. — P. 172–179.

31. *Saiko Kurosawa et al*. Prognostic factors and outcomes of adult patients with acute myeloid leukemia after first relapse // Haematologica. — 2010. — Vol. 95, № 11.

32. *Weinberg O.K., Seetharam M., Ren L., Seo K. et al.*Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system // Blood. — 2009. — Vol. 113, № 9.

33. *Lacombe F., Arnoulet C., Maynadie M., et al.* Early clearance of peripheral blasts measured by flow cytometry during the first week of AML induction therapy as a new independent prognostic factor: a GOELAMS study // Leukemia. — 2009. — Vol. 23. — P. 350 –357.

34. *Elliott M.A., Litzow M.R., Letendre L.L., et al.* Early peripheral blood blast clearance during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia predicts superior relapse-free survival // Blood. — 2007. — Vol. 110. — P. 4172 –4174.

35. *Gianfaldoni G., Mannelli F., Bencini S. et al.* Peripheral blood blast clearance during induction therapy in acute myeloid leukemia// Blood. — 2008. — Vol. 111, № 3.

36. *Rowe J.M., Kim H.T., Cassileth P.A., et al.* Adult patients with acute myeloid leukemia who achieve complete remission after 1 or 2 cycles of induction have a similar prognosis: a report on 1980 patients registered to 6 studies conducted by the Eastern Cooperative Oncology Group // Cancer. — 2010. — Vol. 116. — P. 5012–5021.

37. *Gianfaldoni G., Mannelli F., Ponziani V. et al.* Early reduction of WT1 transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease-free and overall survival in acute myeloid leukemia. — 2010.

38. *P. Chevallier, M. Labopin, P. Turlure et al.* A new Leukemia Prognostic Scoring System for refractory/relapsed adult acute myelogeneous leukaemia patients: a GOELAMS study // Leukemia. — 2011. — Vol. 25. — P. 939–944.

РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ РЕЖИМОВ FC/FCR В ПЕРВОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

В.В. Стругов[1], Е.А. Стадник[1, 2], Ю.В. Вирц[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГОБУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

Стругов Владимир Владимирович — младший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ ««Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Стадник Елена Александровна* — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, врач-гематолог ГОБУ ВПО Санкт-Петербургского Государственного Медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова; *Вирц Юлия Викторовна* — аспирант ФГБУ ««Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: (812) 702–37–65. E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Стадник Елена Александровна).

Резюме

Актуальность. ХЛЛ является наиболее распространенным вариантом лейкоза в Европе и США. Это патология людей старшей возрастной группы. В литературе недостаточно данных об эффективности и безопасности современных химиотерапевтических режимов у пожилых пациентов. **Методы.** Проведено ретроспективное исследование, в которое включено 90 больных с ХЛЛ, получавших терапию по протоколам FC/FCR в первой линии. **Результаты**. Частота полных ремиссий у пациентов, получивших FCR, была в 1,5 раза выше (72,5 % и 46,5 %, p = 0,034). Это привело к лучшей беспрогрессивной (медиана 43 vs 19 мес, p = 0,001) и общей выживаемости (медиана не достигнута vs 45 мес, p = 0,009). У пациентов ≥ 65 лет отмечался более высокий индекс коморбидности по CIRS (медиана 7 баллов vs 4, p < 0,001). Общая выживаемость пожилых больных в подгруппе FCR хуже (медиана 52 мес vs не достигнута, p = 0,022). Связь между индексом CIRS и выживаемостью не показана. Наличие внутрибрюшной лимфоаденопатии (ВБЛУ) коррелирует с меньшей беспрогрессивной и общей выживаемостью (p < 0,001). **Выводы.** Не все пожилые пациенты с ХЛЛ хорошо переносят FCR. Шкала CIRS не является стандартом для оценки тяжести сопутствующей патологии у пожилых пациентов и критерием их исключения из группы, которой может быть проведено интенсивное лечение, увеличивающее продолжительность жизни. Внутрибрюшная лимфоаденопатия имеет важное прогностическое значение.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, ХЛЛ, FC, FCR, CIRS, пожилые.

RETROSPECTIVE EVALUATION OF FIRST LINE CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA TREATMENT WITH FC/FCR REGIMENS

V.V. Strugov[1], E.A. Stadnik[1, 2], Yu.V. Virts[1], A.Yu. Zaritskey[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341, Phone: (812) 702–37–65, E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Elena A. Stadnik — PhD, senior researcher of hematology institute).

Abstract

CLL is the most prevalent type of leukemia in the Occident. It typically affects old people. Data on efficacy and safety of the modern chemotherapy regimens in elderly CLL patients is poorly presented in medical literature. We retrospectively analyzed results of therapy with FC/FCR regimens in 90 unselected primary CLL patients. FCR regimen yielded higher rates of CR (72,5 % vs 46,5 %, p = 0,034). This translated in higher EFS (median 43 vs 19 mos, p = 0,001) and OS (median n.r. vs 45 mos, p = 0,009). Patients older (≥) than 65 лет had higher comorbidity index according to CIRS (median 7 vs 4, p < 0,001). Unselected elderly patients had reduced OS when treated with FCR (median 52 mos vs n.r., p = 0,022). Correlation between CIRS and OS, at the same moment, was not shown. Enlargement of abdominal lymph nodes (EALN) correlated with EFS and OS independently of other factors (p < 0,001). As a conclusion, elderly patients do not tolerate FCR well. CIRS should not be considered a standard for assessment of individual eligibility for FCR. EALN is a new potential prognostic factor.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, CLL, FC, FCR, CIRS, elderly

Статья поступила в редакцию 10.10.2012, принята к печати 20.10.2012.

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является наиболее распространенным видом лейкоза у взрослых (3–5 случаев на 100 000 населения в год). Прогноз Американской онкологической ассоциации на 2012 год составляет 16000 новых случаев и 4500 смертей, ассоциированных с этим заболеванием [1]. Хотя ХЛЛ считается индолентным заболеванием с относительно благоприятным прогнозом, он может быть непредсказуем в своем клиническом течении, что проявляется случаями быстрой прогрессии и формированием химиорезистентности. Несмотря на успехи, достигнутые в последние годы в терапии ХЛЛ в результате появления иммунохимиотерапевтических режимов, впервые повлиявших на естественное течение заболевания, у этих пациентов отмечается более низкая средняя продолжительность жизни по сравнению с общепопуляционной и они умирают либо от хронического лимфолейкоза, либо от его осложнений [2].

Одной из важных биологических особенностей ХЛЛ является то, что это опухолевое заболевание системы крови, встречающееся в старшей возрастной группе. В соответствии с данными крупнейших регистров, средний возраст на момент постановки диагноза составляет 72 года, а количество больных старше 65 лет составляет 50–75 % от всех случаев ХЛЛ [3]. Частота встречаемости ХЛЛ линейно возрастает после 40 лет. В настоящее время еще окончательно не известны патогенетические механизмы, объясняющие корреляцию заболеваемости ХЛЛ с возрастом. Возможно, играют роль такие факторы как «старение» клеток, которые входят в состав микроокружения, состояние иммунитета в целом и постепенное накопление мутаций в гемопоэтических стволовых клетках [4–7].

С клинической точки зрения, более пожилой возраст, как правило, ассоциируется со снижением функциональной активности организма в целом, серьезными сопутствующими заболеваниями, которые приводят к неспособности перенести токсичные химиотерапевтические режимы [8]. Это влияет на выбор терапевтической тактики, что сказывается на прогнозе, который в данной группе больных должен оцениваться индивидуально. Этому вопросу практически не уделяется внимания при проведении крупных клинических исследований. По данным публикаций, средний возраст пациентов, получивших тот или иной режим терапии составляет, как правило, от 55 до 65 лет [9–10]. Таким образом, результаты этих исследований не могут быть применимы ко всем пожилым пациентам [11].

При подведении итогов своего исследования, мы ретроспективно оценили эффективность терапии первой линии флударабин-содержащими схемами пациентов с ХЛЛ в одном из онкогематологических центров в России. Поскольку при включении в исследование не проводилось жесткой селекции пациентов, мы хотим обратить особое внимание на роль возраста и тяжести сопутствующей патологии при оценке результатов проведенного лечения.

Материалы и методы

1. Характеристика пациентов

Целью данного исследования было ретроспективно проанализировать результаты лечения всех пациентов с ХЛЛ, получавших режимы FC/FCR в нашем отделении в период между 2002 и 2011 гг. Проанализированы данные о 88 пациентах, из которых 41 получили режим FC и 47 — режим FCR в первой линии терапии. Мы также смогли включить

в анализ двух пациентов, получивших режим FC до 2002 года. Пациенты были преимущественно из Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Подробная характеристика всех 90 больных по подгруппам представлена в таблице 1.

2. Стандартные процедуры

У всех пациентов диагноз ХЛЛ был установлен на основании абсолютного лимфоцитоза в периферической крови и подтвержден результатами проточной цитометрии/иммуногистохимии (выявление коэкспрессии CD5, CD23 и CD19 на опухолевых клетках). Пациентам начиналось лечение согласно рекомендациям NCI WG 1996 года [12]. Данный вид терапии (FC / FCR) не назначался только пациентам с острыми инфекционными заболеваниями, тяжелыми нарушениями функции сердца, печени или почек, психическими расстройствами или активной аутоиммунной гемолитической анемией. Ритуксимаб не вводился в случае обнаружения активной HBV инфекции. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на проведение химиотерапии, в которое были включены согласие на анализ личных и медицинских данных с возможностью публикации в медицинской литературе.

Стадирование заболевания выполнялось в соответствии с классификациями J.Binet и K.Rai [13, 14]. В дополнение к общему физикальному обследованию всем пациентам было выполнено КТ или УЗИ брюшной полости с целью выявления внутрибрюшной лимфаденопатии до начала терапии. Уровень экспрессии CD38 на опухолевых клетках определялся с помощью проточной цитометрии с пороговым уровнем 30 % [15]. Наличие соматической гипермутации в генах IGHV определялось при помо-

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

	всего	**FC**	**FCR**	**p (FC vs. FCR)**
N	90	43	47	–
Возраст (медиана, диапазон)	59 (43–78)	58 (44–78)	59 (43–73)	*.564*
Возраст ≥ 65	30	16	14	–
Возраст ≥ 70	9	5	4	–
Количество пациентов	59 (66 %)	31 (72 %)	28 (60 %)	*.212*
CIRS (медиана, диапазон)	4 (0–10)	4 (0–10)	4 (0–8)	–
CIRS ≤ 6	69	34	35	*.606*
CIRS > 6	21	9	12	
Стадия (Rai)				
1	7	1	6	***.001***
2	54	21	33	
3	6	5	1	
4	23	16	7	
Стадия (Binet)				
A	7	2	5	***.002***
B	54	20	34	
C	29	21	8	
АЧЛ на начало терапии (медиана, диапазон)	61,2 (6,4–300)	88,4 (13–300)	40 (6,4–300)	***.002***
Абдоминальные лимфоаденопатия				
+	45	28	17	***.006***
–	45	15	30	
Экспрессия CD38				
≥ 30 %	32	17	15	***.05***
< 30 %	34	10	24	
неизвестно	24	16	8	–
Мутационный статус IGVH				
немутированный	28	16	12	*.4*
мутированный	18	8	10	
неизвестно	44	19	25	–
TTT (месяцы, диапазон)	18,5 (0–137)	29 (1–82)	15 (0–137)	*.763*

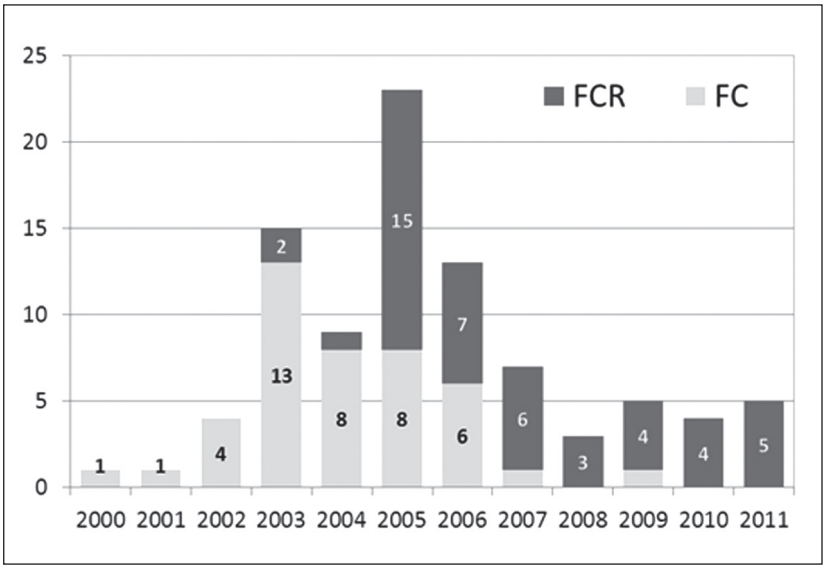


Рисунок 1. Распределение пациентов в зависимости от режима в первой линии терапии. Показано количество пациентов, которые начали получать лечение в режиме FC (серый) и FCR (синий) в соответствующие годы.

