

ГЕМАТОЛОГИЯ и ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

4' 2016

КВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1956 ГОДА

ОКТАБРЬ—ДЕКАБРЬ ТОМ 61

Учредитель журнала ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС РЕДАКЦИИ:

115088, Москва,
ул. Новоослаповская, д. 5, стр. 14
ОАО «Издательство "Медицина"»

ТЕЛЕФОН РЕДАКЦИИ:

+7-495-670-65-94

E-mail: RBelGT@yandex.ru

Зав. редакцией **М. Ю. Белоусова**

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел./факс +7-495-678-64-84

Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в реклам-
ных материалах, несут рекламодатели

Редактор *И. Я. Таджиев*

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Корректор *Т. Д. Малышева*

Верстка *С. М. Мешкорудникова*

Сдано в набор 28.11.16.

Подписано в печать 01.12.16.

Формат 60 х 88 1/8.

Печать офсетная.

Печ. л. 7,00.

Усл. печ. л. 6,86.

Уч.-изд. л. 7,35.

Заказ 657.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР № 010215 от 29.04.97 г.

Журнал зарегистрирован
в Роскомнадзоре РФ.

Свидетельство о регистрации

ПИ № ФС 77-36821 от 14 июля 2009 г.

Отпечатано в типографии

ООО "Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Каталог АО "Роспечать":

Индекс 71426

Объединенный каталог "Пресса России":

Индекс 41284

Подписка через интернет:

www.akc.ru, www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию
журнала: elibrary.ru

ISSN 0234-5730 (Print).

ISSN 2411-3042 (Online).

Гематология и трансфузиология. 2016.

Т. 61. № 4, 169–224.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор журнала

ВОРОБЬЕВ Андрей Иванович, академик РАН,
доктор мед. наук, профессор

Заместитель главного редактора

ГОРОДЕЦКИЙ Владимир Матвеевич, член-корр. РАН,
доктор мед. наук, профессор

Ответственный секретарь (трансфузиология), научный редактор

ГАЛСТЯН Геннадий Мартинович, доктор мед. наук

Ответственный секретарь (гематология)

ТРОИЦКАЯ Вера Витальевна, кандидат мед. наук

ЧЛЕНЫ РЕДКОЛЛЕГИИ:

Бирюкова Людмила Семеновна, доктор мед. наук
Васильев Сергей Александрович, доктор мед. наук, профессор
Воробьев Иван Андреевич, член-корр. РАН, доктор биол.

наук, профессор
Голенков Анатолий Константинович, доктор мед. наук,
профессор

Головкина Лариса Леонидовна, доктор мед. наук
Домрачева Елена Васильевна, доктор мед. наук, профессор

Донсков Сергей Иванович, доктор мед. наук, профессор

Козинец Геннадий Иванович, доктор мед. наук, профессор

Мамонов Василий Евгеньевич, кандидат мед. наук

Масчан Алексей Александрович, доктор мед. наук, профессор

Османов Евгений Александрович, доктор мед. наук, профессор

Паровичникова Елена Николаевна, доктор мед. наук

Рагимов Гейдар Алекперович, доктор мед. наук, профессор

Савченко Валерий Григорьевич, академик РАН, доктор мед.

наук, профессор

Судариков Андрей Борисович, доктор биол. наук

Тупицын Николай Николаевич, доктор мед. наук, профессор

Франк Георгий Авраамович, член-корр. РАН, доктор мед. наук,
профессор

Хватов Валерий Борисович, доктор мед. наук, профессор

Хорошко Нина Дмитриевна, доктор мед. наук, профессор

Чернов Вениамин Михайлович, доктор мед. наук, профессор

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Абдулкадыров Кудрат Мугутдинович (Санкт-Петербург, Россия), Афанасьев
Борис Владимирович (Санкт-Петербург, Россия), Берковский Арон
Ленидович (Москва, Россия), Дризе Нина Иосифовна (Москва, Россия),
Карякин Александр Вадимович (Москва, Россия), Калинин Николай
Николаевич (Москва, Россия), Ковалева Лидия Григорьевна (Москва,
Россия), Криволапов Юрий Александрович (Санкт-Петербург, Россия),
Лукина Елена Алексеевна (Москва, Россия), Менделеева Лариса Павловна
(Москва, Россия), Мисюрин Андрей Витальевич (Москва, Россия), Никитин
Иван Куприянович (Москва, Россия), Поспелова Татьяна Ивановна
(Новосибирск, Россия), Рукавицын Олег Анатольевич (Москва, Россия),
Сахибов Яшен Даминович (Москва, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Бахрамов Саиджало Махмудович (Ташкент, Республика Узбекистан), Новак
Василий Леонидович (Львов, Украина), Перехрестенко Петр Михайлович
(Киев, Украина)



GEMATOLOGIYA i TRANSFUZIOLOGIYA

4' 2016

FREQUENCY 4 ISSUES PER YEAR

HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

FOUNDED IN 1956

OCTOBER—DECEMBER VOL. 61

Founder of the Journal Hematology Research Center, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief Vorobiev Andrey I., academician of Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor

Deputy Editor

Gorodetsky Vladimir M., corresponding member of Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor

Executive Editor of Transfusiology

Scientific Editor

Galstyan Gennady M., MD, PhD, DSc

Executive Editor of Haematology

Troitskaya Vera V., MD, PhD

Editorial Board:

Biryukova Ludmila S., MD, PhD, DSc; Vasiliev Sergey A., MD, PhD, DSc, prof.; Vorobiev Ivan A., corresponding member of Russian Academy of Natural Sciences, BD, PhD, DSc, prof.; Golenkov Anatoliy K., MD, PhD, DSc, prof.; Golovkina Larisa L., MD, PhD, DSc; Domracheva Elena V., MD, PhD, DSc, prof.; Donskov Sergey I., MD, PhD, DSc, prof.; Kozinets Gennady I., MD, PhD, DSc, prof.; Mamonov Basil E., MD, PhD; Maschan Alexey A., MD, PhD, DSc, prof.; Osmanov Eugeniy A., MD, PhD, DSc, prof.; Parovichnikova Elena N., MD, PhD, DSc; Rahimov Heydar A., MD, PhD, DSc, prof.; Savchenko Valeriy G., academician Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, prof.; Sudarikov Andrey B., BD, PhD, DSc; Tupitsin Nicholay N., MD, PhD, DSc, prof.; Frank George A., corresponding member of Russian Academy of Medical Sciences, MD, PhD, DSc, prof.; Hvatov Valeriy B., MD, PhD, DSc, prof.; Khoroshko Nina D., MD, PhD, DSc, prof.; Chernov Benyamin M., MD, PhD, DSc, prof.

Advisory Board

Abdulkadyrov Kudrat M. (St. Petersburg, Russia), Afanasyev Boris V. (St. Petersburg, Russia), Berkovskiy Aron L. (Moscow, Russia), Drize Nina I. (Moscow, Russia), Karyakin Alexander V. (Moscow, Russia), Kalinin Nikolay N. (Moscow, Russia), Kovaleva Lydia G. (Moscow, Russia), Krivolapov Yuri A. (Saint-Petersburg, Russia), Lukina Elena A. (Moscow, Russia), Mendeleeva Larisa P. (Moscow, Russian), Misyurin Andrey V. (Moscow, Russia), Nikitin Ivan K. (Moscow, Russia), Pospelova Tatiana I. (Novosibirsk, Russia), Rukavitsyn Oleg A. (Moscow, Russia), Sakhibov Yashen D. (Moscow, Russia)

International Advisory Board

Bakhramov Saidzhalol M. (Tashkent, Uzbekistan), Novak Vasily L. (Lviv, Ukraine), Perehrestenko Peter M. (Kiev, Ukraine)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Попова Н.Н., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г. Кондиционирование треосульфаном перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у взрослых больных гемобластомами..... 172-177
- Дорохина Е.И., Магомедова А.У., Куликов С.М., Бирюкова Л.С., Кременецкая А.М., Воробьев А.И., Кравченко С.К. Отдаленная нефротоксичность высокодозной химиотерапии по модифицированной программе NHL-BFM-90 у взрослых больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой..... 177-183
- Назарова Е.Л., Демьянова В.Т., Шардаков В.И., Зотина Е.Н., Докишина И.А. Ассоциации полиморфизма ряда генов врожденного иммунитета с риском развития множественной миеломы и хронического лимфолейкоза..... 183-189
- Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клейна Е.В., Четкин А.В. Значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе в эру таргетных лекарственных препаратов..... 190-196
- Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибнохходова О.П., Харсекина А.Е., Васильев Е.В., Хоржевский В.А., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена JAK2..... 196-200
- Комков А.Ю., Мирошниченкова А.М., Ольшанская Ю.В., Мякова Н.В., Дьяконова Ю.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б., Масчан А.А., Масчан М.А. Детекция перестроек иммуноглобулиновых генов при острых лимфобластных лейкозах с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения..... 200-204
- Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвич И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г. Получение лиофилизированной плазмы с сохраненной активностью факторов свертывания..... 204-208

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии..... 208-215

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

- Власова Ю.Ю., Морозова Е.В., Смирнова А.Г., Гиндина Т.Л., Афанасьев Б.В. Клиническая эффективность комбинации ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения и 5-азациитидина в терапии больного с миелоидным бластным кризом хронического миелолейкоза..... 215-217
- Кумскова М.А., Яструбинская О.И., Лихачева Е.А., Васильев С.А., Дvirnyk В.Н., Коняшина Н.И., Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Зозуля Н.И. Особенности диагностики синдрома Бернара-Сулье..... 217-221

НЕКРОЛОГ

- Памяти Александра Евгеньевича Баранова..... 224

ИНФОРМАЦИЯ

- Цикл лекций и практических занятий «Интенсивная терапия критических состояний в онкогематологии»

CONTENTS

ORIGINAL PAPERS

- Popova N.N., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Drokov M.Yu., Vasilyeva V.A., Mikhailtsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G. Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in adult patients with hematological malignancies is non toxic, but not myeloablative
- Dorokhina E.I., Magomedova A.U., Kulikov S.M., Biryukova L.S., Kremetskaya A.M., Vorobiev A.I., Kravchenko S.K. Late nephrotoxicity of intensive modified program NHL-BFM-90 in adult patients poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma
- Nazarova E.L., Demianova V.T., Shardakov V.I., Zotina E.N., Dokshina I.A. Associations of polymorphism in several innate immunity genes with the risk of the development of chronic lymphoproliferative diseases
- Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Martynkevich I.S., Kleina E.V., Chechetkin A.V. The meaning of the minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia in the era of targeted drugs
- Subbotina T.N., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Kharsekina A.E., Vasiliev E.V., Khorzhevskiy V.A., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. Using of pyrosequencing method for the detection and quantitative determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden
- Komkov A.Yu., Miroshnichenkova A.M., Olshanskaya Yu.V., Myakova N.V., Diakonova Yu.Yu., Minervina A.A., Mamedov I.Z., Lebedev Yu.B., Maschan A.A., Maschan M.A. Detection of immunoglobulin genes rearrangements in patients suffered from acute lymphoblastic leukemia with the use of high throughput next generation sequencing
- Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Gurvits I.D., Anisimova E.V., Savchenko V.G. Preparing lyophilized plasma with the preserved activity of coagulation factors

REVIEWS OF LITERATURE

- Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir J.V., Bondarev V.P. Main direction for the development and modification of preparations for the treatment hemophilia

CLINICAL CASES

- Vlasova Yu.Yu., Morozova E.V., Smirnova A.G., Gindina T.L., Afanasiev B.V. Clinical efficacy of the combination of second generation tyrosine kinase inhibitors and 5-azacitidine in the treatment of chronic myeloid leukemia patient in myeloid blast crisis
- Kumskova M.A., Yastrubinskaya O.I., Likhachyova E.A., Vasiliev S.A., Dvirnyk V.N., Konyashina N.I., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N., Zozulya N.I. Features of diagnostics of Bernard-Soulier syndrome

OBITUARY

- In memory to Aleksandr Evgenyevich Baranov

INFORMATION

- Series of lectures and practical lessons "Intensive therapy of critical states in oncohematology"

Журнал "Гематология и трансфузиология" входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук, опубликованный в бюллетене ВАК Министерства образования и науки РФ.

Журнал "Гематология и трансфузиология" индексируется в следующих информационных системах: РИНЦ, Scopus, Web of Science, Excerpta Medica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Index Medicus; INIS Atomindex (International Nuclear Information System); Nutrition Abstracts and Reviews; Ulrich's International Periodicals Directory.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

© ОАО «Издательство «Медицина», 2016

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155-006.04-08:615.361.4-013.3

Попова Н.Н., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Дроков М.Ю., Васильева В.А.,
Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г.

КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ТРЕОСУЛЬФАНОМ ПЕРЕД ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Основным миелоаблативным режимом кондиционирования перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является режим бусульфана 16 мг/кг + циклофосфамид 120 мг/кг. Известны серьезные токсические осложнения при использовании высоких доз бусульфана, что инициировало поиск альтернативных программ. Мы исследовали режим треосульфан 36 г/м² + циклофосфамид 120 мг/м² как миелоаблативный у 18 больных гемобластомами из группы высокого риска (алло-ТГСК выполнена не в 1-й ремиссии, больные с неблагоприятными цитогенетическими аномалиями). Медиана возраста 27 лет (от 19 до 40 лет). В раннем посттрансплантационном периоде не было зафиксировано тяжелых токсических осложнений. Получены неплохие результаты выживаемости: в течение двух лет после алло-ТГСК общая выживаемость у больных острым миелобластным лейкозом составила 77,8%, у больных острым лимфобластным лейкозом – 66,7%. Однако на +90-й день у 8 (44,4%) из 18 больных зафиксировано отторжение трансплантата.

Ключевые слова: трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; отторжение трансплантата; кондиционирование треосульфаном.

Для цитирования: Попова Н.Н., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г. Кондиционирование треосульфаном перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у взрослых больных гемобластомами. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 172-177. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-172-177>

Popova N.N., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Drokov M.Yu., Vasilyeva V.A.,
Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G.

TREOSULFAN-BASED CONDITIONING REGIMEN PRIOR TO ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN ADULT PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES IS NON TOXIC, BUT NOT MYELOABLATIVE

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

For many decades the main myeloablative conditioning regimen prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HCT) consists of busulfan (16 mg/kg) and cyclophosphamide (120 mg/kg). The rate of transplanted-related mortality as a result of toxicity is still high. However alternative regimens are now available. These regimens allow to reduce toxicity and to get favorable outcomes. Aware of the serious toxic complications when using high doses of busulfan initiated the search for alternative programs. We studied conditioning regimen of the therapy with treosulfan 36 g/m² + cyclophosphamide 120 mg/m² as myeloablative, but low toxic for allo-HCT in 18 patients with hematological malignancies from the high-risk group (allo-HCT has been performed not in first remission, patients with unfavorable cytogenetic abnormalities). The median of the age was 27 years (from 19 to 40 years). During the early posttransplant period no severe toxic complications were registered in the study group. Not bad results were got during 2 years after allo-HCT. The overall survival rate in the group of patients with acute myeloid leukemia accounted for 77.8% and in the group of patients with acute lymphoblastic leukemia – 66.7%. On the day +30 full donor chimerism was detected only in 12 patients (66%). However on day +90 in 8 cases (44.4%) the graft rejection was recorded.

Key words: allogeneic stem cell transplantation; graft rejection; treosulfan-based conditioning regimen.

For citation: Popova N.N., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Drokov M.Yu., Vasilyeva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G. Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in adult patients with hematological malignancies is non toxic, but not myeloablative. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(4): 172-177. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-172-177>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 October 2016

Accepted 22 November 2016

Для корреспонденции:

Попова Наталья Николаевна, врач-гематолог научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии, депрессии кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. E-mail: popova015@mail.ru.

For correspondence:

Popova Natalia N., MD, doctor-haematologist of the Research Clinical Department of the high-dose chemotherapy, depression of hematopoiesis and bone marrow transplant of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: popova015@mail.ru.

Information about authors:

Popova N.N., <http://orcid.org/0000-0003-0636-4991>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Drokov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>; Vasilyeva V.A., <http://orcid.org/0000-0003-0904-7385>; Mikhaltsova E. D., <http://orcid.org/0000-0002-9372-5400>; Koroleva O.M., <http://orcid.org/0000-0001-9859-2849>; Dubnyak D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2253-9870>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0003-2935-4040>.

На протяжении многих десятилетий одним из основных миелоаблативных режимов предтрансплантационного кондиционирования у больных гемобластозами оставался режим бусульфана 16 мг/кг + циклофосамид 120 мг/кг (BuCy). Впервые эта программа была использована в 1983 г. у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [1]. С тех пор началось применение этого режима кондиционирования, что было обусловлено его эффективностью и меньшим числом осложнений, связанных с токсическим воздействием, по сравнению с более ранними подходами, включавшими тотальное облучение тела. Одно из первых исследований по применению этого режима кондиционирования перед алло-ТГСК от HLA-идентичных родственных доноров у 51 больного ОМЛ представило обнадеживающие результаты. Большинству больных в этом исследовании алло-ТГСК выполнена в продвинутых стадиях заболевания (2-я/3-я ремиссии или рецидивы заболевания), лишь у 18 больных – в 1-й ремиссии заболевания, 2-летняя общая выживаемость составила 44%, если трансплантацию выполняли в 1-й ремиссии заболевания. Если алло-ТГСК выполнена в резистентном рецидиве заболевания, общая выживаемость составила 0, при выполнении трансплантации во 2-й/3-й ремиссии заболевания – 29% [2].

Таким образом, этот режим предтрансплантационного кондиционирования был эффективен особенно у молодых пациентов и тех больных, кому она была выполнена в первой ремиссии заболевания. Рецидивы заболевания после алло-ТГСК диагностированы только у 2 больных. Основной причиной летальности (68%) стали острая реакция трансплантат против хозяина (ОРПХ) и инфекционные осложнения.

Использование высоких доз бусульфана нередко приводит к развитию таких значимых осложнений, как веноокклюзионная болезнь печени (ВОБ), поражения легких, центральной нервной системы [3, 4].

При анализе European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) [5] всех HLA-идентичных родственных алло-ТГСК, выполненных в 1-й ремиссии ОМЛ после миелоаблативного кондиционирования BuCy, показано, что основным фактором летальности служила токсичность режима кондиционирования. Более высокую трансплантационную летальность при использовании химиотерапевтического режима BuCy во многом связывали с частым развитием у больных фатальной ВОБ [4, 6–11]. Применение кондиционирования BuCy приводило к надпочечниковой недостаточности у 60% больных и другим эндокринным изменениям после трансплантации [12].

Использование режима BuCy перед алло-ТГСК у детей показало, что, помимо осложнений, связанных с токсичностью, бусульфан имеет вариабельную фармакокинетику (от крайне низких до крайне высоких концентраций после приема бусульфана внутрь), что приводит либо к его недостаточной эффективности, либо к очень высокой токсичности [13].

Режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью (РИК) обладают меньшей токсичностью и лучшей переносимостью. Действие РИК направлено на создание условий максимального иммуноаблативного, но не миелоаблативного воздействия. При этом создаются условия для реализации действия «трансплантат против лейкоза» [14].

Однако использование РИК у тех больных, которые на момент трансплантации находились не в первой ремиссии или у которых наблюдалась минимальная остаточная болезнь, ассоциировалось с более высоким риском развития рецидива заболевания после трансплантации, а также демонстрировало худшие результаты общей и бессобытийной выживаемости по сравнению с миелоаблативным режимом кондиционирования [15].

Применение треоосульфана в качестве предтрансплантационного кондиционирования в миелоаблативном режиме, в том числе у больных из группы высокого риска, представлялось перспективным.

Треоосульфан, так же как и бусульфан, принадлежит к классу алкилирующих препаратов. Главное отличие состоит в том, что треоосульфан – неактивное вещество, которое является предшественником бифункционального алкилирующего цитотоксического агента дипоксидибутана. При физиологических условиях (рН 7,4; температура 37°C) фармакологически неактивный треоосульфан неферментативным путем превращается в два активных метаболита – моно- и дипоксидибутан, которые обладают способностью алкилировать нуклеофильные центры ДНК, что приводит к подавлению пролиферации опухолевых клеток [16, 17].

Ряд исследований [18–20] показал, что режим предтрансплантационного кондиционирования с треоосульфаном может рассматриваться как миелоаблативный и одновременно пониженной токсичности.

Высокая эффективность треоосульфана продемонстрирована [21] при использовании его в предтрансплантационном кондиционировании у детей с незлокачественными заболеваниями. Проанализированы результаты трансплантации у 32 больных, из них у 18 (56%) больных трансплантация выполнена в связи с первичным иммунодефицитом, у 10 – различными врожденными тяжелыми метаболическими нарушениями, у 4 – врожденным остеопетрозом. Всем им было проведено предтрансплантационное кондиционирование с помощью треоосульфана в дозе 36–42 г/м². У 11 больных выполнена трансплантация от HLA-идентичных родственных, у 21 – от неродственных доноров. У 17 больных в качестве источника трансплантата использовали костный мозг; у 9 – стволовые кроветворные клетки периферической крови (СКК), у 6 – пуповинные клетки. У 28 (87,5%) больных на +30-й день достигнуто приживание, причем у 24 (75%) из них 100% «донорская химера», у 3 (10%) из 28 в дальнейшем было зарегистрировано отторжение трансплантата. У 2 больных на +30-й день собственное кроветворение составляло 50%. Один больной умер вследствие ВОБ и еще один – в результате инфекционных осложнений в раннем посттрансплантационном периоде. Общая выживаемость в течение 14 мес составила 84%.

Опубликовано исследование [22] по использованию треоосульфана в режиме предтрансплантационного кондиционирования у детей с острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ), которое представило неплохие результаты. В исследование был включен 71 больной (в возрасте от 0,8 до 17,9 года, медиана возраста 9 лет). На момент трансплантации 1-я ремиссия заболевания констатирована у 20 (28%) больных, 2-я и более – у 41 (58%), рецидивы заболевания – у 10 (14%). Трансплантации от родственных доноров выполнены 31, от неродственных доноров – 40 больным. В качестве источника трансплантата у 38 (54%) больных использован костный мозг, СКК у 23 (32%), пуповинные клетки у 10 (14%). У 68 (97%) из 71 больных в среднем на +18-й день (8–84-й день) констатировано приживание трансплантата; 2 пациента умерли на +15-й и +38-й дни от инфекционных осложнений; 3-летняя общая выживаемость составила 51 ± 6%, 3-летняя бессобытийная выживаемость составила 39 ± 6%. Описанное исследование показало отсутствие токсических эффектов, неплохие показатели выживаемости. Однако практически у 47 ± 6% больных в течение 3 лет, последующих после трансплантации, развился рецидив заболевания.

Группой GMALL [23] представлены результаты алло-ТГСК с использованием треоосульфана в режиме кондиционирования у взрослых больных ОЛЛ, которым было невозможно выполнить тотальное облучение тела. Наряду с другими исследованиями показана низкая токсичность треоосульфансодержащего режима кондиционирования. Ранняя летальность у этих больных была низкой, но отмечена довольно высокая частота рецидивов: у 36% в течение 1-го года и у 51% в течение 2 лет после трансплантации.

Анализируя данные литературы [18–24], можно заключить, что результаты применения треоосульфана в режимах

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Фаза заболевания	Кариотип	Число больных			
		ОМЛ	ОЛЛ	МПЗ	МДС
1-я полная ремиссия	Нормальный	4	—	2	1
	трисомия 8	1	—	—	—
	t(9;22)	1	3	—	—
	t(3;5)	1	—	—	—
	MLL	—	1	—	—
2-я полная ремиссия	Нормальный	1	1	—	—
3-я полная ремиссия	t(9;22)	—	1	—	—
Рецидив	t(8;21)	1	—	—	—

кондиционирования весьма противоречивы особенно у взрослых больных.

Цель нашего исследования – оценка токсичности и эффективности использования треосульфана в режиме предтрансплантационного кондиционирования у взрослых больных гемобластомами из группы высокого риска. Режим с треосульфаном мы рассматривали как миелоаблативный с пониженной токсичностью.