щи исследования кДНК, выделенной из опухолевых клеток и амплифицированной с помощью специфических праймеров [16, 17]. Клональный продукт выделялся с помощью электрофореза в агарозном геле; амплифицированная ДНК секвенировалась с помощью системы Applied Biosystems 373A. Окончательная оценка мутационного статуса проводилась при помощи баз данных IgBLAST и IMGT [18, 19]. Различия в последовательности нуклеотидов более чем на 2 % по сравнению с герминативной линией исследуемого гена IGHV расценивалось как наличие соматической гипермутации. К сожалению, цитогенетические исследования при ХЛЛ до 2008 года выполнялись крайне редко, и, следовательно, важная информация о наличии таких хромосомных аберраций в опухолевых клетках, как del17p и del11q, у наших пациентов неизвестна. Хотя в нашем отделении тяжесть сопутствующей патологии у пациентов с ХЛЛ никогда не оценивалась согласно шкале CIRS [20], впоследствии мы смогли оценить этот показатель ретроспективно на основании имеющейся медицинской документации.

3. Лечение

Выбор режима лечения коррелировал с историей развития терапии ХЛЛ (рис. 1). Мы использовали флударабин-содержащие схемы (в частности, режим FC) в качестве стандартной терапии первой линии у пациентов с ХЛЛ с 2002 года. С появлением в 2005 году государственной программы по обеспечению ритуксимабом пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями и одновременным появлением данных MDACC [21] в широкой клинической практике стал использоваться режим FCR.

В оба режима химиотерапии включены циклофосфамид 200 мг/м^2 х 3 дня (D1-3) и флударабин 25 мг/м^2 х 3 дня (D1-3). В D0 или D1 режима FCR вводился ритуксимаб в дозе 375 мг/м^2 в первом цикле и 500 мг/м^2 во всех последующих циклах. В целом, только доза циклофосфамида отличалась от используемой в оригинальном протоколе MDACC (250 мг/м^2) [21, 22]. Всего проводилось шесть курсов терапии каждые 28 дней. Побочные эффекты связанные с лечением регистрировались в соответствии с критериями NCI CTCAE. В случае выраженной токсичности терапия прекращалась. Дозы препаратов не редуцировались, в случае длительных нейтропений или инфекционных осложнений увеличивались межкурсовые промежутки, максимум до 14 дней. Препараты из сопроводительной терапии включали в себя ацикловир 400 мг 2 раза/день и триметоприм / сульфаметоксазол 480 мг 2 раза/день три раза в неделю для профилактики герпес-вирусной и пневмоцистной инфекций. Ципрофлоксацин 500 мг 2 раза/день назначался в случае длительной нейтропении 4 степени. В редких случаях использовались рекомбинантные G-CSF и эритропоэтин. Трансфузии эритроцитарной взвеси и тромбоконцентрата проводились, как правило, для поддержания уровня гемоглобина выше 70 г/л и тромбоцитов выше 20 × 10*^{9} /л. Пациенты наблюдаются в одном центре несколькими врачами и до настоящего времени ни один из них не выбыл из исследования.

4. Оценка результатов терапии

До 2008 года ответ на лечение оценивался в соответствии с критериями NCI WG [12]. В даль-

нейшем, для сопоставления полученных результатов с международными данными, была выполнена ретроспективная переоценка этого показателя в соответствии с критериями IWCLL 2008 [23]. Согласно этим критериям под понятием полной ремиссии заболевания подразумевалось отсутствие конституционных симптомов, периферической лимфоаденопатии, гепатоспленомегалии, нормализация показателей клинического анализа крови (Hb> 100 г/л, Тр> 100 × 10^9 /л, АЧН > 1,5 × 10^9 /л). Ответ оценивался не менее через два месяца после завершения последнего цикла терапии. К сожалению, при оценке ответа не выполнялось гистологическое исследование костного мозга (методом трепанобиопсии), поэтому в нашей когорте пациентов отсутствует такое понятие, как «нодулярная» частичная ремиссия. Перед началом четвертого курса терапии выполнялась промежуточная оценка ответа. После появления признаков рецидива и прогрессии заболевания практически все пациенты продолжали получать дальнейшее лечение в условиях нашего отделения. Благодаря этому нам доступна информация о продолжительности ответа, а также общей выживаемости за длительный период наблюдения (более 9 лет).

5. Статистический анализ

Время до начала терапии (ТТТ) рассчитывалось как время от момента первоначальной постановки диагноза до начала лечения.

Бессобытийная выживаемость (БСВ) — это время от начала лечения до наступления одного из неблагоприятных событий: смерть от любой причины, рецидив или прогрессия заболевания, смена варианта терапии. Общая выживаемость (ОВ) — время от начала лечения до смерти от любой причины. Различия в БСВ и ОВ оценивали с помощью Log-rank теста, кривые выживаемости строили по методу Каплан-Мейера. Оценку влияния на БПВ различных исходных параметров оценивали с помощью регрессионного анализа по Кокс. Частоту достигаемых ремиссий и частоту токсических осложнений сравнивали с помощью критерия χ^2. Пороговый уровень статистической значимости был определен как P <.05. Статистический анализ был выполнен с применением статистического пакета для социальных наук (SPSS) версия 17.0.

Результаты

1. Характеристики пациентов

Средний возраст для всей группы пациентов составил 59 лет (43–78 лет). Соотношение мужчин и женщин составило 2:1, что соответствует данным международных регистров. У большей части пациентов отмечалась продвинутая стадия (Rai II–IV, Binet B или C) и высокий лейкоцитоз периферической крови (в среднем 61,2 × 10^9 /л). У половины пациентов не имелось признаков внутрибрюшной лимфоаденопатии как по данным КТ, так и УЗИ органов брюшной полости. Среднее значение индекса коморбидности по шкале CIRS составило 4. У 70 пациентов из 90 индекс коморбидности был выше 3, а у 21 из 90 (23 %) пациентов — выше 6, что являлось критерием исключения при наборе больных ХЛЛ в исследование CLL8 [22]. Медиана ТТТ во всей группе была относительно короткой (1,5 года), что, как правило, характерно для пациентов с агрессивным течением заболевания, у которых достаточно рано появляются показания к началу терапии. Необходимо отметить, что у некоторых пациентов имелись показания к началу терапии уже на момент постановки диагноза.

Всего 43 пациента получили режим FC и 47 — FCR (табл. 1). Менее 6 циклов терапии получили только 22 пациента (от 4-х до 5) — по 11 в каждой группе. Группы были сбалансированы по основным характеристикам: возрасту, полу, времени до начала терапии и количеству сопутствующих заболеваний (индексу коморбидности). В подгруппе FC было несколько больше пациентов с продвинутыми стадиями заболевания а также высоким лимфоцитозом на момент начала терапии (p = .002). Внутрибрюшная лимфоаденопатия реже встречалась в подгруппе FCR (p = .006). Однако, в подгруппе FCR отмечалось большее количество пациентов с высокой экспрессией CD38 (p = .05). Другие неблагоприятные прогностические факторы встречались с одинаковой частотой в обеих подгруппах.

2. Ответ на лечение и выживаемость

Общий уровень ответа в подгруппах FC и FCR составил — 81,5 % и 93,5 %, соответственно (p = 0,109). Тем не менее, 72,5 % пациентов достигли CR в подгруппе FCR, а в подгруппе FC только 46,5 % (p = 0,034) (табл. 2).

Медиана БСВ была значительно выше в подгруппе FCR в сравнении с подгруппой FC (43 месяца против 19, p = 0,001) (рис. 2). Медиана общей выживаемости в подгруппе FCR к июлю 2011 года еще не была достигнута — 70 % пациентов были живы. В то же время лишь только 23 % пациентов были живы в подгруппе FC (рис. 3). Медиана общей выживаемости в последнем случае не достигла 4 лет. Разница в общей выживаемости оказалась статистически значимой (p = 0,009). У пациентов, получавших режим FC произошло большее количество неблагоприятных событий, в том числе, смертей (p < 0,001). Показатели беспрогрессивной

Таблица 2

ОТВЕТ НА ЛЕЧЕНИЕ

	всего	**FC**	**FCR**	**p (FC vs. FCR)**
Количество пациентов	90	43	47	–
Количество циклов	499	236	263	–
Количество курсов (медиана, диапазон)	6 (2–8)	6 (4–6)	6 (2–8)	–
OR (пациентов/ %)	79 / 88 %	35 / 81,5 %	44 / 93,5 %	.109
PR (пациентов/ %)	25 / 28 %	15 / 35 %	10 / 21 %	**.034**
CR (пациентов / %)	54 / 60 %	20 / 46,5 %	34 / 72,5 %	
SD, прогрессия (пациентов / %)	11 / 12 %	8 / 18,5 %	3 / 6,5 %	
Количество событий	65	40	25	**< .001**
Количество смертей	47	33	14	**< .001**
Медиана EFS, месяцы	28	19	43	**.001**
Медиана OS, месяцы	59	45	n.r.	**.009**

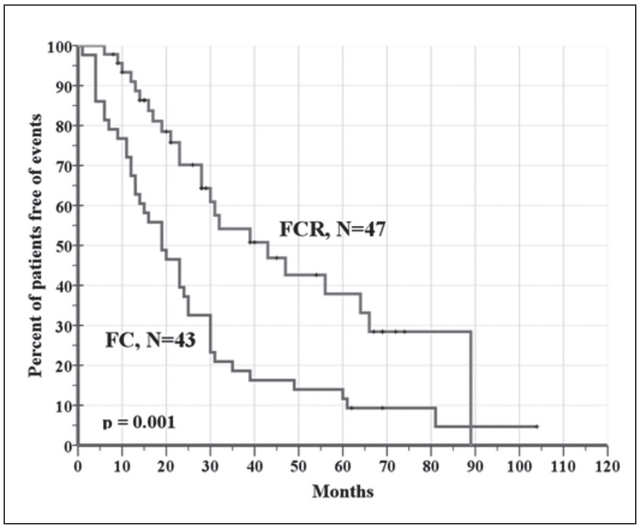


Рисунок 2. Бессобытийная выживаемость в подгруппах FC/FCR

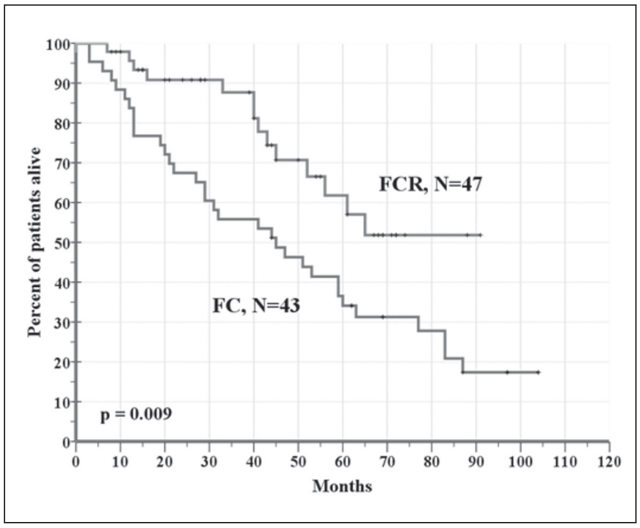


Рисунок 3. Общая выживаемость в подгруппах FC/FCR

и общей выживаемости у пациентов, получивших менее шести циклов терапии, не были хуже по сравнению с остальными.

Интересно, что у одного из пациентов к настоящему времени сохраняется полная ремиссия, которая длится уже 10 лет, после шести циклов режима FC. Пациент в течение последних 5 лет ежегодно мониторируется, у него отмечается стабильный уровень MRD около 1 % в костном мозге по данным 4-цветной проточной цитометрии.

3. Роль стадии заболевания

Существовала корреляция между стадией по Rai и Binet и выживаемостью всей группы пациентов (табл. 3 и табл. 4).

4. Роль возраста и оценка CIRS

Пациенты были разделены на две возрастные категории — моложе и старше 65 лет. Они не отличались по количеству проведенных курсов терапии (среднее число циклов терапии — 6). Медиана БСВ составила 30 месяцев для пациентов < 65 лет и 28 месяцев для пациентов ≥ 65 лет (p = 0,502). При оценке общей выживаемости также не получено достоверных различий (медиана 60 месяцев и 52 месяца, соответственно) (p = 0,226). Также не было различий в бессобытийной и общей выживаемости в зависимости от возраста в подгруппе FC. Однако в подгруппе FCR у пожилых пациентов общая выживаемость была несколько меньше — медиана не достигнута для более молодых пациентов, а для пожилых пациентов она составила 52 месяца (p = 0,022) (рис. 4). Однако, при оценке бессобытийной выживаемости в этой подгруппе пациентов достоверных различий не выявлено (медиана 34 месяца против 28 месяцев соответственно, p = 0,127).