Материал и методы

За период 2013–2015 гг. в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (ГНЦ, Москва) всего проведено 126 алло-ТГСК, из них 18 выполнено после кондиционирования в режиме треосульфан 36 г/м² + циклофосфамид 120 мг/м². Длительность предтрансплантационного кондиционирования составила 6 дней. Треосульфана вводили в течение первых 3 дней кондиционирования в дозе 12 г/м² в сутки (суммарная доза составила 36 г/м²) в -6, -5, -4-й дни. Циклофосфан в дозе 60 мг/кг в сутки (суммарная доза 120 мг/кг) вводили -3, -2-й дни алло-ТГСК.

Алло-ТГСК выполнена у 9 больных ОМЛ, у 6 ОЛЛ. У 2 больных диагностированы хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ), у 1 – миелодиспластический синдром (рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией). Медиана возраста больных составила 27 лет (от 19 до 40), из них 8 мужчин и 10 женщин. Большинство больных остраты лейкозами были отнесены к группе высокого риска (те, которым трансплантацию выполнили не в 1-й ремиссии, в рецидиве, а также больные с неблагоприятными цитогенетическими аномалиями). У 3 больных алло-ТГСК выполняли во 2-й или 3-й ремиссии заболевания, у 1 больного ОМЛ – в рецидиве заболевания. Цитогенетические нарушения выявлены у 4 больных ОМЛ, из них t(9;22) у 1, t(3;5) у 1, t(8;21) у 1, трисомия 8 у 1. У 4 больных ОЛЛ была выявлена t(9;22), у 1 больного ОЛЛ – перестройка гена *MLL* (табл. 1).

Трансплантация от родственного донора выполнена у 7 больных, от неродственного донора – у 6, от частично совместимого неродственного донора – у 5. У 2 больных ХМПЗ проведена вторая алло-ТГСК с треосульфаном в режиме предтранспланта-

ционного кондиционирования в связи с отторжением трансплантата. В качестве источника трансплантата у 13 больных использовали костный мозг, у 5 – СКК.

Иммуносупрессивную терапию циклоспорином А в сочетании с микрофенолатом мофетилем или метотрексатом проводили 12 больным. У 6 больных использовали циклофосфан после трансплантации (ПТ-ЦФ): 3 вводили циклофосфан в дозе 50 мг/кг в сутки на +3, +4-й дни, 3 – циклофосфан в начальной дозе 3 мг/кг в сутки и микрофенолата мофетил в дозе 3 г в сутки.

Проявления токсичности оценивали по критериям Common Toxicity Criteria (CTC NCIC) [25], где 1-я степень – малая токсичность, 2-я степень – средняя токсичность, 3-я степень – тяжелая токсичность, 4-я степень – угрожающая жизни токсичность.

За восстановление кроветворения после алло-ТГСК считали достижение уровня лейкоцитов $1,0 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов $20 \times 10^9/\text{л}$ при отсутствии зависимости от трансфузионной терапии. Оценку химеризма проводили по молекулярной (процентное соотношение ДНК реципиента и донора) и цитогенетической (процентное соотношение XX- и XY-хромосом при различии пола реципиента и донора) меткам. Смешанный химеризм предполагал наличие 5% и более маркеров «хозяйского кроветворения». За отторжение трансплантата мы считали обнаружение 50% и более маркеров «собственного кроветворения».

Статистическую значимость различий выживаемости и кумулятивной вероятности рассчитывали по методу Каплана–Майера.

Результаты

Рассматривая режим кондиционирования треосульфан 36 г/м² + циклофосфан 120 мг/м² (ТреоСу) как миелоаблативный, настоящее исследование выполнено у молодых больных гемобластомами (медиана возраста 27 лет) из группы высокого риска.

При оценке токсичности не выявили серьезных осложнений ни во время кондиционирования, ни на ранних сроках после трансплантации. У 13 (72%) больных наблюдались тошнота/рвота, у 16 (88%) – мукозит 1–2-й степени тяжести, у 3 (16,6%) отмечена 3-я степень тяжести. У 15 (83%) из 18 больных отмечена диарея, у 8 (44%) – незначительное повышение печеночных трансаминаз (табл. 2). Однако нельзя с уверенностью относить эти осложнения только к проявлениям токсичности в виду того, что мукозит, энтеропатия и другие осложнения зачастую были проявлением доказанных инфекционных процессов.

Восстановление показателей периферической крови у этих больных констатируется в среднем на +23-й день (разброс 11–30 дней) после трансплантации.

При обследовании на +30-й день у 12 (66,7%) из 18 больных определялся 100% «донорский химеризм», у 4 (22,2%) – смешанный, у 2 (11%) отмечено восстановление собственного кроветворения.

У 3 больных со 100% донорским кроветворением на +30-й и +60-й дни после трансплантации наблюдался «прирост» собственного кроветворения, а в последующем на +90-й день констатируется отторжение трансплантата. На +60-й день «полная донорская химера» сохранялась только у 9 больных. У 2 больных со смешанным кроветворением на +30-й день зарегистрировано отторжение трансплантата на +60-й день.

На +90-й день полное донорское кроветворение сохранялось только у 8 (44%) больных. У 2 больных наблюдалась «убывающая донорская химера» (нарастание собственного кроветворения по сравнению с предыдущим исследованием). Еще у 4 (22%) больных на +90-й день отмечено восстановление собственного кроветворения.

Таким образом, у 8 (44,4%) из 18 больных зафиксировано отторжение трансплантата на +90-й день алло-ТГСК (табл. 3).

Ранняя летальность (в первые 100 дней после ТГСК) не была зафиксирована. Из 18 больных

Таблица 2

Токсичность режима кондиционирования с треосульфаном

Токсичность	Число больных с проявлениями токсичности разной степени				
	1-я степень	2-я степень	3-я степень	4-я степень	суммарно
Тошнота/рвота	3 (16,6%)	8 (44,4%)	2 (11%)	0	13 (72%)
Мукозит/стоматит	8 (44,4%)	5 (27,7%)	3 (16,6%)	0	16 (88,9%)
Креатинин	0	0	0	0	0
ALT/AST	2 (11%)	2 (11%)	4 (22,2%)	0	8 (44,4%)
Билирубин	3 (16,6%)	0	0	0	3 (16,6%)
Диарея	8 (44,4%)	5 (27,7%)	0	1 (5,5%)	14 (77,8%)
Периферическая полинейропатия	0	0	0	0	0
Веноокклюзионная болезнь	0	0	0	0	0

Таблица 3

Химеризм на разных сроках после трансплантации

День исследования после ТГСК	Число исследований	100% донорское кроветворение		Смешанное кроветворение		Отторжение	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
+30-й	18	12	66	4	22	2	11
+60-й	18	9	50	5	27	4	22
+90-й	18	8	44	2	11	8	44,4

умерли 4 (22,2%). Причиной смерти стали: рецидив заболевания у больного Ph⁺ ОЛЛ на +7-м мес; у 2 больных ОМЛ и ОЛЛ развитие оРТПХ на +4, +5-м мес, 1 больной Ph⁺ ОЛЛ умер в результате инфекционных осложнений на +6-м мес.

Обсуждение

Выбор режима кондиционирования перед алло-ТГСК зависит от таких факторов, как возраст пациента, соматический статус, вариант заболевания и принадлежность к группе риска, статус болезни (ремиссия/рецидив) на момент трансплантации. Молодым больным гемобластозами с высоким риском рецидива заболевания требуется проведение массивной циторедуктивной терапии перед алло-ТГСК. Учитывая тот факт, что предтрансплантационная терапия часто сопровождается развитием осложнений, непосредственно связанных именно с проведенным кондиционированием и соответственно утяжеляет течение раннего посттрансплантационного периода иногда вплоть до летального исхода, проводятся попытки именно минимизировать риски развития осложнений, связанных с проведением кондиционирования перед алло-ТГСК. Опираясь на данные литературы и собственный опыт проведения стандартных миелоаблативных программ, мы использовали треоосульфатсодержащий режим как миелоаблативный и пониженной токсичности у обследованной группы больных.

Проводя параллель со стандартным миелоаблативным режимом ВuCu, при использовании которого известны тяжелые осложнения, связанные с токсичностью, мы не зафиксировали ни одного случая ВОБ, проявлений нейротоксичности, тяжелых поражений внутренних органов (печени, почек, легких, миокарда), что наряду с другими исследованиями может говорить о режиме ТгеоСу как о режиме с пониженной токсичностью.

Используя ТгеоСу в качестве миелоаблативной программы, мы столкнулись с высоким риском отторжения трансплантата: у больных ОМЛ 33,3%, ОЛЛ 58,3% (рис. 1) и получили высокую долю (44,4%) отторжения трансплантата. N. Kröger и соавт. [24] в своем исследовании также не получили 100% «донорского кроветворения» после алло-ТГСК с треоосульфатсодержащим режимом кондиционирования у больных старшей возрастной группы (медиана возраста 60 лет) с миелодиспластическими синдромами (МДС) и вторичными ОМЛ. Только у 13 (59,1%) из 22 больных в среднем на +34-й день (разброс от 19 до 209 дней) констатировано 100% донорское кроветворение.

При этом в ранее проведенном исследовании [26], в котором при выполнении алло-ТГСК у больных из аналогичной

Вероятность отторжения

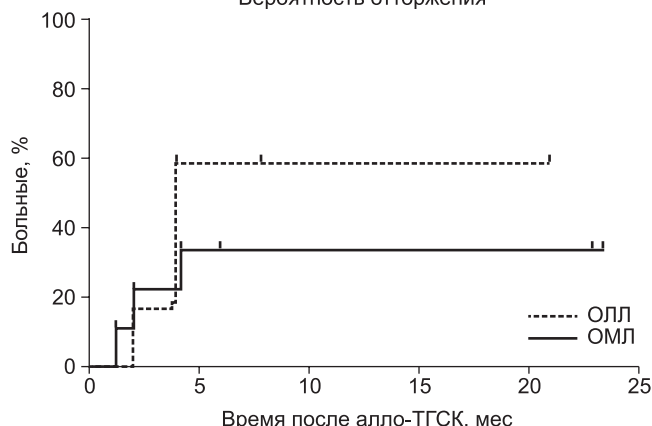


Рис. 1. Риск развития отторжения трансплантата у больных гемобластозами после кондиционирования ТгеоСу и последующей алло-ТГСК.

группы со стандартным режимом кондиционирования ВuCu не была отмечена столь высокая частота отторжений трансплантата: у больных ОМЛ наблюдалось полное приживление трансплантата, у 2 (7%) из 44 больных ОЛЛ констатировано отторжение трансплантата.

Выделяют ряд факторов риска отторжения трансплантата, таких как, например, источник трансплантата. Риск развития первичного неприживления или отторжения трансплантата увеличивается в случае использования костного мозга в качестве источника трансплантата. Также в число факторов риска включается совместимость донор/реципиент, вариант гематологического заболевания (выше риск отторжения у больных хроническими миелоэритроидными заболеваниями — МПЗ, из группы МДС/МПЗ), возраст больных моложе 30 лет, режим кондиционирования (миелоаблативный режим кондиционирования с включением тотального облучения/циклофосфана снижают риск развития отторжения трансплантата) [27].

В нашем исследовании на +3-м месяце после трансплантации зафиксировано отторжение трансплантата у 8 (44,4%) из 18 молодых больных острым лейкозом, а также у больных МПЗ/МДС (у 100%). Родственная трансплантация выполнена у 3 больных: у 1 ОМЛ, у 2 МПЗ/МДС, неродственная трансплантация — у 5 из 8, из них полная совместимость между донором и реципиентом была у 2 больных (табл. 4). В качестве источника трансплантата у 6 (33%) из 8 больных использовали костный мозг. Поскольку группа больных в нашем исследовании немногочисленна, то статистически значимо определить влияние каждого из факторов риска на вероятность отторжения трансплантата крайне затруднительно. Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований, вероятно, с включением большего числа больных.

Полученные в нашем исследовании результаты 2-летней общей выживаемости у больных ОМЛ 77,8%, ОЛЛ 66,7%, 2-летней бессобытийной выживаемости в группе ОМЛ 44,4%, ОЛЛ — 41,7% сопоставимы с зарубежными исследованиями [23, 24, 28–30] (рис. 2, 3). При использовании треоосульфата в режимах предтрансплантационного кондиционирования разные исследователи сообщают о рецидивах заболевания у 20–30% больных в течение 2 лет после трансплантации [24, 28–30]. Мы получили сопоставимый с другими исследованиями показатель рецидивов заболевания после алло-ТГСК, который составил 27,7%: 2 клинко-гематологических рецидива (у 1 боль-

Таблица 4

Характеристика кроветворения у больных в +90-й день после алло-ТГСК

Кроветворение	Число исследований	Родственный донор		Неродственный полностью совместимый донор		Неродственный частично-совместимый донор	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Полный донорский химеризм	18	2	11	4 (%)	22	2 (%)	11
Смешанный химеризм	18	2	11	—	—	—	—
Отторжение трансплантата	18	3	16,6	2	11	3	16,6

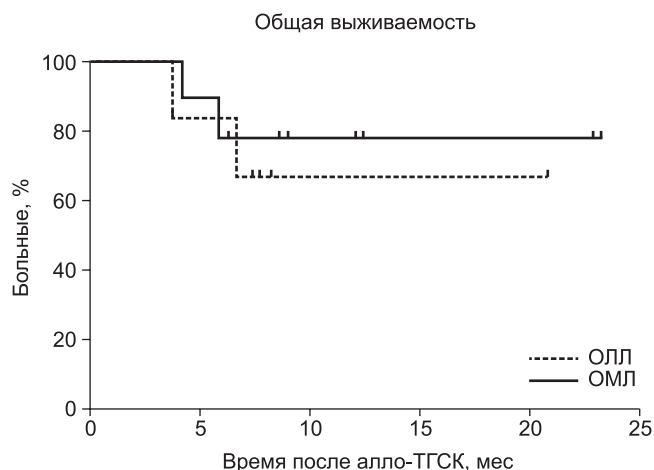


Рис. 2. 2-Летняя общая выживаемость больных ОМЛ и ОЛЛ после алло-ТГСК.

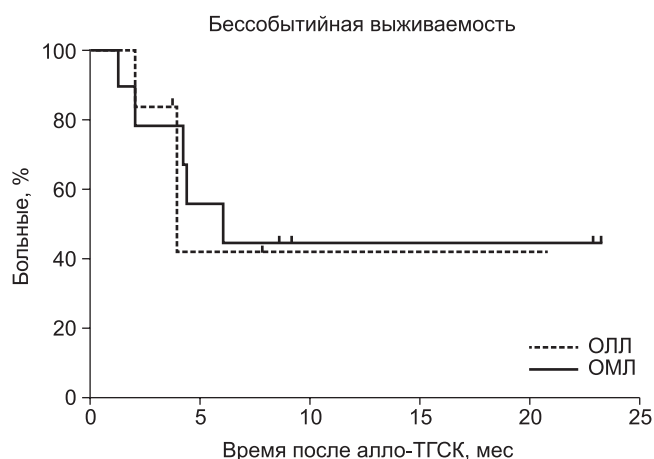


Рис. 3. 2-Летняя бессобытийная выживаемость больных ОМЛ и ОЛЛ после алло-ТГСК.

ного ОМЛ через +6 мес, у 1 больного Ph⁺ ОЛЛ через +7 мес), у 2 больных Ph⁺ ОЛЛ наблюдался молекулярный рецидив через 5 и 7 мес, у 1 больного ОЛЛ –экстремедулярный рецидив через 8 мес после алло-ТГСК.

Таким образом, с одной стороны, исследование показало несомненную низкую токсичность режима TreoCy, а также неплохие показатели общей выживаемости у больных гемобластозами из группы высокого риска. С другой стороны, получили высокий процент отторжения трансплантата и рецидивов заболевания, что в совокупности представляет совсем не оптимистичные результаты.

После выполненного исследования мы рассматриваем режим предтрансплантационного кондиционирования треосульфана 36 г/м² + циклофосфан 120 мг/м² как режим пониженной токсичности, но не как миелоаблативный. По всей видимости, высокая эффективность этого режима кондиционирования, отмечаемая в зарубежных публикациях, связана с его применением у селективной группы больных, с врожденными иммунодефицитами или другими незлокачественными заболеваниями.

Вероятно, использование кондиционирования с треосульфатом оправдано у больных старшей возрастной группы, пациентов с тяжелой сопутствующей патологией, а также в тех случаях, когда планируется проведение повторной алло-ТГСК, т.е. у больных, которым миелоаблативный режим не может быть выполнен из-за противопоказаний, а режим пониженной интенсивности не обеспечивает достаточной миелоабляции. Однако для подтверждения этого необходимо проведение дальнейших исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Мелкова К.Н., Петрова Г.Д. Материалы 41-го конгресса Европейского общества по трансплантации костного мозга (март 2015 г., Стамбул). *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2015; 8(3): 343–52.
- Субботина Н.Н., Попа А.В., Долгополов И.С., Бояршинов В.К., Пименов Р.И., Дайлидите В.В. и др. Некоторые аспекты трансплантации костного мозга у пациентов с крайне неблагоприятным прогнозом острого лимфобластного лейкоза: обзор литературы и собственное наблюдение. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2015; 8(3): 331–6.
- Семенова Е.В., Станчева Н.В., Алянский А.Л., Бабенко Е.В., Вавилов В.Н., Морозова Е.В. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток с режимами кондиционирования со сниженной интенсивностью доз у детей и подростков с прогностически неблагоприятными формами острого лимфобластного лейкоза. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2011; 6(4): 19–26.
- Бояршинов В.К. Применение треосульфана в детской онкологии. *Эффективная фармакотерапия*. 2010; 5(22): 36–7.
- Савченко В.Г., Любимова Л.С., Паровичникова Е.Н., Менделеева Л.П., Момотюк К.С., Демидова И.А. и др. Трансплантация аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта). *Терапевтический архив*. 2007; 79(7): 30–5.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Santos G.W., Tutschka P.J., Brookmeyer R., Saral R., Beschoner W.E., Bias W.B., et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with Busulfan and Cyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.* 1983; 309(22): 1347–53. doi:10.1056/NEJM198312013092202.
- Tutschka P.J., Copelan E.A., Klein J.P. Bone marrow transplantation for leukemia following a new Busulfan and Cyclophosphamide regimen. *Blood*. 1987; 70(5): 1382–8.
- Qiao J., Huang Y., Xia Y., Chu P., Yao H., Xu L., et al. Busulfan and cyclophosphamide induce liver inflammation through NLRP3 activation in mice after hematopoietic stem cell transplantation. *Sci. Rep.* 2015; 5: 17828. doi: 10.1038/srep17828.
- Morgan M., Dodds A., Atkinson K., Szer J., Downs K., Biggs J. The toxicity of busulphan and cyclophosphamide as the preparative regimen for bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 1991; 77(4): 529–34.
- Melkova K.N., Petrova G.D. The materials of the 41st Congress of the European society for blood and marrow transplantation (March 2015, Istanbul). *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2015; 8(3): 343–52. (in Russian)
- Subbotina N.N., Popa A.V., Dolgoplov I.S., Boyarshinov V.K., Pimenov R.I., Dailidite V.V., et al. Bone marrow transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia with extremely poor prognosis: literature review and case report. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2015; 8(3): 331–6. (in Russian)
- Grochow L.B., Jones R.J., Brundrett R.B., Braine H.G., Chen T.L., Saral R., et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 25(1): 55–61.
- Shulman H.M., Hinterberger W. Hepatic veno-occlusive disease–liver toxicity syndrome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 10(3): 197–214.
- Fan C.Q., Crawford J.M. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2014; 4(4): 332–46. doi: 10.1016/j.jceh.2014.10.002
- Hassan M., Ljungman P., Ringden O., Hassan Z., Oberg G., Nilsson C., et al. The effect of busulphan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(9): 915–24. doi:10.1038/sj.bmt.1702377.
- Rozman C., Carreras E., Qian C., Gale R.P., Bortin M.M., Rowlings P.A., et al. Risk factors for hepatic veno-occlusive disease following HLA-identical sibling bone marrow transplants for leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17(1): 75–80.
- Gundurthi A., Garg M.K., Nair V., Pakhetra R., Das S., Sharma S., et al. Endocrine complications after busulphan and cyclophosphamide based hematopoietic stem cell transplant: A single tertiary care centre experience. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2013; 17(5): 855–63.
- Nath C.E., Earl J.W., Pati N., Stephen K., Shaw P.J. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to paediatric blood or marrow transplant recipients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2008; 66(1): 50–9. doi: 10.1111/j.1365-2125.2008.03166.x.
- Seменова Е.В., Станчева Н.В., Алянский А.Л., Бабенко Е.В., Вавилов В.Н., Морозова Е.В., et al. Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation with reduced intensity conditioning regimen in children and adolescents with unfavorable forms of acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2011; 6(4): 19–26. (in Russian)
- Ustun C., Courville E.L., DeFor T., Dolan M., Randall N., Yohe S., et al. Myeloablative, but not reduced-intensity, conditioning overcomes the nega-

- tive effect of flow-cytometric evidence of leukemia in acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2016; 22(4): 669–75. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.10.024.
16. Boyarshinov V.K. The use of treosulfan in pediatric oncology. *Effective pharmacotherapy. Russian journal (Effektivnaya farmakoterapiya)*. 2010; 5(22): 36–7. (in Russian)
17. Romanski M., Urbaniak B., Kokot Z., Glowka F.K.. Activation of prodrug treosulfan at pH 7.4 and 37°C accompanied by hydrolysis of its active epoxides: kinetic studies with clinical relevance. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104(12): 4433–42. doi: 10.1002/jps.24662.
18. Casper J., Knauf W., Kiefer T., Wolff D., Steiner B., Hammer U., et al. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2004; 103(2): 725–31. doi:10.1182/blood-2002-11-3615.
19. Baronciani D., Depau C., Targhetta C., Derudas D., Culurgioni F., Tandurella I., et al. Treosulfan-fludarabine-thiotepa conditioning before allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for patients with advanced lympho-proliferative disease. *Hematol. Oncol.* 2016; 34(1): 17–21. doi: 10.1002/hon.2187.
20. Boztug H., Sykora K.W., Slatter M., Zecca M., Veys P., Lankester A., et al. European Society for Blood and Marrow Transplantation analysis of treosulfan conditioning before hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with hematological malignancies. *Pediatr. Blood Cancer.* 2016; 63(1): 139–48. doi: 10.1002/pbc.25764.
21. Greystoke B., Bonanomi S., Carr T.F., Gharib M., Khalid T., Coussons M., et al. Treosulfan-containing regimens achieve high rates of engraftment associated with low transplant morbidity and mortality in children with non-malignant disease and significant co-morbidities. *Br. J. Haematol.* 2008; 142(2): 257–62. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07064.x.
22. Boztug H., Zecca M., Sykora K.W., Veys P., Lankester A., Slatter M., et al.; on behalf of the EBMT paediatric diseases working party. Treosulfan-based conditioning regimens for alloHSCt in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Ann. Hematol.* 2015; 94(2): 297–306. doi: 10.1007/s00277-014-2196-8.
23. Kröger N., Bornhäuser M., Stelljes M., Pichlmeier U., Trensche R., Schmid C., et al. Allogeneic stem cell transplantation after conditioning with treosulfan, etoposide and cyclophosphamide for patients with ALL: a phase II-study on behalf of the German Cooperative Transplant Study Group and ALL Study Group (GMALL). *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(12): 1503–7. doi: 10.1038/bmt.2015.202.
24. Kröger N., Shimoni A., Zabelina T., Schieder H., Panse J., Ayuk F., et al. Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Bone Marrow Transplantation.* 2006; 37(4): 339–44. doi: 10.1038/sj.bmt.1705259.
25. Cancer Therapy Evaluation Program. Common Toxicity Criteria, Version 2.0. DCTD, NCI, NIH, DHHS March 1998. https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcmanual_v4_10-4-99.pdf#search=%22TOXICITY%20CRITERIA%22
26. Savchenko V.G., Lyubimova L.S., Parovichnikova E.N., Mendeleva L.P., Momotyuk K.S., Demidova I.A., et al. Transplantations of allogeneic and autologous hemopoietic stem cells in acute leukemia (results of 20-year experience). *Therapeutic archive. Russian journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2007; 79(7): 30–5. (in Russian)
27. Olsson R.F., Logan B.R., Chaudhury S., Zhu X., Akpek G., Bolwell B.J., et al. Primary Graft Failure after Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Hematologic Malignancies. *Leukemia.* 2015; 29(8): 1754–62. doi: 10.1038/leu.2015.75.
28. Nemecek E.R., Guthrie K.A., Sorror M.L., Wood B.L., Doney K.C., Hilger R.A., et al. Conditioning with treosulfan and fludarabine followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk hematologic malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(3): 341–50. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.05.007.
29. Casper J., Holowiecki J., Trensche R., Wandt H., Schaefer-Eckart K., Ruutu T., et al. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with AML following treosulfan/fludarabine conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47(9): 1171–7. doi: 10.1038/bmt.2011.
30. Beelen D.W., Trensche R., Casper J., Freund M., Hilger R.A., Scheulen M.E., et al. Dose-escalated treosulfan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications. *Bone Marrow Transplantation.* 2005; 35(3): 233–41. doi: 10.1038/sj.bmt.1704784.