Таблица 3

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ПО BINET

	Binet A	Binet B	Binet C	p
Медиана EFS, месяцы				
— всего пациентов	89	30	20	.001
— FC	30	19	19	.28
— FCR	89	32	28	.007
Медиана OS, месяцы				
— всего пациентов	n.r.	77	32	.001
— FC	53	63	29	.073
— FCR				.094

Таблица 4

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ПО RAI

	Rai I	Rai II	Rai III	Rai IV	p
Медиана EFS, месяцы					
— all patients	89	30	20	13	**.001**
— FC	30	19	20	11	.4
— FCR	89	32	43	28	**.014**
МедианаOS, месяцы					
— всего пациентов	*n.r.*	77	32	31	**.002**
— FC	53	77	32	27	.158
— FCR					.027

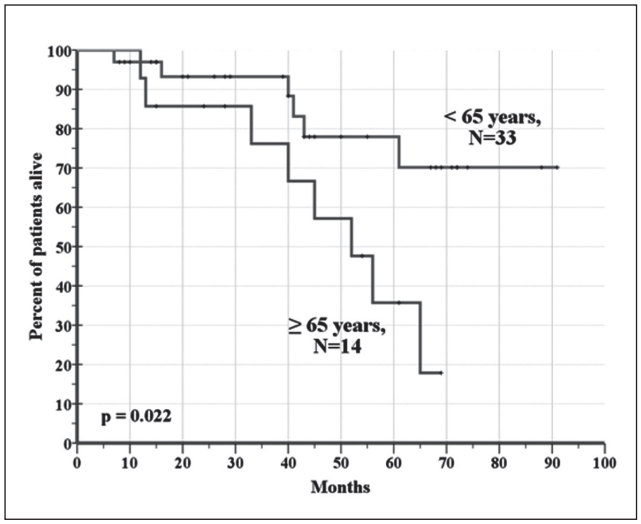


Рисунок 4. Общая выживаемость в зависимости от возраста в подгруппе FCR

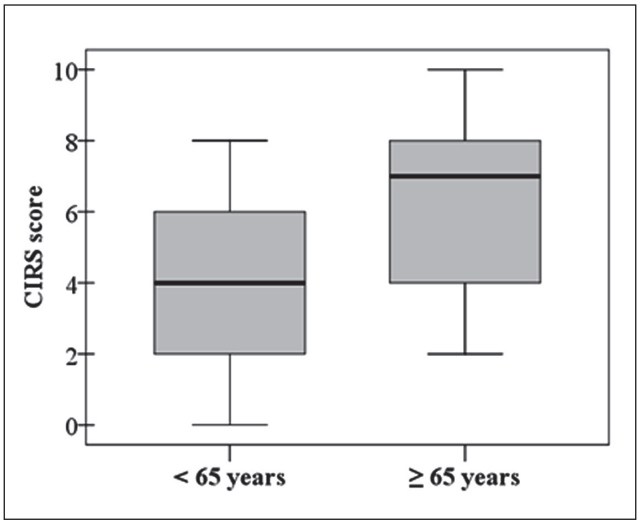


Рисунок 5. Медиана CIRS в зависимости от возрастной группы

При оценке тяжести сопутствующей патологии оказалось, что у пожилых пациентов отмечается более высокий индекс коморбидности, оцениваемый по шкале CIRS (p <0,001, рис. 5). Однако индекс коморбидности никак не коррелировал ни с бессобытийной, ни с общей выживаемостью (оценивались пороговые уровни в 3 и 6 баллов по шкале CIRS). Выживаемость не зависела от количества баллов по шкале CIRS как у пациентов, получивших режим FC, так и у пациентов, получивших FCR. Среднее количество циклов терапии в подгруппах не отличалось. Интересно, что при оценке эффективности терапии у пациентов с высоким индексом коморбидности (CIRS > 6, n = 39), бессобытийная выживаемость была достоверно выше в группе FCR по сравнению с FC (медиана 47 против 25 месяцев, соответственно (p = 0,012), что однако не отразилось на общей выживаемости. (p = 0,113).

5. Роль внутрибрюшной лимфоаденопатии и скорости ответа на терапию.

Как уже отмечалось ранее, у 45 пациентов отмечалось увеличение внутрибрюшных лимфатических узлов (внутрибрюшная лимфоаденопатия — ВБЛУ). Наличие ВБЛУ коррелировало с продвинутыми стадиями заболевания по Rai (г = 0,29, p = 0,006) и Binet (г = 0,305, p = 0,003), отсутствием соматической гипермутации VH — генов (г = 0,460, p = 0,001) и высоким уровнем CD38 (R = 0,302, p = 0,014). Несколько больше пациентов с ВБЛУ было в группе, получавшей терапию в режиме FCR (p = 0,006).

Наличие ВБЛУ было связано с плохим ответом на терапию и худшей выживаемостью. Так, у всех 11 пациентов, не ответивших на терапию присутствовала внутрибрюшная лимфоаденопатия. Напротив, отсутствие ВБЛУ было связано с более высокой частотой достижения полных ремиссий как в подгруппе FC (p = 0,043), так и в подгруппе FCR (p = 0,006). У пациентов с ВБЛУ была отмечена более низкая общая (медиана 33 месяцев по сравнению с не достигнутой, p < 0,001) и бессобытийная выживаемость (медиана 15 месяцев против 60, p < 0,001) по сравнению с пациентами без ВБЛУ. Внутрибрюшная лимфоаденопатия негативно сказывалась на показателях эффективности терапии как в подгруппе FC, так и FCR. В частности, в подгруппе FCR у пациентов с увеличенными внутрибрюшными лимфатическими узлами медиана БСВ составила 19 месяцев против 64 по сравнению с пациентами без ВБЛУ (p < 0,001). В подгруппе FC медианы были 12 и 25 месяцев соответственно (p < 0,001). Медиана ОВ в подгруппе FC составила 29 и 83 месяца (p < 0,001), в подгруппе FCR — 43 месяца против недостигнутой (p < 0,001).

Также важное прогностическое значение при оценке БСВ и ОВ имела скорость ответа на проводимую терапию. Из 89 пациентов, которые получили более 4 циклов лечения, 16 достигли полной и 38 частичной ремиссии уже после трех циклов терапии. Эти пациенты были объединены в группу «раннего ответа» (РО). В подгруппе РО оказалось больше женщин (p = 0,018), меньше пациентов с продвинутыми стадиями заболевания по Binet (p = 0,02), меньшее число случаев IGHV-немутированного варианта ХЛЛ (p = 0,01) и большее количество пациентов, получавших терапию в режиме FCR (p = 0,008). Также у этих пациентов было достоверно большее время до начала терапии (TTT, p = 0,003). 20 из 43 (46,5 %) пациентов попали в группу РО в подгруппе FC и 34 из 46 (74 %) — в подгруппе FCR (p = 0,008). Пациенты с ВБЛУ реже отмечался ранний ответ (p < 0,001).

БСВ была выше в группе пациентов с РО — медиана 39 месяцев против 16 (p <.001). У пациентов с РО также отмечалась более длительная ОВ — медиана 83 месяца против 43, соответственно (p <.001). У пациентов, достигших полной ремиссии после трех курсов терапии отмечалась беспрецедентно высокая БСВ — медиана 60 месяцев. Любопытно, что не отмечалось существенных различий при оценке общей выживаемости у пациентов достигших частичной и полной ремиссии после трех курсов (медиана 83 месяца и 77, соответственно, p = 0,175).

Девять пациентов вне группы РО достигли CR при окончательной оценки ответа (медиана ОВ 45 месяцев) и еще 15 достигли PR (медиана ОВ 51 месяц). У 29 пациентов PR в момент промежуточной оценки достиг CR при окончательной оценке (медиана ОВ 63 месяцев). Девять пациентов сохраняли PR в промежуточных и окончательных оценках ответа (медиана OS 87 месяцев). Все эти различия в выживаемости были статистически незначимы в соответствии с логарифмическим ранговым критерием (p = 0,182).

6. Регрессионный анализ по Кокс

В нашей работе он использовался для уточнения прогностической значимости ВБЛУ по сравнению с другими переменными. В модель были включены такие показатели, как возраст, пол, стадия заболевания по Rai и Binet, уровень экспрессии CD38 и схема терапии. Данные о мутационном статусе VH — генов были доступны только для половины пациентов, поэтому мы их не использовали при поведении данного анализа. Было показано, что внутрибрюшная лимфоаденопатия достоверно влияет на показатели БСВ и ОВ. При построении данной модели другие факторы прогноза значения не имели (доп. таблицы 1–2).

При аналогичной оценке значения раннего ответа ((РО) помимо него в модель включены уровень экспрессии CD38, стадия заболевания, режим терапии и наличие ВБЛУ) не получено достоверных различий ее влияния на показатели беспрогрессивной и общей выживаемости по сравнению с другими факторами прогноза (доп. таблица 3–4).

7. Токсичность

Некоторые результаты по оценке токсичности, которая была получена при проведении данного исследования, были опубликованы в 2008 году [24]. Но это были данные с включением пациентов (n = 102) из пяти клиник. К сожалению, мы не смогли обновить результаты только для своей группы больных. Но, в целом, частота нейтропений совпадала с данными международных исследований. Нейтропении III–IV степени в два раза чаще

Дополнительная таблица 1

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПО КОКС В ОТНОШЕНИИ БСВ

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0 % CI for Exp(B)	
							Lower	Lower
Возраст	,002	,021	,006	1	,937	1,002	,961	1,045
Пол	-,433	,364	1,411	1	,235	,649	,318	1,325
Стадия по Rai	-,573	,511	1,258	1	,262	,564	,207	1,535
Стадия по Binet	,625	,876	,508	1	,476	1,868	,335	10,398
CD38	-,043	,335	,017	1	,897	,958	,497	1,846
Режим	-,342	,324	1,113	1	,291	,710	,376	1,341
ВБЛУ	-1,486	,379	15,354	1	,000	,226	,108	,476

Дополнительная таблица 2

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПО КОКС В ОТНОШЕНИИ ОВ

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0 % CI for Exp(B)	
							Lower	Lower
Возраст	,026	,025	1,068	1	,301	1,026	,977	1,078
Пол	-,031	,448	,005	1	,944	,969	,403	2,330
Стадия по Rai	-,897	,747	1,445	1	,229	,408	,094	1,761
Стадия по Binet	,935	1,337	,489	1	,484	2,548	,185	34,997
CD38	-,293	,411	,508	1	,476	,746	,334	1,670
Режим	-,086	,391	,049	1	,825	,917	,426	1,973
ВБЛУ	-2,009	,453	19,642	1	,000	,134	,055	,326

Дополнительная таблица 3

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ КОКС В ОТНОШЕНИИ БПВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ РО

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0 % CI for Exp(B)	
							Lower	Lower
Возраст	,006	,022	,083	1	,773	1,006	,963	1,052
Пол	-,253	,367	,476	1	,490	,777	,378	1,593
Стадия по Rai	-,711	,522	1,856	1	,173	,491	,177	1,366
Стадия по Binet	,739	,907	,665	1	,415	2,095	,354	12,389
CD38	-,151	,337	,200	1	,655	,860	,445	1,664
Режим	-,539	,340	2,509	1	,113	,584	,300	1,136
ВБЛУ	-1,152	,461	6,255	1	,012	,316	,128	,779
РО	-,657	,428	2,357	1	,125	,518	,224	1,199

Дополнительная таблица 4

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ КОКС В ОТНОШЕНИИ ОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ РО

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0 % CI for Exp(B)	
							Lower	Lower
Возраст	,028	,026	1,185	1	,276	1,028	,978	1,081
Пол	,028	,459	,004	1	,952	1,028	,418	2,528
Стадия по Rai	-,893	,748	1,426	1	,232	,409	,095	1,773
Стадия по Binet	,956	1,347	,504	1	,478	2,602	,186	36,458
CD38	-,290	,411	,496	1	,481	,749	,334	1,675
Режим	-,155	,413	,141	1	,707	,856	,382	1,922
ВБЛУ	-1,877	,512	13,416	1	,000	,153	,056	,418
РО	-,245	,462	,282	1	,596	,783	,316	1,936

встречались у пожилых пациентов и у пациентов со снижением скорости клубочковой фильтрации менее 70 мл/мин.