Поступила 23.10.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.441-085.277.3-06:616.61-099]-074

Дорохина Е.И., Магомедова А.У., Куликов С.М., Бирюкова Л.С.,
Кременецкая А.М., Воробьев А.И., Кравченко С.К.

ОТДАЛЕННАЯ НЕФРОТОКСИЧНОСТЬ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПО МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПРОГРАММЕ mNHL-BFM-90 У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ ДИФфуЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Цель исследования – оценка отдаленной нефротоксичности высокодозной химиотерапии по модифицированной программе NHL-BFM-90 (mNHL-BFM-90) у взрослых больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (В-ККЛ). Проанализированы результаты клинического обследования и лабораторных исследований крови и мочи 40 больных диффузной В-ККЛ (20 мужчин и 20 женщин), которым проведена терапия по программе mNHL-BFM-90 в Гематологическом научном центре (ГНЦ, Москва) в период с 2002 по 2009 г. В группу сравнения вошли 19 больных (8 мужчин и 11 женщин), получивших терапию по программе CHOP/R-CHOP в тот же период. Медиана срока наблюдения после окончания лечения 6 лет. Лабораторные исследования крови и мочи в обеих группах выполняли перед началом химиотерапии и в момент исследования, т.е. через 5 лет и более после окончания химиотерапии. Из 40 больных диффузной В-ККЛ основной группы признаки хронической болезни почек выявлены у 32 (80%) против 12 (63%) группы сравнения, из них у 2 (5%) отмечалось снижение суточного клиренса креатинина. Частота нефротоксических осложнений терапии mNHL-BFM-90 была значимо выше таковой программы CHOP/R-CHOP. Проведение высокодозной химиотерапии у 10 (25%) больных осложнилось острой почечной недостаточностью (ОПН) (однако из всех 86 больных, которым было выполнено высокодозное лечение с 2002 по 2009 г. ОПН перенесли 12%), из них двум больным потребовалось выполнение гемодиализа в отличие от группы стандартной химиотерапии ($p = 0,01$). В отдаленном периоде наблюдений статистически значимых различий по нефротоксическим проявлениям в сравниваемых группах не получено.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома; протокол mNHL-BFM-90; отдаленная токсичность; нефротоксичность.

Для цитирования: Дорохина Е.И., Магомедова А.У., Куликов С.М., Бирюкова Л.С., Кременецкая А.М., Воробьев А.И., Кравченко С.К. Отдаленная нефротоксичность высокодозной химиотерапии по модифицированной программе NHL-BFM-90 у взрослых больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 177-183. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-177-183>

Dorokhina E.I., Magomedova A.U., Kulikov S.M., Biryukova L.S., Kremenetskaya A.M., Vorobiev A.I., Kravchenko S.K.

LATE NEPHROTOXICITY OF MODIFIED PROGRAM NHL-BFM-90 IN ADULT PATIENTS POOR PROGNOSIS OF DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

To evaluate late nephrotoxicity of modified program NHL-BFM-90 (mNHL-BFM-90) in adult patients with poor-prognosis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The data of laboratory tests of blood and urine of 40 patients (20 men and 20 women) with DLBCL treated during 2002–2009 years with modified NHL-BFM-90 protocol were analyzed. Comparison group included 19 patients (8 men and 11 women) treated with CHOP or R-CHOP. The median observation period after chemotherapy was 6 years. Laboratory tests of blood and urine were performed before chemotherapy and in 5 years after treatment. Results. Chronic kidney diseases were found in 32 (80%) patients treated with mNHL-BFM-90 vs in 12 (63%) treated with CHOP/R-CHOP. Only 2 (5%) patients had decreased creatinine clearance. The frequency of nephrotoxic complications was significantly higher in patients treated with mNHL-BFM-90 than with CHOP/R-CHOP. Treatment with high-dose chemotherapy was complicated by acute renal failure in 10 (25%) patients, 2 (20%) patients required hemodialysis in comparison with patients treated with standard chemotherapy ($p = 0.01$). However, in the long term observations there were no significant differences in the nephrotoxic complications between two groups.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma; mNHL-BFM-90 protocol; late toxicity; nephrotoxicity.

For citation: Dorokhina E.I., Magomedova A.U., Kulikov S.M., Biryukova L.S., Kremenetskaya A.M., Vorobiev A.I., Kravchenko S.K. Late nephrotoxicity of modified program NHL-BFM-90 in adult patients poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Gematologiya i transfuziologiya (Hematology and Transfusiology, Russian journal)*. 2016; 61(4): 177-183. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-177-183>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11 December 2015

Accepted 08 September 2016

Высокодозная химиотерапия (ВХТ) приобретает все большее значение для лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы (В-ККЛ) взрослых больных. Терапия R-CHOP позволяет достичь общей 5-летней выживаемости до 50%. Тактика применения высокодозных программ в 1-й линии терапии в прогностически неблагоприятной группе больных позволяет существенно улучшить результаты лечения. Применение высокодозной модифицированной программы NHL-BFM-90 (mNHL-BFM-90) для лечения больных диффузной В-ККЛ с факторами неблагоприятного прогноза в Гематологическом научном центре (ГНЦ, Москва) позволило достичь 9-летней безрецидивной выживаемости (БРВ) 86% и 9-летней общей выживаемости (ОВ) 65% [1]. К факторам неблагоприятного прогноза были отнесены: массивное опухолевое поражение (размеры опухоли более 7,5 см), III–IV стадии заболевания по Энн-Эрбор и концентрация ЛДГ выше нормы [1].

В связи с высокой эффективностью mNHL-BFM-90 в лечении взрослых больных диффузной В-ККЛ, в том числе и больных старше 60 лет, актуальным вопросом является изучение ее токсичности [1–3].

Острая токсичность этой программы, развивающаяся сразу или через несколько дней после введения препаратов, частично освещена отечественными исследователями [1–6]. Нейротоксичность, по данным некоторых авторов [1, 2, 4–6],

наряду с миелотоксичностью является наиболее значимой в общей структуре токсичности.

Механизмы развития нефротоксичности в основном обусловлены синдромом массивного цитолиза опухоли, замедлением элиминации химиопрепаратов, а также их прямым токсическим воздействием.

В связи с увеличением продолжительности жизни больных после перенесенной терапии по данной программе интересным и значимым представляется вопрос отдаленной нефротоксичности, развивающейся через несколько лет после завершения лечения, возможности восстановления функции почек в отдаленном периоде после окончания химиотерапии (ХТ).

Ряд препаратов, входящих в программу mNHL-BFM-90, обладает в той или иной степени нефротоксичностью (ифосфамид, циклофосфан, метотрексат) [7–9].

Индуктировать изменения в почках, помимо цитостатических препаратов, могут также нефротоксичные антибиотики, противовирусные и противогрибковые препараты, применяемые для лечения инфекционных осложнений [10–14].

Механизм нефротоксичности ифосфамида заключается в повреждении проксимальных отделов канальцев метаболизмом (хлорацетальдегид), а также в повреждении митохондрий в клетках канальцев и их энергетическом истощении. Ифосфамид нередко является причиной комбинированного повреждения клубочков и канальцев нефрона. Отдаленные нефротоксические эффекты ифосфамида могут быть представлены как гломерулярной токсичностью – снижением скорости клубочковой фильтрации, так и канальцевой токсичностью – дистальным канальцевым ацидозом, гипофосфатемией, гипокалиемией, гипомагниемией, синдромом Фанкони (приобретенной диффузной дисфункцией проксимальных извитых почечных канальцев в сочетании с генерализованной гиперинамиоацидурией, глюкозурией, гиперфосфатурией). Нейротоксичность ифосфамида дозозависима. Кумулятивная доза 45 г/м² является основным фактором риска развития нефротоксичности. По данным разных авторов [7–9], частота хронического повреждения клубочков при применении ифосфамида колеблется от 1,4 до 30%.

Циклофосфамид обладает прямым повреждающим воздействием на систему мочевого выделения, может вызывать геморрагический цистит, а также повышение уровня антидиуретического гормона, который является физиологическим

Для корреспонденции:

Дорохина Елена Игоревна, научный сотрудник научно-клинического отделения химиотерапии гематологических заболеваний со стационаром дневного пребывания ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: dorokhina.ei@mail.ru.

For correspondence:

Dorokhina Elena I., MD, PhD, researcher Hematological Research Center, Moscow, 125167, Russia. E-mail: dorokhina.ei@mail.ru.

Information about authors:

Dorokhina E.I., <http://orcid.org/0000-0002-5795-170X>; Magomedova A.U., <http://orcid.org/0000-0003-4263-8275>; Kulikov S.M., <http://orcid.org/0000-0001-6260-2363>; Biryukova L.S., <http://orcid.org/0000-0003-1098-8406>; Vorobiev A.I., <http://orcid.org/0000-0003-2531-1561>; Kravchenko S.K., <http://orcid.org/0000-0002-6778-997X>.

регулятором выведения воды почками и за счет увеличения реабсорбции приводит к гиперволемии, а также к разведению плазмы крови (понижению осмолярности и гипонатриемии) [7–9].

Механизм нефротоксичности метотрексата заключается в преципитации химиопрепарата и его метаболита (7-гидроксиметотрексата) в канальцах почек вследствие нерастворимости метотрексата и его метаболита в моче. Для метотрексата более характерна острая токсичность, которая встречается у 12,4% больных. Доза препарата, способная вызвать острую почечную дисфункцию, более 1 г/м² [7–9]. Основным механизмом цитотоксического воздействия метотрексата является конкурентное ингибирование дегидрофолатредуктазы, способствующей регенерации тетрагидрофолатов, необходимых для синтеза пуринов и пиримидинов из неактивных дигидрофолатов, что ведет к блокаде клеточного цикла в активно пролиферирующих клетках [15]. Метилирование тетрагидрофолата до 5-метилентетрагидрофолата, необходимого для синтеза метионина из гомоцистеина, происходит с помощью фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР). Снижение количества этого фермента, связанное с полиморфизмом и низкой активностью гена *МТГФР* (ТТ-генотип), у некоторых больных, по данным литературы, приводит к увеличению токсичности метотрексата [16, 17], в том числе и нефротоксичности [18].

Винкристин аналогично циклофосфану способен вызывать повышение уровня антидиуретического гормона и как следствие – гипонатриемию [8].

Кроме того, противоопухолевые препараты, такие как винкристин, антрациклиновые антибиотики, цитарабин, эпозид, могут способствовать увеличению преципитации уратов и фосфатов кальция в мочевыводящей системе.

Аминогликозиды, амфотерицин В оказывают токсическое воздействие на эпителий канальцев. Адикловир, цефалоспорины, пенициллины, ванкомицин, фторхинолоны способны вызвать острый интерстициальный нефрит [19].

Одним из важных механизмов развития нефротоксичности при лечении агрессивных опухолей является синдром массивного распада опухоли, который развивается у больных гемобластомами с высокой пролиферативной активностью и большой массой опухоли. Быстрый распад большого количества опухолевых клеток приводит к увеличению концентрации калия, фосфатов, мочевой кислоты в крови, что может привести к острой почечной недостаточности (ОПН) вследствие осаждения уратов и фосфата кальция в почечных канальцах [7].