За время исследования было зарегистрировано 47 смертей. Основными причинами летальных исходов явились инфекционные осложнения (N = 30), прогрессия заболевания (n = 9), вторичные опухоли (N = 6, преимущественно в подгруппе FC) и трансформация в синдром Рихтера (N = 2). Пять пациентов погибло в связи с реактивацией HBV — инфекции. Реактивация не была непосредственно связана с введением ритуксимаба и тяжелое течение гепатита явилось следствием дефицита эффективных противовирусных препаратов.

Обсуждение

В своем исследовании мы ретроспективно проанализировали результаты лечения первичных больных ХЛЛ режимами FC и FCR. Пациенты получали лечение в одной клинике у нескольких врачей, которые постоянно их наблюдали. Мы попытались уделить особое внимание возрасту и тяжести сопутствующей патологии. Хотя медиана возраста пациентов нашей группы относительно невелика (59 лет), следует отметить, что на фоне снижения продолжительности жизни и снижения общей физической формы пожилого населения в России [25], можно расценивать наших больных, как типичных пациентов с ХЛЛ, несмотря на то, что по данным регистров Европы и США возраст больных ХЛЛ несколько больше..

Исследование подтверждает превосходство режима FCR над FC не только по количеству общего ответа и полных ремиссий, но и по продолжительности бессобытийной и общей выживаемости. С учетом того, что в большинстве случаев пациенты погибали либо от хронического лимфолейкоза, либо от осложнений его лечения, мы пришли к важному выводу, что пациенты пожилого возраста не всегда хорошо переносят более интенсивную терапию. Это согласуется с результатами других работ [26] и указывает на важность тщательного отбора пациентов. В то же время шкала оценка тяжести сопутствующей патологии по индексу коморбидности, рассчитываемому согласно шкале CIRS не смогла нам помочь прогнозировать ни беспрогрессивную, ни общую выживаемость. Это свидетельствует о том, что шкала CIRS не должна использоваться в качестве единственного критерия отбора пациентов для проведения современного интенсивного иммунохимиотерапевтического лечения, которое могло бы им продлить жизнь. Действительно, в исследовании CLL8 шкала CIRS была использована в сочетании с статусом ECOG и клиренсом креатинина, и только статус ECOG был связан с ОВ [22]. Мы считаем, что противопоказаниями к проведению режима FCR являются лишь острые бактериальные, грибковые и вирусные инфекции, тяжелая недостаточность жизненно важных органов, тяжелые психические расстройства, клиренс креатинина менее 30 мл/мин., текущий гемолиз или аутоиммунная гемолитическая анемия в анамнезе.

Недавно была дискуссия по поводу необходимости регулярного проведения компьютерной томографии при ХЛЛ. Дело в том, что в отличии от В — клеточных неходжкинских лимфом, ХЛЛ является заболеванием с «системным распространением» опухолевых лимфоцитов и, таким образом, динамика заболевания может контролироваться посредством физикального осмотра периферических лимфатических узлов [27, 28]. Согласно этому представлению, выполнение КТ необходимо лишь в редких клинических ситуациях, например, при трансформации в синдром Рихтера, проведении дифференциального диагноза между SLL и MBL. Согласно рекомендациям IWCLL, выполнение КТ является обязательной процедурой лишь только в рамках клинических испытаний [23]. С другой стороны, существуют некоторые публикации, которые указывают на прогностическое значение результатов КТ. Например, по данным одной из исследовательских групп, у пациентов со стадией 0 по Rai отмечались достоверно худшие показатели БСВ, если у них выявлялась внутрибрюшная и внутригрудная лимфоаденопатия при выполнении КТ [29], в другой указывается на то, что распространенность опухолевого процесса, оцениваемого с помощью метода компьютерной томографии, коррелирует со временем до начала терапии [30]. Последний консенсус экспертов Великобритании поддерживает рутинное применение КТ до и после терапии у больных ХЛЛ, в случае, если они лечатся интенсивными режимами [31]

В нашем исследовании выявлено, что увеличение внутрибрюшных л/у, выявленное по данным КТ и/или ультразвукового исследования органов брюшной полости, достоверно влияло на показатели бессобытийной и общей выживаемости, причем в худшую сторону. Важно, что значение внутрибрюшной лимфоаденопатии оказалось независимым от других известных прогностических факторов. Есть данные, свидетельствующие о том, что в группе пациентов с ВБЛУ больше больных, имеющих del11q, и именно эта хромосомная аномалия действительно часто ассоциируется с увеличением внутренних лимфатических узлов [32]. Это может объяснять устойчивость к химиотерапии

[33]. Однако частота выявления ВБЛУ в нашем исследовании не соответствует частоте встречаемости del11q у нелеченых больных [23, 34]. Кроме того, имеются данные о том, что неблагоприятное прогностическое значение del11q в настоящее время нивелировано применением режима FCR в первой линии терапии ХЛЛ [35], в то время как ВБЛУ достоверно неблагоприятно влияла на эффективность терапии, в том числе в подгруппе FCR.

Мы также пытались оценить прогностическую значимость клинического ответа на терапию после 3-х циклов лечения при оценке показателей выживаемости. Известно, что скорость достижения ответа имеет большое значение при современной терапии другого онкогематологического заболевания — хронического миелолейкоза (ХМЛ). В частности, при выявлении недостаточной эффективности терапии, определяемой в заданные временные точки, происходят изменения в тактике лечения пациентов [36]. В нашем исследовании было показано, что пациенты, достигшие после третьего курса терапии частичного или полного ответа, имеют достоверно лучшие показатели бессобытийной и общей выживаемости. Однако, это не получило подтверждения при проведении многофакторного анализа. Данный факт может означать, что клинический ответ не всегда коррелирует с уровнем MRD периферической крови, прогностическое значение которого в настоящее время является бесспорным и доказанным в международных исследованиях [37].

Основные недостатки нашего исследования — это ретроспективный анализ, небольшой размер выборки, отсутствие результатов цитогенетического исследования методом FISH, неполные данные по уровню экспрессии CD38 и, в особенности, мутационному статусу VH — генов, а также ретроспективная оценка тяжести сопутствующей патологии по шкале CIRS. С учетом того, что режим FCR использовался только в последние годы, мы не можем исключить возможного влияния лучшего качества сопроводительного лечения на результаты терапии. С другой стороны, мы имеем дело со случаем непреднамеренной рандомизации пациентов на получение того или иного режима лечения (FC и FCR) в связи с ограниченной доступностью ритуксимаба в 2005–2006 годах. В заключение, мы считаем, что режимы FC и FCR безопасны и эффективны даже у пожилых больных ХЛЛ. Тем не менее, пациентам старше 65 лет режим FCR следует назначать с осторожностью, только после оценки состояния жизненно важных органов и тяжести сопутствующей патологии. Шкала CIRS не отвечает современным требованиям и представлениям об органных дисфункциях, поэтому не должна быть использована для этой цели. Мы также предлагаем новый прогностический фактор — наличие внутрибрюшной лимфоаденопатии и утверждаем, что вопрос необходимости визуализации лимфатических узлов при ХЛЛ не закрыт. Для подтверждения наших данных необходимо проведение проспективного исследования.

Литература

1. American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012. Available online. Last accessed November 13, 2012.

2. *Shanafelt T.D., Kay N.E.* Comprehensive management of the CLL patient: a holistic approach. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. — 2007. — P. 324–331.

3. *Brenner H., Gondos A., and Pulte D.* Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century // Blood. — 2008. — Vol. 111, № 10. — P. 4916–4921.

4. *Scarfo L., et al.* CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? // Semin Cancer Biol. — 2010. — Vol. 20, № 6. — P. 384–390.

5. *Kikushige Y., et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia // Cancer Cell. — 2011. — Vol. 20, № 2. — P. 246–259.

6. *Welch J.S., et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia // Cell. — 2012. — Vol. 150, № 2. — P. 264–278.

7. *Vas V., et al.* Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis // PLoS One. — 2012. — Vol. 7, № 8. — P. 42080.

8. *Thurmes P.* et al. Comorbid conditions and survival in unselected, newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia // Leuk Lymphoma. — 2008. — Vol. 49, № 1. — P. 49–56.

9. *Tadmor T., Polliack A.* Optimal management of older patients with chronic lymphocytic leukemia: some facts and principles guiding therapeutic choices // Blood Rev. — 2012. — Vol. 26, № 1. — P. 15–23.

10. *Smolej L.* How I treat elderly or comorbid patients with chronic lymphocytic leukemia // Acta Medica (Hradec Kralove). — 2010. — Vol. 53, № 4. — P. 213–220.

11. *Gribben J.G.* Chronic lymphocytic leukemia: planning for an aging population // Expert Rev Anticancer. — Vol. 10, № 9. — P. 1389–1394.

12. *Cheson B.D. et al.* National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment // Blood. — 1996. — Vol. 87, № 12. — P. 4990–4997.

13. *Rai K.R., et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 1975. — Vol. 46, № 2. — P. 219–234.

14. *Binet J.L., et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis // Cancer. — 1981. — Vol. 48, № 1. — P. 198–206.

15. *Damle R.N., et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 1999. — Vol. 94, № 6. — P. 1840–1847.

16. *Nikitin E.A., et al.* A comparison of the forms of chronic lympholeukemia in relation to the mutational status of the genes of the immunoglobulin variable region// Terapevticheskiy arkhiv. — 2000. — Vol. 72, № 7. — P. 52–56.

17. *Campbell M.J.*, et al. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire // Mol Immunol. — 1992. — Vol. 29, № 2. — P. 193–203.

18. [Электронный ресурс] URS: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast

19.[Электронный ресурс] URS: http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg

20. *Extermann M., et al.* Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients // J Clin Oncol. — 1998. — Vol. 16, № 4. — P. 1582–1587.

21. *Keating M.J., et al.* Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia // J Clin Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 18. — P. 4079–4088.

22. *Hallek M., et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial // Lancet. — 2010. — Vol. 376, № 9747. — P. 1164–1174.

23. *Hallek M., et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines // Blood. — 2008. — Vol. 111, № 12. — P. 5446–5456.

24. *Stadnik Y.A., et al.* Comparison of efficacy and toxicity of FC and FCR regimens in primary B-cell chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study // Onkogematologiya. — 2008. — Vol. 1, № 2. — P. 39–46.

25. *Gurina N.A., Frolova E.V., Degryse J.M.* A roadmap of aging in Russia: the prevalence of frailty in community-dwelling older adults in the St. Petersburg district-the “Crystal” study // J. Am. Geriatr. Soc. — 2011. — Vol. 59, № 6. — P. 980–988.

26. *Tam C.S., et al.* Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2008. — Vol. 112, № 4. — P. 975–980.

27. *Blum K.A., et al.* Computed tomography scans do not improve the predictive power of 1996 national cancer institute sponsored working group chronic lymphocytic leukemia response criteria // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25, № 35. — P. 5624–5629.

28. *Eichhorst B.F., et al.* Limited clinical relevance of imaging techniques in the follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: results of a meta-analysis // Blood. — 2011. — Vol. 117, № 6. — P. 1817–1821.

29. *Muntanola A., et al.* Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25, № 12. — P. 1576–1580.

30. *Norin S., Kimby E., Lundin J.* Tumor burden status evaluated by computed tomography scan is of prognostic importance in patients with chronic lymphocytic leukemia // Med Oncol. — 2010. — Vol. 27, № 3. — P. 820–825.

31. *Oscier D., et al.* Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia // British Journal of Haematology. — 2012. — P. 25.

32. *Dohner H., et al.* 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis // Blood. — 1997. — Vol. 89, № 7. — P. 2516–2522.

33. *Zenz T., et al.* Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53–p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 13. — P. 2589–2597.

34. *Oscier D., et al.* Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation // Haematologica. — 2010. — Vol. 95, № 10. — P. 1705–1712.

35. *Tsimberidou A.M., et al.* Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia // Cancer. — 2009. — Vol. 115, № 2. — P. 373–380.

36. *Baccarani M., et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27, № 35. — P. 6041–6051.

37. *Bottcher S., et al.* Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial // J. Clin. Oncol. — 2012. —Vol. 30, № 9. — P. 980–988.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА WT1 У ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОИДНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ

Н.Т. Сиордия[1], Е.Н. Булычева[1], И.В. Холопова[1], Л.Л. Гиршова[1], Ю.А. Алексеева[1], Е.Г. Ломаиа[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГОБУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. И.П.Павлова» Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия

Сиордия Надия Тамазовна — научный сотрудник ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Булычева Екатерина Николаевна* — лаборант исследователь ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Холопова Ирина Валерьевна* — врач-лабораторной диагностики, научный сотрудник ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Гиршова Лариса Леонидовна* — врач-гематолог ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Алексеева Юлия Алексеевна* — заведующая отделения гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Ломаиа Елза Галактионовна* — ведущий научный сотрудник ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор, директор НИЛ ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, ул. Аккуратова д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел. (812) 702–37–05. E-mail: siordian@list.ru (*Сиордия Надия Тамазовна).*

Резюме

Изучение уровня экспрессии гена WT1 при классических формах Ph- негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях является актуальным в связи с необходимостью поиска новых прогностических маркеров и предикторов развития первичного и вторичного миелофиброзов. Нами была изучена экспрессия гена Wt1 у 19 пациентов с классическими Ph-негативными миелодиными неоплазиями (МН). Высокая экспрессия данного гена наблюдалась у всех 9 исследуемых пациентов с миелофиброзом и только у 1/10 (10 %) пациента с другими МН. **Выводы:** Выявлена явная тенденция к повышению уровня Wt1 у пациентов с первичным и вторичным миелофиброзом, что может свидетельствовать о потенциальной возможности использования данного маркера для прогноза и развития фиброза в костном мозге.

Ключевые слова: миелоидные неоплазии, экспрессия ген Wt1, миелофиброз.

FREQUENCY OF OCCURRENCE GENE WT1 HYPEREXPRESSION IN PATIENTS WITH MYELOID NEOPLASMS

N.T. Siordiya[1], E.N. Bulycheva[1], I.V. Kholopova[1], L.L. Girshova[1], Yu.A. Alexeyeva[1], E.G. Lomaia[1], A.Y. Zaritsky[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: siordian@list.ru (Nadia T. Siordiya — researcher of Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Examine the levels of WT1 gene expression in classical forms Ph-negative chronic myeloproliferative disorders is important as the need to find new prognostic markers and predictors of primary and secondary myelofibrosis. We studied the expression of Wt1 gene in 19 patients with classic Ph-negative myeloid neoplasia (MN). High expression of this gene was observed in all nine patients studied with myelofibrosis and only 1/10 (10 %) patients with other MN. Conclusions: It was found a clear trend to increased levels of Wt1 in patients with primary and secondary myelofibrosis, which may indicate the potential use of this marker for prognosis and the development of fibrosis in the bone marrow.

Key words: myeloid neoplasms, the expression of the gene Wt1, myelofibrosis.

Статья поступила в редакцию 02.10.2012, принята к печати 20.10.2012.

Введение

Миелоидные неоплазии (МН) — это группа клональных гемобластозов, которые сопровождаются опухолевой трансформацией полипотентной стволовой клетки с последующей пролиферацией миелоидных клеток, длительно сохраняющих способность к дифференцировке. Различные формы МН имеют ряд сходных морфологических и клинико — гематологических признаков (спленомегалия, лейкоцитоз, увеличение числа мегакариоцитов в костном мозге и развитие фиброза костного мозга). Тем не менее, между ними имеются и существенные различия, на которых и основывается современная классификация миелоидных неоплазий.

Наиболее часто встречающиеся МН можно условно разделить на Ph (BCR-ABL) — позитивный хронический миелолейкоз и «классические» Ph-негативные МН: истинная полицитемия (ИП); эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ); первичный миелофиброз (ПМФ) [1].

Самым изученным среди МН является хронический миелолейкоз (ХМЛ). Открытие специфической хромосомной аберрации — реципрокной транслокации между 9 и 22 хромосомами фактически ознаменовало новую эру в исследовании патогенеза опухолей: начались активные поиски генетических дефектов при других онкологических заболеваниях.

Так, например, для группы Ph-негативных МН было описано несколько мутаций генов, которые, вероятно, вносят свой вклад в патогенез данных заболеваний.

В 2005 году была открыта точечная мутация 14 экзона гена JAK2 киназы, при которой в псевдокиназном домене JH2 белка JAK2 происходит замена аминокислоты валин на фенилаланин в 617 положении (мутация JAK2V617F) [2].

Ген JAK2 расположен в локусе 9q24, для которого ранее была описана потеря гетерозиготности при МН. Было показано, что JAK2V617F является соматической мутацией, возникающей в гемопоэтических клетках-предшественниках. Оказалось, что у определенной доли пациентов при МН, особенно при ИП, эта мутация в клетках-предшественниках гемопоэза представлена в гомозиготной форме. У таких больных происходит превращение гетерозиготной мутации JAK2V617F в гомозиготную форму благодаря митотической рекомбинации и дупликации мутантного аллеля. Мутация JAK2V617F обнаруживается у 90–95 % больных ИП, в 50–70 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и в 40–50 % случаев первичного миелофиброзах [2]. Мутация JAK2V617F оказалась маркером, при помощи которого можно проводить первичную и дифференциальную диагностику МН от доброкачественных миелопролиферативных состояний [2].

Вслед за JAK2V617F у небольшого числа JAK2V617F-негативных больных, страдающих ИП, был открыт кластер мутаций гена JAK2 в 12 экзоне (микроделеции и точечные мутации, затрагивающие аминокислотные остатки в положении 537–542 белка Jak2). Примечательно, что мутация в данном экзоне встречается практически исключительно при ИП [2].

Обнаружение мутации JAK2V617F у больных Ph-негативными МН явилось подтверждением высказанного Вильямом Дамешеком предположения о том, что в основе развития этой группы заболеваний должен быть общий патогенетический механизм. Однако, несмотря на то, что патогенетическая роль мутации JAK2V617F для манифестации классических Ph-негативных МН не вызывает сомнений, остается еще много неясных вопросов, которые относятся к этиологии МН, не ассоциированных с JAK2V617F. Кроме того, не вполне понятно, каким образом один и тот же молекулярный дефект может приводить к развитию заболеваний, далеко не всегда совпадающих по своим клиническим проявлениям, хотя и относящихся к одной группе МН. И особенно

интересным представляется то, что это единственная точечная мутация, которая встречается у подавляющего большинства больных МН.

Следует признать, что имеющиеся на сегодняшний день данные о генетических дефектах при классических Ph-негативных МН не являются исчерпывающими для определения прогноза заболевания, в связи с чем продолжается поиск потенциальных маркеров, одним из которых может оказаться ген опухоли Вильмса.

Ген WT1 (Wilm's tumor suppressor gene), был клонирован в 1990 г. при изучении дифференцировки клеток урогенитального ряда и является классическим примером гена-супрессора в развитии нефробластом у детей (опухоль Вильмса) и при трансформации фибробластов, стимулированных другими онкогенами. Он кодирует фактор транскрипции, который связывается с GC-богатыми последовательностями ДНК [3].

Механизм действия WT1 в провокации роста клеток миелоидного ряда не до конца ясен. Одним из возможных кандидатов в мишени его действия считается онкоген MYB, промотор которого содержит участок связывания с белком Egrl. В эксперименте in vitro белок WTI может связываться с этим участком и репрессировать действие промотора MYB.

Поскольку усиление экспрессии MYB резко снижает дифференцировку миелоидных клеток, а их обработка «антисмысловыми» олигонуклеотидами, блокирующими ген MYB, останавливает пролиферацию, есть основание полагать, что WT1 может действовать на рост миелоцитов опосредованно, через MYB. Существует много данных о наличии мутаций, инактивирующих ген WT1 и ассоциированных с опухолевым ростом.

Функционирование WT1 в клетках гематопоэтического ряда заключается в том, что он может действовать как онкоген и как антионкоген. В некоторых модельных системах продукт гена репрессирует транскрипцию, ингибирует рост клеток и участвует в апоптозе. Однако в дальнейшем была обнаружена высокая экспрессия WT1 дикого типа в некоторых активно пролиферирующих линиях клеток мезотелия и при лейкозах.

Продукт данного гена экспрессируется в нормальных клетках костного мозга, преимущественно в CD34+ предшественниках. Наибольший уровень WT1 обнаруживается в CD34+/CD33-, которые, скорее всего, относятся к группе очень ранних предшественников. В предшественниках CD33+, представляющих собой более позднюю стадию дифференцировки, наблюдается 100-кратное снижение экспрессии этого белка [3].

Экспрессия гена опухоли Вильмса WT1 (Wilms tumor) значительно повышена при опухолях почек, яичек, яичников, молочных желез, в большинстве случаев являясь фактором плохого прогноза для этих опухолей. В частности при острых миелобластных лейкозах исследование в динамике экспрессии Wt1 используется для оценки прогноза, мониторинга эффективности проводимой терапии и мониторинга минимальной остаточной болезни.

Однако, значимость экспрессии Wt1 при хронических миелопролиферативных заболеваниях в настоящее время остается не ясной. Тем не менее, имеются сообщения (Beer et al) о неблагоприятной прогностической роли повышенной экспрессии Wt1 у пациентов с ЭТ, ИП, миелофиброза [4].

Целью настоящего исследования была оценка частоты встречаемости гиперэкспрессии гена WT1 пир МН.

Материалы и методы

1. Пациенты

Образцы периферической венозной крови объемом 2 мл были получены от 19 пациентов с диагнозом «Первичный миелофиброз», «Вторичный миелофиброз после ИП», «Истинная полицитемия», «Эссенциальная тромбоцитемия» средний возраст которых составил 60 лет (20–74 года). 16 пациентов имели средний и/или высокий риск плохого прогноза по шкале IPSS/DIPSS. Количество пациентов, имеющих мутацию в гене Jak2- позитивных n = 13(68 %), тогда как у 6 пациентов (32 %) данная мутация отсутствовала. Краткая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Группа пациентов с МФ (n = 9) имели длительность течения заболевания более 1 года (1–8 лет) на момент первичного обследования уровня экспрессии Wt1.

2. Методика анализа

Оценка экспрессии гена Wt1 проводилась методом количественной ПЦР, использованием стандартного набора ProfileQuant Wt1 kit (Ipsogen, Марсель, Франция) на ПЦР анализаторе «Rotor-Gene 6000». Результат выражался в нормализованном количестве копий на 10000копий abl. Не учитывался результаты при концентраций гена нормализатора менее 10000 копий/реакцию.

Результаты

При оценке экспрессии гена Wt1 у пациентов с Ph-негативными МН были получены следующие результаты.

Гиперэкспрессия гена WT1 наблюдалась у 10/19 (53 %) пациентов МН. При этом повышенная экспрессия данного гена встречалась во всех случаях миелофиброза 9/9 (100 %) и только у 1/10 (10 %) пациента с другими МН ($p < 0,05$). Частота встречаемости гиперэкспрессия Wt1 не зависела от Jak2 статуса, пола и возраста пациентов, а также группы риска заболевания по шкале DIPSS/IPSS. Оценить связь со тяжестью фиброза не представляется возможным, так как у всех пациентов с проведением корректной оценки степени фиброза методом импрегнации серебра ($n = 5$), была выявлена 3ст фиброза.

Только у одного пациента отмечена прогрессия в ОМЛ. В этом случае уровень экспрессии Wt1 оставался в норме, как в дебюте МН, так и на момент верификации ОМЛ.

Средняя величина экспрессии гена WT1 в группе пациентов с ИП составляла 83.46 ± 4.84 WT1/10^4 копий ABL, ЭТ — $5,36 \pm 0.19$ WT1/10^4 копий ABL, а при ПМФ — $1449,59 \pm 30.31$ WT1/10^4 копий ABL. Достоверных различий между группой истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии получено не было ($p = 0,14$). Однако данные при МФ достоверно отмечалось от ИП и ЭТ ($p = 0,02$ и $p = 0,05$).

Обсуждение

В нашем исследовании у всех пациентов как с первичным, так и с вторичным миелофиброзом выявлялась гиперэкстперссия Wt1, тогда как встречаемость данной аберрации была крайне низка при других МН. Хотя количество наблюдений немного, но по предварительным результатам нашего исследования, вероятно, ген WT1 может быть потенциальным маркером прогноза развития фиброза при ЭТ/ИП. В связи с этим планируется дальнейшее расширение исследования с вовлечением большего количества больных для выявления прогностической значимости гиперэкспрессии Wt1 при МН.