Клинические проявления нефротоксичности зависят от локализации повреждения. Например, поражение клубочков может приводить к хронической болезни почек и нефросклерозу. При токсическом повреждении проксимальных канальцев нарушается процесс реабсорбции электролитов (фосфаты, ионы магния), обширное вовлечение канальцев может приводить к развитию синдрома Фанкони, появлению гипофосфатемического диатеза и проксимального тубулярного ацидоза. Дисфункция дистальных канальцев сопровождается нарушением концентрации и закислением мочи, что проявляется развитием нефрогенного диабета и дистального тубулярного ацидоза. Кроме того, к симптомам нарушений почечной функции относятся уменьшение продукции 1,25-дигидроксивитамина D₃, гипертензия, анемия и изменение метаболизма и выведения лекарственных препаратов [20].

Факторами риска развития постцитостатической нефропатии являются кумулятивная доза химиопрепарата (общая доза препарата, накопленная за все полученные курсы терапии), режимы введения, сочетание нескольких нефротоксичных препаратов, наличие сопутствующей патологии почек и мочевыводящих путей и опухолевой инфильтрации [21].

К общим факторам риска при воздействии всех нефротоксинов относятся возраст старше 60 лет, наличие почечной недостаточности до назначения препарата, гиповолемия, воздействие нескольких нефротоксинов одновременно, наличие

сахарного диабета, сердечной недостаточности и сепсиса [19].

Отдаленная нефротоксичность ВХТ, в том числе и программы NHL-BFM-90, хорошо изучена у детей в отличие от взрослых.

З. Кауа и соавт. [22] изучали восстановление почечной функции у 42 детей, больных острым лимфобластным лейкозом, перенесших терапию по программе NHL-BFM-95, и показали, что через 6 мес после окончания терапии у 33% наблюдалась клубочковая и канальцевая дисфункция, через 3 года у 20%, через 6 лет у 5–8%. В результате был сделан вывод, что острую нефротоксичность, хотя и регистрируют после проведенной ВХТ, но в отдаленном периоде не отмечали.

М. Grönroos и соавт. [23] в работе по изучению отдаленных последствий применения высоких доз метотрексата у детей, больных острым лимфобластным лейкозом и лимфомами, показали, что лечение высокими дозами метотрексата вызывает стойкое снижение скорости клубочковой фильтрации и может вызывать альбуминурию через несколько лет после окончания лечения.

Отдаленную нефротоксичность ифосфамида у детей изучали О. Oberlin и соавт. [24]. Медиана наблюдения в их исследовании составила 10 лет, медиана кумулятивной дозы ифосфамида – 54 г/м². Исследована почечная функция у 183 больных, из них у 164 (89,5%) выявлена нормальная канальцевая функция почек, нормальная клубочковая функция у 143 (78,5%), гипомagnesемия у 2 (1,2%), гипофосфатемия у 2 (1%), глюкозурия у 62 (37%), протеинурия у 22 (12%) больных.

По данным I. Dekkers и соавт. [25], оценивших отдаленную нефротоксичность у 763 больных, которым была проведена химиотерапия по поводу рака в детском возрасте (медиана наблюдения 18 лет), скорость клубочковой фильтрации у больных, получивших высокие дозы ифосфамида и цисплатина, была статистически значимо ниже, чем у больных, не получавших этих препаратов.

Дисфункция почек, развивающаяся у больных лимфомой Беркитта непосредственно во время ХТ по программе ЛБ-M04, которая является модификацией mNHL-BFM-90, проанализирована в работе А.Е. Лукиной и соавт. [26].

Учитывая использование в высокодозных программах ХТ большого количества препаратов, оказывающих токсическое воздействие на почки, изучение нефротоксичности является актуальным. Также возрастает интерес и к отдаленным проявлениям нефротоксичности в связи с эффективностью ВХТ в лечении больных гемобластомами и увеличением продолжительности их жизни.

Отдаленная нефротоксичность программы mNHL-BFM-90 у взрослых не изучена, хотя возможности восстановления функции почек в отдаленном периоде после ВХТ у взрослых больных интересны в контексте общей оценки их качества жизни.

В данном исследовании представлены результаты изучения отдаленной нефротоксичности у больных диффузной В-ККЛ после ВХТ по программе mNHL-BFM-90.

Цель исследования – оценка отдаленной нефротоксичности ВХТ по модифицированной программе NHL-BFM-90 (mNHL-BFM-90) у взрослых больных диффузной В-ККЛ.

Материал и методы

В исследование включены больные, окончившие лечение 5–10 лет назад. С 2002 по 2009 г. в ГНЦ (Москва) 86 больным диффузной В-ККЛ с признаками неблагоприятного прогноза была выполнена ВХТ по программе mNHL-BFM-90. Полная ремиссия достигнута у 64 (74,4%) больных. Девятилетняя общая выживаемость (ОВ) и безрецидивная выживаемость (БРВ) в группе больных с признаками неблагоприятного прогноза составила 65 и 86% соответственно [7].

На момент начала исследования в 2014 г. умерли 30 (30%) из 86 больных: от различных осложнений во время лечения 4 (4,6%), от рецидива и прогрессии заболевания 24 (20,6%), от других, не связанных с заболеванием причин, 2 (1,7%) больных. Из 56 пациентов согласились принять участие в исследовании 40,

Таблица 1
Сравнительная характеристика больных
в основной группе и группе сравнения

Параметр	Основная группа, терапия по протоколу mNHL-BFM-90		Группа сравнения, терапия по протоколу CHOP/R-CHOP	
	абс.	%	абс.	%
Всего больных в группе	40		19	
Медиана возраста на момент обследования, годы (диапазон)	57 (31–76)		70 (39–80)	
Пол:				
мужской	20	50	8	42
женский	20	50	11	58
Срок после окончания терапии, годы:				
медиана (диапазон)	6 (5–10)		5,5(5–11)	
Кумулятивная доза, г/м ² :				
ифосфамида	8–12		0	
циклофосфамида	2–3		3–6	
метотрексата	6–9		0	
Стадия заболевания:				
I	2	5	8	42
II	9	23	4	21
III	6	15	3	16
IV	23	58	4	21
Международный прогностический индекс:				
0–1	9	23	10	52
2–3	16	40	5	26
4–5	15	38	4	21
Поражение костного мозга	6	15	3	16
Специфическое поражение почек	1	2,5	1	5
Хроническая болезнь почек до начала ХТ (снижение клиренса креатинина)	4	10	4	21
ОПН до ХТ вследствие специфического поражения почек и/или обструкции мочевыводящих путей	2	5	0	
ОПН во время ХТ	10	25	0	
Сахарный диабет в анамнезе	6	15	2	11
Гипертоническая болезнь в анамнезе	16	40	9	47
Гепатит во время ХТ:				
вирусный	5	12,5	3	16
токсический	4	10	1	5
Полиморфизм гена <i>MTGFR</i> :				
гомозиготная мутация	3	7,5	2	10
гетерозиготная мутация	15	37,5	8	42

отказались от лабораторного и инструментального обследования 12, с 4 пациентами не удалось связаться, последние сведения о них мы получили в 2011 г.

Каждому больному провели комплексные исследования, включающие общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, иммунохимическое исследование крови и мочи, суточный клиренс креатинина, компьютерную томографию органов брюшной полости.

В итоге проанализированы результаты обследования 40 больных диффузной В-ККЛ (20 мужчин и 20 женщин),

в возрасте от 31 года до 76 лет (медиана возраста на момент обследования 57 лет), медиана срока после окончания терапии 6 лет. Индивидуальная кумулятивная доза ифосфамида 8–12 г/м², циклофосфамида 2–3 г/м², метотрексата 6–9 г/м².

Группу сравнения составили 19 больных диффузной В-ККЛ (8 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 30 до 78 лет (медиана возраста на момент обследования 70 лет), получивших терапию по программе CHOP/R-CHOP в ГНЦ (Москва) в период с 2002 по 2009 г. Медиана срока после окончания лечения 5,5 года. Индивидуальная кумулятивная доза циклофосфамида 3–6 г/м².

Сравнительная характеристика больных в двух группах представлена в табл. 1.

С целью оценки функции почек проводили комплекс лабораторных исследований до начала ХТ и через 5–10 лет после окончания терапии исследовали: концентрацию мочевины, креатинина, общего белка и альбуминов, электролитный баланс крови, суточный клиренс креатинина, а также иммунохимический анализ сыворотки крови и мочи, общий анализ мочи.

Оценку нефротоксичности проводили в соответствии с критериями оценочной шкалы общих критериев токсичности Национального института исследования рака NCI CTC (Clinical Trial Centre, National Cancer Institute, Канада) [28].

Хроническую болезнь почек устанавливали в соответствии с национальными рекомендациями по диагностике и лечению хронической болезни почек [27].

Для изучения зависимости токсического поражения почек от активности гена *MTGFR* на фоне терапии метотрексатом определяли полиморфизм этого гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В качестве характерных проявлений токсического поражения почек оценивали: повышение содержания креатинина и мочевины, снижение показателя суточного клиренса креатинина, наличие электролитных нарушений, наличие протеинурии, цилиндрурии, лейкоцитурии, эритроцитурии, глюкозурии, снижение удельного веса мочи.

Учитывали только те признаки нефротоксичности, которые появились или усугубились после ХТ.

Для интегральной оценки нефротоксичности для каждого больного рассчитывали два агрегированных показателя: суммарный показатель токсичности (суммарное количество вновь выявленных признаков нефротоксичности у этого больного); индикатор токсичности (наличие хотя бы одного вновь выявленного признака нефротоксичности у этого больного).

При статистической обработке данных применяли методы описательной статистики, стандартный частотный и дисперсный анализ. Использовали процедуры статистического пакета SAS v9.3. Пороговый уровень статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Из 40 больных, получивших ВХТ по программе mNHL-BFM-90, повышение содержания креатинина выявлено у 5 (12,5%) больных (I степени по шкале NCI CTC). Снижение суточного клиренса креатинина у 2 (5%) больных, у одной пациентки до 33 мл/мин, у другой до 50 мл/мин. Протеинурия у 11 (27,5%) больных (от 0,1 до 0,3 г/л, I степени по шкале NCI CTC), у одного больного 3 г/л (больной с длительным заболеванием сахарным диабетом в анамнезе и выявленной глюкозурией 8,3 ммоль/л). Цилиндрурия зафиксирована у 13(32,5%) больных, лейкоцитурия и эритроцитурия – у 10 (25%); снижение удельного веса мочи – у 14 (35%) больных (диапазон 1,008–1,013), глюкозурия – у 3 (7,5%) от 1,7 до 11 ммоль/л.

В группе сравнения после стандартной терапии CHOP/R-CHOP повышения содержания креатинина не выявлено ни у одного больного. Снижение суточного клиренса креатинина отмечено у 2(10,5%) больных (до 43 и 56 мл/мин), протеинурия – у 2 (10,5%) (0,1–0,2 г/л, I степени по NCI CTC), цилиндрурия – у 6(31,5%); лейкоцитурия и эритроцитурия – у 7(37%) больных. Снижение удельного веса мочи обнаружено у 5(26%) пациентов. Сравнительная характеристика частот выявления отдаленных признаков нефротоксичности представлена в табл. 2.

Обсуждение

Частота развития ОПН во время ХТ значимо выше в группе больных после терапии по программе mNHL-BFM-90 (25%)

Таблица 2

Частота обнаружения вновь выявленных признаков нефротоксичности в основной группе больных после mNHL-BFM-90 и в группе сравнения после стандартной терапии (CHOP/R-CHOP)

Признак нефротоксичности	mNHL-BFM-90 (n = 40)		CHOP/R-CHOP (n = 19)		p
	абс.	%	абс.	%	
Повышение содержания креатинина	5	12,5	0		0,10
Снижение суточного клиренса креатинина	2	5	2	10,5	0,69
Электролитные нарушения	1	2,5	1	5	0,58
Протеинурия	11	27,5	2	10,5	0,06
Цилиндрурия	13	32,5	6	31,5	0,5
Лейкоцитурия и эритроцитурия	10	25	7	37	0,34
Снижение удельного веса мочи	14	35	5	26	0,5
Глюкозурия	3	7,5	0		0,22
ОПН во время ХТ	10	25	0		0,01
Число больных с нарушением функции почек в отдаленном периоде	32	80	12	63	0,16

в отличие от группы больных по программе CHOP/R-CHOP (0%), $p = 0,01$. Значимых различий по частоте обнаружения признаков нефротоксичности в отдаленном периоде между группами не выявлено. Также не выявлено значимого различия между группами по количеству пациентов с нарушением функции почек в отдаленном периоде 32 (80%) в основной группе против 12 (63%) в группе сравнения ($p = 0,16$).