За время наблюдения только один пациент в нашей группе трансформировался в ОМЛ. При этом как в дебюте, так и после трансформации в ОМЛ, уровень экспрессии гена Wt1 существенно не менялся. В ретроспективном исследовании Beer с соавторами [4], было показано, что из шестнадцати пациентов с развитием ОМЛ из хронических миелопролиферативных заболеваний с мутацией Jak2+ у всех отмечалось гиперэкспрессия гена Wt1. При этом оценка экспрессии Wt1 в дебюте заболевания или до момента трансформации не проводилась. Вероятно, требуется больше данных для уточнения

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ МН И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ WT1

Пациенты	Возраст/ пол	МН	Наличие муатции Jak2V617F	WT1 экспрессия	IPSS\DIPSS
1	29/м	ЭТ	+	N	Высокий риск
2	71/м	ЭТ	+	N	Высокий риск
3	69/ж	ЭТ	+	N	Высокий риск
4	74/м	ИП	–	↑	Высокий риск
5	20/ж	ЭТ	+	N	Высокий риск
6	61/ж	ИП	+	N	Высокий риск
7	74/м	ИП	+	N	Высокий риск
8	30/ж	ИП	+	N	Низкий риск
9	72/м	ЭТ→ОМЛ	+	N	Высокий риск
10	57/ж	ЭТ	+	N	Высокий риск
11	25/м	ПМФ	–	↑	Низкий риск
12	58/ж	ПМФ	+	↑	Средний риск
13	60/ж	ПМФ	–	↑	Средний риск
14	45/м	ИП→ВМФ	+	↑	Средний риск
15	69/м	ПМФ	–	↑	Средний риск
16	60/ж	ПМФ	–	↑	Средний риск
17	64/ж	ПМФ	–	↑	Высокий риск
18	51/ж	ПМФ	+	↑	Средний риск
19	60 /м	ИП-ВМФ	+	↑	Средний риск

прогностической значимости данного маркера в отношении развития ОМЛ.

В нашем исследовании гиперэкспрессия гена Wt1 у пациентов с МФ наблюдалась независимо от статуса Jak2. Однако, возможно существует корреляция между аллельной нагрузкой данной мутации и степенью экспрессии гена Wt1. Подобные данные в литературе пока не встречаются.

Для изучения прогностической значимости гиперэкспрессии Wt1, корреляции с Jak2+ статусом в дальнейшем планируется наблюдение пациентов с оценкой общей беспрогрессивной выживаемости, количество трансформаций в острый лейкоз, исследование уровня экспрессии Wt1 на фоне специфической терапии.

Изучение молекулярных маркеров прогноза течения МН имеет крайне важно значение для персонализации терапии пациентов. В настоящее время единственным методом излечения при МФ является аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток (аллоТГСК). В настоящее время нет четких рекомендаций о времени ее выполнения из-за высокой токсичности метода. Определение молекулярных маркеров, позволяющих оценить степень и темпы прогрессии заболевания, позволит своевременно включить в план терапии пациентов аллоТГСК. Кроме того, активное изучение патогенеза МН поможет разработать и эффективные консервативные терапевтические средства (табл. 1).

Литература

1. *Vardiman J.W. , Ju¨ergen Thiele, Arber D.A. et al.* The 2008 revision of theWorld Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // Blood. — 2009. — P. 937–951.

2. *Vannucchi A.M., Guglielmelli P., Tefferi A. Advances* in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms // C.A. CANCER J. CLIN. — 2009. — Vol. 59, P. 171–191.

3. *C. Rosenfeld, MA Cheever and A Gaiger*.WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome:therapeutic potential of WT1 targeted therapies // Leukemia. — 2003. — Vol. 17, P. 1301–1312.

4. *Beer P.A., Franc¸ois Delhommeau, Jean-Pierre LeCoue´ dic et al.* Vannucchi, William Vainchenker, and Anthony R. Green. Two routes to leukemic transformation after a *JAK2* mutation-positive myeloproliferative neoplasm // Blood. — 2009. — P. 2891–2900.

ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ ОТ ПРАКТИКИ К ТЕОРИИ. КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Е.Г. Романова[1], А.Ю. Зарицкий[1,2], Н.В. Ильина[3], Е.В. Карягина[3], Е.Г. Ломаиа[1]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
[3] Городская больница № 15, Санкт-Петербург, Россия

Зарицкий Андрей Юрьевич — профессор, доктор медицинских наук, директор института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Ломаиа Елза Галактионовна* — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Романова Екатерина Геннадьевна* — научный сотрудник института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Ильина Наталия Вячеславовна* — врач-гематолог отделения гематологии ГБ № 15; *Карягина Елена Викторовна* — заведующая отделением гематологии ГБ № 15.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Институт гематологии, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: katrin51297@mail.ru (Романова Екатерина Геннадьевна).

Резюме

На сегодняшний день известно несколько наблюдений сочетания хронического миелолейкоза с другими классическими Ph-негативными хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Мы представляем описание клинического случая сочетания хронического миелолейкоза с истинной полицитемии, которая манифестировала на фоне длительного анамнеза ХМЛ. При ретроспективном анализе мутация JAK2V617F была выявлена и в образцах крови взятых до развития клинической картины полицитемии. В связи с выявлением мутации T315I гена bcr-abl проводится комбинированная терапия ингибиторами тирозин-киназ и интерфероном. На этом фоне достигнута стабилизация цитогенетического ответа и снижение зависимости от гемоэксфузионной терапии. Также представлен обзор литературы.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, истинная полицитемия.

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA FROM PRACTICE TO THEORY. CASE REPORT

E. Romanova[1], A. Zaritskey[1,2], N. Ilyina[3], E. Karyagina[3], E. Lomaia[1]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
[3] Hospital № 15, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Institute of Hematology, 2 Akkuratova str., Saint- Petersburg, Russia, 197341. E-mail: katrin51297@mail.ru (Ekaterina G. Romanova — researcher of hematology institute).

Abstract

There are several observations of combination of chronic myeloid leukemia (CML) with other classic Ph-negative chronic myeloproliferative diseases in literature. We present a case report of chronic myeloid leukemia with Jak2V617F positive polycythemia vera (PV). PV manifested against the background of the long CML history. JAK2 mutation was detected in blood samples taken before the development of clinical polycythemia retrospectively. Patient was treated with combination therapy of interferon and tyrosine kinase inhibitor nilotinib.

Stabilization of cytogenetic response in patient with T315I mutation and reducing dependence on phlebotomy therapy was achieved. There is also review the literature.

Key words: chronic myeloid leukemia, polycythemia vera.

Статья поступила в редакцию 01.11.12, принята к печати 20.11.12.

Еще в 1951 году, когда В. Дамешек впервые описал клинически разные проявления хронических миелопролиферативных заболеваний, было выдвинуто предложение, что все представленные нозологии являются последовательными стадиями развития одного патологического процесса. Позднее вполне однозначно были верифицированы основные звенья патогенеза разных миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ), наиболее изученными из которых на сегодняшний день являются транслокация (9,22) при хроническом миелолейкозе и мутация JAK2V617F при классических Ph-негативных заболеваниях [1].

Описание клинического случая:

У пациента диагноз ХМЛ впервые был установлен в декабре 2008 года в возрасте 46 лет. В дебюте болезни в клинической картине доминировала массивная спленомегалия, в связи с чем, в соответствии с критериями ВОЗ, была верифицирована фаза акселерации. До цитогенетической верификации диагноза проводилась циторедуктивная терапия гидроксимочевиной. С конца декабря 2008 г. начата терапия иматинибом в дозе 600мг/д с первичной гематологической резистентностью — к 3 мес не был достигнут полный гематологический ответ (ПГО). С апреля 2009 г. начата терапия дазатинибом в дозе 140 мгоднократно в день с достижением ПГО через 2 мес (06.2009 г.) и полного цитогенетического ответа (ПЦГО) через 6 мес (09.2009 г.). На фоне терапии дазатинибом отмечалось отсроченное (через 2 года от начала приема препарата) развитие гидроторакса к апрелю 2011 г., потребовавшего временной отмены дазатиниба, а также терапии преднизолоном. В связи с рецидивирующим гидротокраксом даже на фоне снижения дозы дазатиниба до 50мг/д, а также обострением сопутствующей бронхиальной астмы, терапия дазатинибом была прекращена в 07.2011 г. На фоне временных перерывов, снижения дозы дазатиниба в 07.2011 г. ПЦГО был утрачен, но в рамках БЦГО — появились5 % Ph+ клеток. В августе 2011 начата терапия нилотинибом 800 мг/сут с удовлетворительной переносимостью. При контрольных исследованиях сохранялся частичный цитогенетический ответ (колебание уровня Ph-позитивных клеток до 10–20 %), но вновь получить ПЦГО не удалось. При обследовании мутационного статуса в апреле 2012 г. верифицирована мутация T315I. С учетом сохранения стабильного частичного цитогенетического ответа (ЧЦГО) и, естественно ПГО, терапия нилотинибом была продолжена. В качестве стандартной терапии панрезистентной мутации T315I пациенту было предложено выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК). Сиблингов у пациента нет. От неродственной аллогенной ТГСК пациент отказался. С августа 2011 у пациента отмечалось постепенное нарастание в динамике уровня гемоглобина до 186 г/л, эритроцитоза до 6,23 × 10^9/л, гематокрита до 55 %. В ходе обследования данных за вторичный эритроцитоз получено не было: бронхиальная астма компенсирована, показатели газообмена и уровень эритропоэтина были в пределах нормальных значений. В 02.2012 г. выявлена мутация JAK2V617F (данная мутация также была выявлена в пробах крови от 07.2011 г. Более ранний материал для исследования отсутствует) — у пациента верифицирована истинная полицитемия. В соответствии с критериями стратификации риска тромботических осложнений [2] был верифицирован с низкий риск развития тромбоза. С марта 2012 г. проводились периодические сеансы эритроцитофереза для достижения целевого уровней гемоглобина, гематокрита, эритроцитоза.

С августа 2012 г. с учетом двух конкурирующих неоплазий, выявления мутации T315I, в варианте экспериментальной терапии проводилось комбинированное лечение нилотиниба с препаратами интерферона (реаферон 3 млнЕд/сут). На фоне проводимой терапии достигнуто снижение зависимости от эритроцитафереза с сохранением целевого уровня гематокрита. При контрольном молекулярно-генетическом обследовании в октябре 2012 г. по данным стандартного кариотипирования Ph-позитивные клетки не выявлены, однако по результатам флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) обнаружено 7 % bcr-abl позитивных интерфазных ядер (на 200 клеток), . Кроме того персистирует и клон клеток, экспрессирующих мутацию T315I гена bcr-abl. В настоящее время терапия интерфероном в сочетании с нилотинибом продолжена.

Обсуждение

На сегодняшний день в литературе описано несколько случаев, при которых, одновременно или последовательно, у пациентов с доказанным ХМЛ одновременно была выявлена другая Ph-негативная миелоидная неоплазия (МН), в том числе истинная полицитемия, сопряженная с наличием классической поломки JAK2V516F [3–6]. Определенный интерес при этом вызывает клональность происходящих событий и возможность установления первичного «звена» в патогенезе МН.

Так, есть наблюдения, что в колониях клеток, полученных от пациента с двумя сопряженными МН (ХМЛ и истинная полицитемия), ген bcr-abl и мутация Jak2V617F присутствовали одновременно в одних и тех же клетках на уровне общего эритро-миелоидного предшественника. При этом если экспрессия гена bcr-abl выявлялась только в Jak2V617F-позитивных клетках, последняя отдельно обнаруживалась в небольшом количестве bcr-abl-негативных клетках. Интересным является наблюдение, что после достижения большого молекулярного ответа под воздействием иматиниба в колониях начали доминировать клетки только с мутацией JAK2. У данного пациента диагноз истинной полицитемии был установлен задолго до выявления ХМЛ. При динамическом наблюдении как в дебюте истинной полицитемии, так и при контрольном исследовании через несколько лет, Ph-позитивные клетки не обнаруживались [7]. Есть и другие единичные наблюдения в пользу вторичного происхождении bcr-abl транслокации. Описан клинический случай пациента с JAK2V617Fпозитивным первичным миелофиброзом, у которого при рутинном исследовании спустя шесть месяцев от постановки диагноза, был обнаружен небольшой процент bcr-abl-позитивных клеток. Причем, что интересно, при исследовании in vitro транслокация bcr-abl была выявлена только в гранулоцитарно-макрофагальных колониях клеток и не обнаружена в эритроидных колониях, в то время как мутация JAK2V617F была обнаружена как в гранулоцитарно-макрофагальных, так и в эритроидных клетках. С учетом весьма однозначно доказанной клональности ХМЛ на уровне общей гемопоэтической стволовой клетки, в данной ситуации, исследователи склоняются к представлению о bcr-abl транслокации как некотором вторичном молекулярном событии [4].

Существует версия, что длительная «псевдоцитокиновая стимуляция», опосредованная мутацией JAK2V617F может приводить к геномной нестабильности за счет стимуляции гомологичной рекомбинации, что приводит к увеличению центросом и плоидности, и являться фактором риска развития новых генетических аномалий [8]. В то же время молекулярный каскад, запускаемый bcr-abl , также приводит к генетической нестабильности.