Для интегрированной оценки отдаленной нефротоксичности применен индикатор токсичности, регистрирующий появление хотя бы одного признака нефротоксичности. Значимых различий частоты индикатора нефротоксичности в сравниваемых группах не обнаружено: в основной группе (после ХТ в режиме mNHL-BFM-90) у 33 (82,5%) из 40 против 16 (84,2%) из 19 больных в группе сравнения после терапии в режиме CHOP/R-CHOP ($p = 0,87$). При анализе возможной ассоциативной связи этого показателя с клиническими и анамнестическими данными выявлена близкая к значимой его зависимость от наличия полиморфизма гена *МТГФР*: частота индикатора у 25 (89%) из 28 имеющих полиморфизм гена *МТГФР* против 24 (77%) из 31 без него ($p = 0,07$). Не выявлено значимых различий частоты индикатора нефротоксичности от наличия гипертонической болезни и сахарного диабета в анамнезе.

Среднее значение суммарного показателя нефротоксичности (количество вновь выявленных признаков нефротоксичности) значимо не различалось в высокодозной ($2 \pm 1,7$) и стандартной ($1,7 \pm 1,4$) группах ($p = 0,57$), однако в возрастной группе младше 60 лет значения суммарного показателя в высокодозной ($2,1 \pm 1,7$) и стандартной ($1 \pm 0,8$) группах различались чуть больше, но незначимо ($p = 0,08$).

Обнаружена вероятная, близкая к значимой зависимость суммарного показателя нефротоксичности от наличия почечной недостаточности до начала ХТ: $1,7 \pm 1,5$ у тех, кто не имел почечной недостаточности, и $2,8 \pm 2,2$ у пациентов с почечной недостаточностью ($p = 0,07$).

В то же время суммарный показатель значимо не различался в группе больных после ВХТ среди тех, кто перенес ОПН, – $1,9 \pm 0,9$ и у кого ОПН не наблюдалась – $1,9 \pm 1,7$ ($p = 0,97$).

Также выявлено существенное различие в значении суммарного показателя нефротоксичности у пациентов с поражением печени $3 \pm 2,1$ и без поражения печени $1,6 \pm 1,3$ ($p = 0,006$).

Таблица 3

Причины и время развития ОПН у больных после mNHL-BFM-90 (n = 10)

Причина развития ОПН	Время развития ОПН		
	после 1-го курса ХТ	после 2-го курса ХТ	после 5-го курса ХТ
Замедление клиренса метотрексата	1	4	0
Замедление клиренса метотрексата, антибактериальная, противовирусная, противогрибковая терапия	0	2	0
Антибактериальная, противовирусная, противогрибковая терапия	0	0	3
Токсический гепатит	0	2	2

Среднее значение суммарного показателя нефротоксичности статистически значимо выше в группе пациентов с гипертонической болезнью в анамнезе $2,5 \pm 2$ против $1,5 \pm 1$ без гипертонической болезни ($p = 0,02$), а также у больных сахарным диабетом $3 \pm 1,9$ против $1,7 \pm 1,5$ без сахарного диабета ($p = 0,06$).

У 2 (5%) из 40 пациентов основной группы отмечалась ОПН при поступлении до начала ХТ, из них у 1 пациента вследствие специфического поражения почек и мочекаменной нефропатии, которая разрешилась на фоне консервативной терапии на предфазе, первый курс ХТ проводили без метотрексата, дальнейшее лечение проводили с использованием полных доз препаратов. В отдаленном периоде у этого пациента из клинико-лабораторных нарушений отмечено незначительное, 1-й степени по NCI CTC (до 121 мкмоль/л), повышение концентрации креатинина.

Одна пациентка поступила с клиническими проявлениями ОПН вследствие обструкции мочевыводящих путей опухолевым конгломератом, двусторонним гидронефрозом, нефункционирующей левой почкой. Лечение осуществляли с перерасчетом доз препаратов с учетом клиренса креатинина. В отдаленном периоде пациентка перенесла нефрэктомия по поводу нефункционирующей почки и на момент обследования имела одну функционирующую почку. Из клинико-лабораторных нарушений у нее отмечено небольшое повышение содержания креатинина 1-й степени (до 153 мкмоль/л), снижение скорости клубочковой фильтрации до 58 мл/мин, лейкоцитурия и снижение удельного веса мочи до 1012.

Из 40 пациентов основной группы ОПН во время курсов ХТ перенесли 10 (25%) больных (однако из всех 86 больных, которым выполнена ВХТ с 2002 по 2009 г. ОПН перенесли 12%). У одного больного ОПН диагностирована на 1-м курсе ХТ вследствие замедления клиренса метотрексата и развития тумор-лизис синдрома. У 6 (60%) из 10 больных ОПН развилась на 2-м курсе ХТ на фоне замедления клиренса метотрексата и лечения нефротоксичными антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными препаратами, из них 2 больным понадобился гемодиализ, у остальных почечная функция нормализовалась на консервативной терапии. Последующие курсы ХТ проводили со снижением дозы метотрексата, до конца ХТ почечная недостаточность не наблюдалась. У 3 (30%) из 10 больных ОПН развилась после 5-го курса ХТ на фоне нефротоксических антибактериальных, противовирусных, противогрибковых препаратов, которая разрешилась на фоне консервативной терапии. У 11 (92%) из 12 больных отмечался полиморфизм гена *МТГФР*, у 3 из них – гомозиготный генотип. Обращает на себя внимание то, что у всех пациентов с полиморфизмом гена *МТГФР* гомозиготным фенотипом в группе ВХТ развилась ОПН на фоне ХТ.

Причины и время развития ОПН у больных из основной группы представлены в табл. 3.

У 10 из 40 больных основной группы, перенесших ОПН, в отдаленном периоде наблюдались те или иные признаки

Таблица 4
Сравнительная характеристика отдаленной нефротоксичности у больных с ОПН и без ОПН во время ХТ по программе mNHL-BFM-90

Признак нефротоксичности	mNHL-BFM-90 с ОПН (n = 10)		mNHL-BFM-90 без ОПН (n = 28)		p
	абс.	%	абс.	%	
Повышение содержания креатинина	2	20	2	7	0,55
Снижение суточного клиренса креатинина	0		2	7	0,29
Электролитные нарушения	1	10	0		0,07
Протеинурия	3	30	7	25	0,67
Цилиндрурия	5	50	8	29	0,25
Лейкоцитурия и эритроцитурия	2	20	7	25	0,2
Снижение удельного веса мочи	5	50	9	32	0,7
Глюкозурия	1	10	2	7	0,72
Полиморфизм гена <i>MTGFР</i> :					
гомозиготная мутация	2	20	0		0,003
гетерозиготная мутация	8	80	7	25	
Почечная недостаточность до ХТ	2	20	2	7	0,22
Специфическое поражение почек	0		2	7	0,40
Гепатит:					
токсический	4	40	1	3,5	0,0008
вирусный	0	0	4	14	
Сахарный диабет	2	20	4	14	0,84
Гипертоническая болезнь в анамнезе	5	50	11	40	0,51
Нарушения функции почек в отдаленном периоде	10	100	20	71	0,04

хронической болезни почек: цилиндрурия, лейкоцитурия, снижение относительной плотности мочи.

В отличие от пациентов с ОПН у 8 (29%) из 28 больных основной группы, не перенесших ОПН, не отмечено никаких нарушений функции почек по клинко-лабораторным данным ($p = 0,04$).

Сравнительная характеристика отдаленных результатов обследования больных с ОПН и без ОПН во время ХТ в основной группе представлена в табл. 4.

Обращает на себя внимание сопоставимая доля нарушения функции почек по лабораторным данным в основной группе между перенесшими и не перенесшими ОПН: протеинурия 3 (30%) и 4 (25%) соответственно, цилиндрурия 5 (50%) и 8 (29%), лейкоцитурия и эритроцитурия 2 (20%) и 7 (25%), снижение удельного веса мочи 5 (50%) и 9 (32%), глюкозурия 1 (10%) и 2 (7%).

Не выявлено значимых различий в проявлениях нефротоксичности в отдаленном периоде между группами больных, перенесших и не перенесших ОПН во время ВХТ. Однако обнаружена значимая зависимость развития ОПН во время ХТ от наличия полиморфизма гена *MTGFР* ($p = 0,003$) и наличия токсического гепатита у больных ($p = 0,0008$). Так, у всех больных основной группы с развившимся токсическим гепатитом во время ХТ развилась ОПН, причем развитие токсического гепатита во всех случаях предшествовало возникновению ОПН и усугубляло ее течение.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что нефротоксичность ВХТ mNHL-BFM-90 превосходит нефротоксичность курсов СНОР/R-СНОР. Проведение ВХТ у 10 (25%) больных осложнилось ОПН, из них 2 (20%) больных потребовалось выполнение гемодиализа, в отличие от группы стандартной ХТ, в которой таких осложнений не наблюдалось. Однако по отдаленным нефротоксическим проявлениям статистически значимых различий в сравниваемых группах не получено. Также сопоставимы возможности восстановления функции почек в отдаленном периоде среди больных

из группы ВХТ, перенесших ОПН и без ОПН, среди тех, у кого выявлены признаки хронической болезни почек. При этом у 100% больных, перенесших ОПН во время лечения, отмечалось нарушение функции почек в отдаленном периоде, а среди больных без ОПН дисфункция почек отмечена лишь у 20 (71%) ($p = 0,04$). Показано, что полиморфизм гена *MTGFР*, особенно гомозиготный фенотип, а также развитие токсического гепатита во время ХТ являются значимыми факторами риска развития ОПН при терапии по программе mNHL-BFM-90. Статистически значимых различий в характеристиках распределения значений индикатора нефротоксичности и суммарного показателя нефротоксичности в сравниваемых группах не выявлено. Обнаружена значимая зависимость суммарного показателя нефротоксичности от наличия гипертонической болезни в анамнезе.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Магомедова А.У., Кравченко С.К., Кременецкая А.М., Звонков Е.А., Барях Е.А., Мангасарова Я.К., Воробьев А.И. Девятилетний опыт лечения больных диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомой. *Терапевтический архив*. 2011; 7: 5–10.
- Звонков Е.Е., Кременецкая А.М., Кравченко С.К., Махия В.А. Эффективность консервативной терапии лимфосаркомы желудка. *Терапевтический архив*. 2008; 7: 18–26.
- Кравченко С.К., Магомедова А.У., Замятина В.А., Марголин О.В. Высокодозная терапия генерализованной формы (без вовлечения костного мозга) диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомы у больных старшего возраста. *Гематология и трансфузиология*. 2008; 3: 6–9.
- Магомедова А.У., Кравченко С.К., Кременецкая А.М., Звонков Е.Е., Барях Е.А., Лорие Ю.Ю., Овчинина Н.Г. Модифицированная программа NHL-BFM-90 в лечении больных диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомой. *Терапевтический архив*. 2006; 10: 44–47.
- Стрижевская А.М., Головина Е.Г., Дзампаев А.З., Байкова В.Н. Биохимические критерии токсичности терапии высокими дозами метотрексата у детей с остеосаркомой. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015; 2(1): 82–9.
- Пименова М.А., Соколов А.Н., Бирюкова Л.С., Устинова Е.Н., Шафоростова И.И., Донцова И.А. и др. Экстремально высокая концентрация метотрексата в сыворотке крови, сопровождавшаяся острой почечной недостаточностью у больного острым лимфобластным лейкозом после высокодозной консолидации. *Терапевтический архив*. 2011; 7: 58–61.
- Колыгин Б.А., Кулева С.А. *Последствия противоопухолевой терапии у детей*. СПб.: Гиппократ; 2011.
- Саржевский В.О., Мельниченко В.Я., Тюрин В.Л. Нефротоксичность высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией костного мозга (периферических стволовых клеток) при гемобластазах. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. 2013; 2: 66–71.
- Лукина А.Е., Барях Е.А., Кравченко С.К., Бирюкова Л.С., Гемджян Э.Г., Магомедова А.У. и др. Особенности поражения почек при лимфоме Беркитта. *Терапевтический архив*. 2012; 7: 31–4.
- Смирнов А.В. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению. *Нефрология*. 2012; 1: 89–115.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Magomedova A.U., Kravchenko S.K., Kremenetskaya A.M., Zvonkov E.A., Baryakh E.A., Mangasarova Ya.K., Vorobiev A.I. Nine-year experience in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphosarcoma. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2011; 7: 5–10. (in Russian)
- Zvonkov E.E., Kremenetskaya A.M., Kravchenko S.K., Makhinya V.A. The effectiveness of conservative treatment of gastric lymphosarcoma. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2008; 7: 18–26. (in Russian)
- Kravchenko S.K., Magomedova A.U., Zamyatina V.A., Margolin O.V. High-dose therapy of generalized (without bone marrow involvement) diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i Transfusiology)*. 2008; 3: 6–9. (in Russian)
- Magomedova A.U., Kravchenko S.K., Kremenetskaya A.M., Zvonkov E.E., Baryakh E.A., Lorie Yu.Yu., Ovchinina N.G. The modified NHL-BFM-90 program in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphosarcoma. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2006; 10: 44–7. (in Russian)