Интересными являются наблюдения о воздействии ИТК на формирование эритроидных колоний у пациентов с истинной полицитемией. Еще в «эру до» верификации JAK2 мутации в патогенезе истинной полицитемии было показано, что гливек способен уменьшать количество эритроидных колоний in vitro, а также редуцировать спленомегалию у пациентов с истинной полицитемией. Позднее появились работы, где в исследованиях in vitro прослеживалась аналогичная закономерность при использовании дазатиниба. К сегодняшнему дню убедительно доказано, что, несмотря на широкий спектр тирозин-киназной активности, дазатиниб, как и иматиниб, не оказывает воздействия на JAK2 ни в мутированной ни в нативной форме. Таким образом, нельзя исключить существование другого, не верифицированного еще молекулярного механизма, приводящего вторично к мутации JAK2 при Ph-негативных МН, который оказывается чувствительным к данным ИТК [9–11].

Нельзя исключить, что развитие JAK2V617F опосредованного МН и хронического миелолейкоза являются следствием некоторого идентичного первичного события на уровне стволовой клетки, которое приводит в конечном итоге к формированию патологического клона. Расшифровка этого события создаст возможность максимально эффективной терапии данных МН гемобластозов.

Интересными являются попытки оценки прогностической значимости мутации JAK2 у пациентов с ХМЛ. Так, по данным Phanore Z.A. при обследовании 45 пациентов с ХМЛ, без четкой клинической картины других МН у 12 (27 %) из них была верифицирована мутация JAK2V617F, при этом с достоверно более высокой вероятностью у этих пациентов наблюдалась быстрая прогрессия в фазу акселерации и бластного криза [12].

С практической стороны интересным оказывается вопрос лечения сочетанной патологии ХМЛ и истинной полицитемии. Необходимость цитостатической терапии истинной полицитемии определяется уровнем риска развития тромботических осложнений. При низком риске данных осложнений рекомендуется проведение только дезагрегантной терапии и сеансов гемоэксфузии [2]. Рекомендации по терапии ХМЛ однозначны — «золотым стандартом» являются ИТК. Факторами, определяющими невозможность использования ИТК, является верифицированная в процессе терапии резистентность, в том числе и обусловленная мутацией T315I. Вы-

явление данной мутации является абсолютным показанием к аллоТГСК. Как ранее сообщалось, наш пациент от данного метода лечения отказался.

В настоящее время активно предпринимаются попытки разработки эффективной консервативной терапии пациентов ХМЛ с мутацией T315I. В рамках исследований проводятся терапия как статинами [13], так и высокоспецифичными новыми ИТК или ингибиторами других сигнальных путей. Понатиниб и омацетаксин показали высокую эффективность в данной группе пациентов [14, 15]. Однако в настоящее время эти препараты в России не доступны даже в рамках клинических исследований. Интересным представляется комбинированная терапия с использованием препаратов интерферона у пациентов, резистентных к монотерапии ИТК. Так, описаны единичные случаи эрадикации T315I-позитивного клона клеток у пациентов при использовании интерферона в сочетании с ИТК и достижения ПЦГО. Одним из возможных механизмов увеличения чувствительности данного лейкемического клона к ИТК является активация иммунных механизмов [16, 17]. При этом препараты интерферона являются достаточно доступными в рутинной клинической практике и также являются вариантом терапии истинной полицитемии. В случае нашего пациента, вероятно, нам удалось уменьшить количества резистентных лейкемических клеток на фоне сочетанной терапии. Однако персистенция T315I — экспрессирующего клеток, определенная не очень высокочувствительным методом — методом прямого секвенирования, свидетельствует о персистенции данного клона в значительном количестве. Учитывая отсутствие пролиферативного преимущества T315I клона перед диким типом bcr-abl — позитивных клеток [18, 19], отсутствие в литературе убедительных данных за более высоких риск трансформации в фазу асклерации и бластных криз в этой группе пациентов, нами пока продолжена экспериментальная сочетанная терапия ИТК с интерферонами под регулярным мониторингом цитогенетического анализа, количественного ПЦР и мутационного анализа (каждые 1,5–2 мес). Наряду с этим с пациентом регулярно проводятся беседы о необходимости выполнения аллоТГСК. В случае позитивного решения пациента независимо от результатов проводимой терапии пациент будет направлен на аллоТГСК.

На сегодняшний день патогенез хронического миелолейкоза является одним из наиболее изученных среди всех гемобластозов, в том числе Jak2V617F — позитивных МН. Однако, тем не менее, остается немало вопросов, решение которых позволит добиться максимальной эрадикации патологического клона консервативными методами терапии. Это позволит увеличить беспрогрессивную и, следовательно, общую выживаемость пациентов ХМЛ без применения таких агрессивных способов лечения как аллоТГСК. Однако в настоящее время применение аллоТГСК однозначно оправдано у пациентов, резистентных к ИТК, особенно с мутацией T315I.

Литература

1. *Tefferi A.* The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek // Leukemia — 2008. — Vol. 22, № 1. — P. 3–13.

2. *Ayalew Tefferi.* Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management // Am. J. Hematol. — 2012. — Vol. 87. — P. 285–293.

3. *Hussein K., Bock O., Seegers A. et al.* Myelofibrosis evolving during Imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with co-existing BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation // Blood. — 2007. — Vol. 109. — P. 4106–4107.

4. *Inami M., Inokuchi K., Okabe M. et al.* Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia // Leukemia. — 2007. — Vol. 21. — P. 1103–1104.

5. *Bornhäuser M., Mohr B., Oelschlaegel U. et al.* Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis // Leukemia. — 2007. — Vol. 21. — P.1824–1826.

6. *Pingali S.R., Mathiason M.A., Lovrich S.D., Go R.S.* Emergence of chronic myelogenous leukemia from a background of myeloproliferative disorder: JAK2V617F as a potential risk factor for BCR-ABL translocation // Clin. Lymphoma Myeloma. — 2009. — Vol. 5. — P. 25–29.

7. *Bocchia M., Vannucchi A.M., Gozzetti A. et al.* Insights into JAK2-V617F mutation in CML // Lancet Oncol. — 2007. — Vol. 10. — P. 864–866.

8. *Plo I., Nakatake M., Malivert L. et al.* JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders // Blood. — 2008. — Vol. 112. — P. 1402–1412.

9. *Oehler L., Jaeger E., Eser A. et al.* Imatinibmesylate inhibits autonomous erythropoiesis in patients with polycythemia vera in vitro // Blood. — 2003. — Vol.102. — P. 2240–2242.

10. *Silver R.T.* Imatinibmesylate (Gleevec (TM) reduces phlebotomyrequirements in polycythemia vera // Leukemia. — 2003. — Vol. 17. — P. 1186–1187.

11. *Wappl M., Jaeger E., Streubel B. et al*. Oehler. Dasatinib inhibits progenitor cell proliferation from polycythaemiavera //Medical University of Vienna, Austria. DOI: 10.1111/j.1365–2362.2008.01982.x.

12. *Coll J., Pahore Z.A., Shamsi T.S. et al* . // Physicians Surg Pak. — 2011. — Vol. 8. — P. 472–475.

13. *Oh B., Kim T.Y., Min H.J. et al.* Synergistic killing effect of imatinib and simvastatin on imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells // Anticancer Drugs. — 2012.

14. *Cortes J.E., Kim D.W., Pinilla-Ibarz J., et al.* Initial findings from the PACE trial: a pivotal phase 2 study of ponatinib in patients withCML and Ph + ALL resistant or intolerant to dasatinib or nilotinib, or with the T315I mutation // ASH Annu Meet Abstr. — 2011. Vol. 118. — P. 109.

15.*Cortes J., Lipton J.H., Rea D. et al.* Phase 2 study of subcutaneous omacetaxine mepesuccinate after TKI failure in patients with chronic-phase CML with T315I mutation // Blood. — 2012. — Vol. 13. — P. 2573–2580.

16. *Itonaga H., Tsushima H., Hata T. et al.* Successful treatment of a chronic-phase T-315I-mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa // Int. J. Hematol. — 2012. — Vol. 2. — P. 209–213.

17. *Cornelison A.M., Welch M.A., Koller C., Jabbour E.* Dasatinib combined with interferon-alfa induces a complete cytogenetic response and major molecular response in a patient with chronic myelogenous leukemia harboring the T315I BCR-ABL1 mutation // Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. — 2011. — Vol. 1. — P. 111–113.

18. *Miething C., Feihl S., Grundler R., von Bubnoff, et al.* The Bcr-Abl mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib // Leukemia. — 2006. — Vol. 20. — P. 650–657.

19. *Griswold J.J., MacPartlin M., Michael W.N. Deininger, et al.* Kinase Domain Mutants of Bcr-Abl Exhibit Altered Transformation Potency, Kinase Activity, and Substrate Utilization, Irrespective of Sensitivity to Imatinib // — 2006. — Vol. 16. — P. 6082–6093.

УНИКАЛЬНОЕ ХРАНИЛИЩЕ ТРАДИЦИЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МЕДИЦИНЫ (К 70-ЛЕТИЮ ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОГО МУЗЕЯ)

Д.А. Журавлев

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

Журавлев Дмитрий Алексеевич — ведущий научный сотрудник научно-исследовательского сектора истории медицины ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: demetrio_s@mail.ru (Журавлев Дмитрий Алексеевич).

Резюме

Статья посвящена истории Военно-медицинского музея, уникального хранилища реликвий отечественной медицины, его научно-исследовательской и экспозиционной деятельности за прошедшие 70 лет.

Ключевые слова: музей, фонды, традиции, экспозиция, сотрудники, медицинское обеспечение войск, медицина.

THE UNIQUE TREASURE-HOUSE OF TRADITIONS OF NATIVE MEDICINE (TO THE 70th ANNIVERSARY OF MILITARY MEDICAL MUSEUM)

D.A. Zhuravlev

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia.

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: demetrio_s@mail.ru (Dmitry A. Zhuravlev, leading research associate).

Abstract

This article is devoted to the history of Military Medical Museum, the unique treasure-house of relics of native medicine, its scientific and exhibition activity during the period of the last 70 years.

Key words: museum, funds, traditions, exhibition, researchers, military medical service, medicine.

Статья поступила в редакцию 05.06.2012, принята к печати 15.08.2012.

В настоящее время в мире существует большое число медицинских музеев. Лишь в США в начале этого века действовало порядка 60 подобных музеев. В Европе, где музейные традиции имеют более глубокие корни, их насчитывается еще больше. Однако не все они не равнозначны по составу своих фондов и выполняемым задачам. Круг медицинских музеев, обладающих богатыми коллекциями, занимающимися наряду с широкой экспозиционной деятельностью также и научной работой, весьма ограничен. В число «элитарных» входят такие «храмы муз» как музей «Ла Спекола»

Фасад здания Военно-медицинского музея.

во Флоренции, музей истории медицины в Париже, музей Королевского хирургического колледжа в Лондоне, Национальный музей здравоохранения и медицины в Вашингтоне. Но среди них Военно-медицинский музей в Санкт-Петербурге занимает особое место.

Его история начинается 12 ноября 1942 года, когда начальник Главного Военно-санитарного управления Красной армии Е.И. Смирнов подписал приказ о создании «Музея военно-медицинской службы Красной армии» [1].

Так началась история Военно-медицинского музея — уникального в своем роде хранилища бесценных реликвий отечественной медицины и документов отечественной истории, научно-исследовательского учреждения, которое специализируется на изучении истории и актуальных вопросов медицины.

В апреле 1943 г. музей открылся в Москве [9], а через год после снятия блокады, в 1945 г., он был переведен в Ленинград. В 1951 году музей открыл для посетителей свои двери на берегах Невы, демонстрируя широту экспозиции и богатство фондов. Отныне Военно-медицинский музей стал неотъемлемой частью культурной среды Ленинграда — Санкт-Петербурга, местом притяжения специалистов и широкой публики. Все это позволило академику Академии медицинских наук СССР Е.И. Смирнову назвать музей «сокровищницей медицинской науки» [2], а среди широких кругов культурной общественности музей приобрел славу «медицинского Эрмитажа» [3], став главным медицинским музеем страны.

Первая экспозиция музея, созданная к началу 1950-х годов, уже в то время была не только военно-медицинской направленности. В своей основе она имела общенациональную концепцию, стремление рассказать о становлении и развитии отечественной медицины в целом. Об этом свидетельствуют наименования главных ее разделов: «Медицина до Великой Октябрьской социалистической революции»; «Советская военная медицина до Великой Отечественной войны»; «Военная медицина Великой Отечественной войны»; «Советская медицина в послевоенный период» и другие. Это определялось и характером фондов музея, ставшего преемником первых медицинских коллекций и музеев Российской империи и Советского Союза. В его состав вошли уникальные предметы, отражающие не только развитие отечественной и мировой медицины, но и основные события в истории Отечества, детальные свидетельства эпохи, ее боль и кровь, радости и свершения.

Современная экспозиция Военно-медицинского музея «Медицина России и Санкт-Петербурга», торжественно открытая 10 декабря 2001 года, объединила в себе лучшие и наиболее сильные стороны предшествующей ей, и была создана с учетом последних достижений в области музейного дела и культурологи [4].

Военно-медицинский музей, является преемником первых медицинских музеев Российской империи и Советского Союза (Хирургического, Пироговского, Военно-санитарного музеев и других), столь известных производств, как завод «Красногвардеец» (Мастеровая изба, Инструментальный завод), хранителем их раритетов. В его фондах собрано более 420 тыс. предметов и коллекций, отражающих историю развития отечественной медицины с древнейших времен до современности. Это произведения живописи, графики, скульптуры; наборы и хирургические инструменты; медицинские приборы и аппараты; средства иммобилизации; одежда гражданских и военных врачей, образцы госпитальной одежды; индивидуальные средства защиты; рукописи; фотографии; альбомы и др. Музей является хранителем ценных раритетов, представляющих историко-медицинское значение. Это «Сочинения Амбруаза Паре о лечении огнестрельных ран, переломов…», учебный атлас доктора медицины и хирургии Годфрида Бидлоо «Анатомия человеческого тела», диссертация Н.И. Пирогова «Является ли перевязка брюшной аорты паховой области легко выполнимым и безопасным вмешательством?», диссертация С.П. Боткина «О всасывании жира в кишках» с автографом, большой интерес представляют атлас Н.И.Пирогова «Хирургическая анатомия артериальных стволов и фасций», «Полный курс прикладной анатомии», «Анатомические изображения наружного вида и положение органов» и др. [6]

Хорошо известны произведения изобразительного искусства, хранящиеся в Военно-медицинском музее. Среди них полотна И.Е. Репина «Приезд Н.И. Пирогова в Москву на юбилей», В.Л. Боровиковского «Портрет А.И. Васильева», Д.Б. Альховского «И.П. Павлов читает лекцию в Военно-медицинской академии в 1929 г.» и другие, скульптуры В.И. Мухиной «Бюст Н.Н. Бурденко» и М.К. Аникушина «Бюст П.А. Куприянова» и многие другие.

Среди экспонатов музея находятся подлинные материалы и документы, посвященные медицинскому обеспечению русской армии и знакомящие с объемом медицинской помощи раненым и больным с VI по XXI вв. Лишь малая часть уникальных музейных предметов в настоящее время представлена в действующей экспозиции.

В фондах Военно-медицинского музея представлены уникальные предметы, раскрывающие деятельность российских и советских военных медиков, представителей военно-медицинской службы антигитлеровской коалиции, а также их противников. Изучение подлинных документов того времени открывает перспективы для дальнейшего совершенствования организации медицинского обеспечения войск в военное и мирное время и позволяет Военно-медицинскому музею осуществлять крупные международные проекты гуманитарного и исторического характера.

Особое место в музейном собрании занимают персональные фонды более 300 видных деятелей российской медицины, внесших значимый вклад в развитие мировой науки и практики. Среди них фонды: В.М. Бехтерева, С.П. Боткина, Н.Н. Бурденко, И.В. Буяльского, Я.В. Виллие, В.А. Оппеля, Л.А. Орбели, И.П. Павлова, Н.И. Пирогова, И.М. Сеченова, Г.И. Турнера многих других.

Научно-исследовательская работа являлась определяющей в деятельности основных подразделений Военно-медицинского музея с первых дней его существования. Это отвечало замыслу основателей музея — ведущих ученых-медиков с мировыми именами, которые видели в нем, прежде всего, научно-исследовательское учреждение с широким кругом изучаемых проблем, как «..институт по изучению опыта Отечественной войны, а, следовательно, и последующих войн» [7]. Постановлением Совета Министров СССР от 26 марта 1946 г. труд научных сотрудников музея был приравнен к

Экспозиция Военно-медицинского музея. Пироговский зал.

труду научных сотрудников Академии медицинских наук СССР — главного центра отечественной медицинской науки. Колоссальный объем работы был проделан на базе музея после окончания боевых действий Второй мировой войны 1939–1945 гг., и в первую очередь здесь следует отметить научное обобщение опыта военной медицины за прошедший период. Проделанный научными сотрудниками музея труд и сегодня не потерял своей актуальности и востребован учеными всего мира, являясь образцом высочайшей квалификации специалистов, принимавших участие в его создании. В 1946–1955 гг. был создан колоссальный труд, не имеющий аналогов ни в российской, ни в мировой истории — «Опыт советской военной медицины в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.» [8].

На основе архивных и фондовых материалов музея был издан ряд фундаментальных научных трудов, историко-медицинских исследований, мемуаров, широко известных в нашей стране и за ее пределами. Это 27 томов научных трудов музея, 6-томный «Энциклопедический словарь военной медицины», справочник «Военные врачи — участники Великой Отечественной войны 1941–1945 гг.» в 4-х книгах, трехтомный уникальный труд «История военной медицины России» и другие.

Усилиями сотрудников музея разработаны библиографические указатели прижизненных изданий трудов И.П. Павлова, Н.А. Семашко, указатели литературы о жизни и деятельности Н.И. Пирогова, С. П.Боткина, В.А. Оппеля, З.П. Соловьева и других.

Сегодня значительную часть научных исследований, проводимых в музее, составляют работы историко-медицинского характера и, прежде всего, в области истории российской медицины.

Военно-медицинский музей активно сотрудничает с российскими и зарубежными партнерами при реализации крупных экспозиционных проектов, как в России, так и за ее пределами. За последние годы музей был неоднократно удостоен самых высоких и престижных наград за работу в данной области, а выставки широко освещались в средствах массовой информации и заслужили лестные отзывы со стороны специалистов и широкой зрительской аудитории. Среди них следует назвать «Анатомический театр», «Милосердие без границ», «Вместе мы сильны», «Между жизнью и смертью», «Медицина высоты» и многие другие.

На протяжении всей своей истории музей выполнял важную функцию патриотического воспитания, помогая не только формировать мировоззрение и нравственные принципы молодых поколений отечественных врачей, демонстрируя примеры профессионализма, служения Родине, но и посредством экспозиционной деятельности, научных исследований способствует распространению и пропаганде идеалов гуманизма и милосердия российской-советской медицины, как в мирное время, так и в годы войн.

За годы своего существования Военно-медицинский музей стал широко известен в России и далеко за ее пределами как «хранитель» исторических традиций российской медицины; многопрофильное научно-исследовательское и просветительное учреждение, представляющее собой уникальный объект культуры федерального уровня и международного значения, по богатству музейных фондов не имеющий себе равных среди медицинских музеев России и мира.

Литература

1. Архив Военно-медицинского музея. Ф. 2. Оп. 6953. Д. 1. Л. 25.

2. Архив Военно-медицинского музея. Ф. 2. Оп. 61213. Д. 1. Л. 90.

3. Архив Военно-медицинского музея. Ф. 2. Оп. 68041. Д. 4. Л. 49.

4. *Будко А.А.* «Музей можно по праву назвать медицинским Эрмитажем» // Военно-исторический журнал. — 2002. — № 10. — С. 74-75.

5. *Будко А.А., Мурга Л.М.* Хранитель исторических традиций российской военной медицины (К 60-летию Военно-медицинского музея МО РФ) // Военно-медицинский журнал. — 2002. — № 10. — С. 77.

6. К 60-летию Военно-медицинского музея Министерства обороны Российской Федерации // Военно-медицинский журнал. — 2002. — № 11. — С. 74.

7. Опыт советской медицины в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг. Тт. 1 — 35. — М., 1949–1955.

8. *Шабунин А.В.* Военно-медицинский музей 1943–1993. Исторический очерк. — СПб., 1993. — С. 13.

ПРАВИЛА ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ

(составлены с учетом «Единых требованийкрукописям, предоставляемымв биомедицинскиежурналы», разработанных Международным комитетомредакторов медицинских журналов)

«Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» представляет на своих страницах оригинальные статьи, обзоры литературы, клинические лекции и наблюдения, учебно-методические публикации. Значительное место будет отведено отечественным и зарубежным публикациям, представляющим новые технологии оказания высоко-технологичной медицинской помощи.

В приложениях к журналу, в соответствии с двусторонними соглашениями между Центром и зарубежными профессиональными медицинскими обществами и ассоциациями, предполагается издавать в русском переводе международные рекомендации по лечению и диагностике в области кардиологии, сердечно-сосудистой хирургии, эндокринологи, гематологии и трансфузиологии.

Издание рассчитано на широкий круг читателей — врачей специалистов, терапевтов, врачей общей практики, семейных врачей, студентов медицинских ВУЗов, научных работников и преподавателей — и отражает современные взгляды на необходимость развития междисциплинарного подхода к решению проблемы снижения смертности и увеличения продолжительности жизни в РФ.

В журнале имеются следующие разделы: 1) передовые и редакционные статьи; 2) оригинальные статьи; 3) обзоры и лекции; 4) рекомендации для практического врача; 5) дискуссии; 6) краткие сообщения; 7) исторические очерки; 8) информация о планах проведения конференций, симпозиумов, съездов; 9) реклама.

Общими критериями для публикации статей в журнале «Артериальная гипертензия», являются актуальность, новизна материала и его ценность в теоретическом и/или прикладном аспектах. Редакция обеспечивает экспертную оценку (рецензирование) рукописей. На основании двух письменных рецензий и заключения редколлегии рукопись принимается к печати, отклоняется или возвращается автору (авторам) на доработку.

Редакция оставляет за собой право публиковать принятые к печати статьи в том виде и последовательности, которые представляются оптимальным для журнала.

Оформление рукописи. Статьи представляются в редакцию в двух экземплярах, напечатанных на одной стороне белой непрозрачной бумаги формата А4 (210 × 297 мм). Текст должен быть напечатан через 2 интервала, черно-белым шрифтом «Times New Roman» (шрифт 14), с полями: сверху — 20 мм, слева — 30 мм, справа — 10 мм, снизу — 25 мм; а также на электронных носителях или по электронному адресу: bulleten@almazovcentre.ru.

Все страницы должны быть последовательно пронумерованы. Рукопись оригинальных статей (и кратких сообщений) должна включать в себя следующие разделы: 1) титульный лист; 2) резюме; 3) ключевые слова; 4) введение; 5) материалы и методы; 6) результаты; 7) обсуждение; 8) список литературы; 9) иллюстрации; 10) подписи к рисункам; 11) таблицы.

Титульный лист печатается на отдельной странице и включает: ФИО, должность и ученую степень автора (всех соавторов), место (места) выполнения работы и подписи всех авторов (заверяющие согласие на научное и литературное редактирование статьи и передачу редакции журнала прав на статью в отредактированном виде). В нижней части этого листа следует указать ФИО, полный почтовый адрес, телефон, факс и e-mail автора, с которым редакция будет поддерживать контакт. Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя. В направлении можно указать, является ли статья диссертационной.

Резюме (Abstract) на русском и английском языках объемом неболее 200 слов, включающее ФИО авторов и место выполнения работы, ключевые слова (не более 5). Резюме оригинальной статьи должно включать разделы: актуальность (необязательно) (Background), цель исследования (Objective), материалы и методы (Design and methods), результаты(Results), выводы(Conclusion).

Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5–2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»). Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]).

Таблицы. Каждая таблица должна быть напечатана на отдельной странице, иметь номер (арабскими цифрами) и название (без сокращений). Таблицы должны располагаться в порядке упоминания в статье (в тексте дается указание, например, табл. 1). Все графы в таблице должны иметь заголовок; все сокращения — расшифрованы в конце таблицы.

Рисунки должны быть выполнены в двух экземплярах на одной стороне отдельных листов плотной белой гладкой бумаги, а также в электронном виде в форматах *.tif, *.pcx, *.bmp (Exel, PowerPoint, Word для графиков и диаграмм). Размер фотографий 9 × 12 см. На обратной стороне каждого рисунка или фото указываются ФИО первого автора, название статьи, номер рисунка и отмечается верх и низ. На рисунке должно быть минимальное количество обозначений, все пояснения выносятся в подпись под рисунком. Для всех иллюстративных материалов в тексте указывается место (в тексте дается указание, например, рис. 1).

Для оригинальной статьи суммарный объем (все разделы) не должен превышать 15 страниц (бумага А4), напечатанных через 2 интервала; для краткого сообщения — 4 страниц; число иллюстраций — не более 3, количество цитированных источников — не более 15. Объем и оформление других видов работ (обзор, лекции или иное) согласуется с редакцией заранее. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

Все аббревиатуры, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий общеизвестных метрических единиц.

Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять принятые работы.

Направление в редакцию работ, уже переданных в другие издания или напечатанных в них, не допускается. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются. Рукописи, оформленные с нарушением правил, редакцией не рассматриваются.

Текущую информацию по журналу можно получить на сайте ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ:

www.almazovcentre.ru

Тел./факс +7 (812) 702-37-16.