5. Sun X.F., Zhen Z.J., Xia Y., Lin S.X., Zhu J., Wang J., et al. Outcome of children and adolescents with Burkitt lymphoma and diffuse large B cell lymphoma treated with a modified NHL-BFM-90 protocol. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2013; 34(12): 1032–7. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.12.008.
6. Samochatova E.V., Maschan A.A., Shelikhova L.N., Myakova N.V., Belogurova M.B., Khlebnikova O.P. Therapy of advanced-stage mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents with rituximab and reduced intensity induction chemotherapy (B-NHL-2004M Protocol): the results of a multicenter study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2014; 36(5): 395–401. doi: 10.1097/MPH.0b013e31829d4900.
7. Sahni V., Choudhury D., Ahmed Z. Chemotherapy-associated renal dysfunction. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009; 5(8): 450–62. doi: 10.1038/nrne-ph.2009.97.
8. Perazella M.A., Moeckel G.W. Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy. *Semin. Nephrol.* 2010; 30(6): 570–81. doi: 10.1016/j.semnephrol.2010.09.005.
9. Kintzel P.E. Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug. Saf.* 2001; 24(1): 19–38.
10. Choi M., Sun C.L., Kurian S., Carter A., Francisco L., Forman S.J., Bhatta S. Incidence and predictors of delayed chronic kidney disease in long-term survivors of hematopoietic cell transplantation. *Cancer*. 2008; 113(7): 1580–7. doi: 10.1002/cncr.23773.
11. Elyasi S., Khalili H., Dashti-Khavidaki S., Mohammadpour A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2012; 68(9): 1243–55. doi: 10.1007/s00228-012-1259-9.
12. Ellis M.J., Parikh C.R., Inrig J.K., Kanbay M., Patel U.D. Chronic kidney disease after hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Am. J. Transplant.* 2008; 8(11): 2378–90. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02408.x.
13. Hingorani S., Guthrie K.A., Schoch G., Weiss N.S., McDonald G.B. Chronic kidney disease in long-term survivors of hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39(4): 223–9.
14. Karimzadeh I., Farsaei S., Khalili H., Dashti-Khavidaki S. Are salt loading and prolonging infusion period effective in prevention of amphotericin B-induced nephrotoxicity? *Expert Opin. Drug Saf.* 2012; 11(6): 969–83. doi: 10.1517/14740338.2012.721775.
15. Strizhevskaya A.M., Golovnya E.G., Dzampaev A.Z., Baykova V.N. Biochemical criteria of toxicity of therapy with high doses of methotrexate in children with osteosarcoma. *Advances in Molecular Oncology. Russian Journal (Uspekhi Molekulyarnoy Onkologii)*. 2015; 2(1): 082–9. doi: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.082-089. (in Russian)
16. Ulrich C.M., Yasui Y., Storb R., Schubert M.M., Wagner J.L., Bigler J. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*. 2001; 98(1): 231–4.
17. Ongaro A., De Mattei M., Della Porta M.G., Rigolin G.M., Ambrosio C., Di Raimondo F. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*. 2009; 94(10): 1391–8. doi: 10.3324/haematol.2009.008326.
18. Pimenova M.A., Sokolov A.N., Biryukova L.S., Ustinova E.N., Shaforostova I.I., Donskova I.A., et al. Extremely high concentration of methotrexate in the blood serum, followed by acute renal failure in a patient with acute lymphoblastic leukemia after high-dose consolidation. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2011; 7: 58–61. (in Russian)
19. Naughton C.A. Drug-induced nephrotoxicity. *Am. Fam. Physician*. 2008; 78(6): 743–50.
20. Kolygin B.A., Kuleva S.A. *The effects of anticancer therapy in children*. St. Petersburg: Gippokrat; 2011. (in Russian)
21. Sarzhevskiy V.O., Melnichenko V.Ya., Tyurin V.L. Renal toxicity of high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation (peripheral stem cells) in hemoblastoses. *Bulletin of Pirogov's National Medico-Surgical Center. Russian Journal (Vestnik Natsionalnogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova)*. 2013; 2: 66–71. (in Russian)
22. Kaya Z., Gursel T., Bakkaloglu S.A., Kocak U., Atasever T., Oktar S.O. Evaluation of renal function in Turkish children receiving BFM-95 therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 2007; 24(4): 257–67.
23. Grönroos M.H., Jahnukainen T., Möttönen M., Perkkio M., Irjala K., Salmi T.T. Long-term follow-up of renal function after high-dose methotrexate treatment in children. *Pediatr. Blood Cancer*. 2008; 51(4): 535–9. doi: 10.1002/pbc.21650.
24. Oberlin O., Fawaz O., Rey A., Naudet P., Ridola V., Orbach D., et al. Long-term evaluation of ifosfamide-related nephrotoxicity in children. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(32): 5350–5. doi: 10.1200/JCO.2008.17.5257.
25. Dekkers I.A., Blijdorp K., Cransberg K., Pluijm S.M., Pieters R., Neggers S.J., van den Heuvel-Eibrink M.M. Long-term nephrotoxicity in adult survivors of childhood cancer. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 8(6): 922–9. doi: 10.2215/CJN.09980912.
26. Lukina A.E., Baryakh E.A., Kravchenko S.K., Biryukova L.S., Gemdzhyan E.G., Magomedova A.U., et al. Features of renal damage in Burkitt's lymphoma. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2012; 7: 31–4. (in Russian)
27. Smirnov A.V. National guidelines. Chronic kidney disease: the basic principles of screening, diagnosis, prevention and treatment approaches. *Nephrology. Russian Journal (Nefrologiya)*. 2012; 1: 89–115. (in Russian)
28. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v 4.0*. Publish Date: May 28, 2009. Available at: http://www.evs.nci.nih.gov/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14

Поступила 11.12.15

Принята к печати 08.09.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.2+616-006.448]-092:612.017.1]-078.33

Назарова Е.Л., Демьянова В.Т., Шардаков В.И., Зотина Е.Н., Докшина И.А.

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА РЯДА ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России, 610027, Киров, Россия

Комплексное взаимодействие между факторами внешней среды и генами организма человека вносит заметный вклад в развитие хронических лимфопролиферативных заболеваний (ХЛПЗ) у лиц с различными мутациями генов, в том числе врожденного иммунного ответа. Обследовали 51 больного хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и 70 больных множественной миеломой (ММ). Контрольную группу составили 47 здоровых лиц, не имеющих онкогематологических заболеваний, сопоставимых по гендерным и возрастным характеристикам с больными ХЛПЗ. У обследуемых определяли распространенность 20 генетических полиморфизмов (single-nucleotide polymorphism – SNP) в 14 генах врожденного иммунного ответа. Обнаружено, что у больных ХЛЛ статистически значимо чаще встречался гаплотип AA гена Toll-подобного рецептора (Toll-like receptor – TLR) 3 в позиции -421, чем в контрольной группе (OR 18,56; $p = 0,005$). При ММ отмечена связь риска развития заболевания с полиморфизмом генов IL-10-1082, TLR2-753 и TLR3-421. Кроме того, найдены генетические маркеры быстро прогрессирующих форм ХЛЛ и ММ (гаплотипы CG + GG гена IL-6 и гаплотипы GG + GA гена IL-17A соответственно). Можно предположить возможную связь полиморфизма генов IL-6, IL-10, IL-17A, TLR2 и TLR3 с развитием ХЛПЗ и рекомендовать использовать данные маркеры в качестве ранних дополнительных диагностических и прогностических критериев.

Ключевые слова: лимфопролиферативные заболевания; хронический лимфолейкоз; множественная миелома; полиморфизм генов; цитокины; толл-подобные рецепторы.

Для цитирования: Назарова Е.Л., Демьянова В.Т., Шардаков В.И., Зотина Е.Н., Докшина И.А. Ассоциации полиморфизма ряда генов врожденного иммунитета с риском развития хронических лимфопролиферативных заболеваний. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 183–189. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-183-189>

Nazarova E.L., Demiyanova V.T., Shardakov V.I., Zotina E.N., Dokshina I.A.

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISM IN SEVERAL INNATE IMMUNITY GENES WITH THE RISK OF THE DEVELOPMENT OF CHRONIC LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

S.M. Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, 610027, Russian Federation

The complex interaction between environmental factors and human genes makes a significant contribution to the development of chronic lymphoproliferative diseases (CLPD) in individuals with mutations in various genes, including the innate immune response genes. We examined 51 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 70 multiple myeloma (MM) patients. The control group consisted of 47 healthy persons without hematological malignancies. The patients from control group were matched for gender and age characteristics of CLPD patients. In observed persons there was determined the prevalence of genetic polymorphisms (single-nucleotide polymorphism – SNP) in the innate immune response genes including 20 genetic polymorphisms (single-nucleotide polymorphism – SNP) in 14 genes of the innate immune response. In patients with CLL haplotype AA for the TLR3 gene in –421 position was revealed to occur significantly more often than in the control group (OR: 18.56; $p = 0.005$). In MM patients there was noted the relation between the risk of the development of the disease and gene polymorphism for IL-10-1082, TLR2-753 and TLR3-421. There were found genetic markers for rapidly progressing forms of CLL and MM (CG + GG haplotype of the gene IL-6 and haplotypes GG + GA gene IL-17A, respectively). It is possible to assume a probable link of gene polymorphisms for IL-6, IL-10, IL-17A, TLR2 and TLR3 with the development of the CLPD and recommend these markers as early additional diagnostic and prognostic criteria.

Key words: lymphoproliferative diseases; chronic lymphocytic leukemia; multiple myeloma; gene polymorphism; cytokines; toll-like receptors.

For citation: Nazarova E.L., Demiyanova V.T., Shardakov V.I., Zotina E.N., Dokshina I.A. Associations of polymorphism in several innate immunity genes with the risk of the development of chronic lymphoproliferative diseases. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(4): 183-189. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-183-189>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 06 June 2016

Accepted 22 November 2016

Хронические лимфопролиферативные заболевания (ХЛПЗ) относят к группе патологических состояний так называемого мультифакториального генеза, в развитии которых играют роль как факторы внешней среды, так и генетические факторы [1, 2]. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и множественная миелома (ММ) – два наиболее распространенных опухолевых заболевания лимфатической системы.

Проведенные в предыдущие годы исследования показали, что ХЛЛ не является статичным заболеванием, а имеет чрезвычайно динамичный и сложный субклональный мутационный пейзаж, где у одного пациента сосуществуют несколько опухолевых субклонов. Они могут поддерживаться количественно по отношению друг к другу в равной степени в течение многих лет («клональное равновесие»), однако в ряде случаев отдельные субклоны могут становиться доминирующими [3]. Много наблюдений подтверждают важность структурной организации и особенностей функционирования В-клеточного рецептора (В-cell receptor – BCR) в развитии и эволюции ХЛЛ [4]. Примерно у 30% больных ХЛЛ наблюдается экспрессия похожих, «стереотипных» BCR, которые «отбираются» опухолевыми клетками для связывания ограниченного набора антигенных эпитопов, что поддерживает концепцию антигенуправляемой экспансии клеток при ХЛЛ.

Для корреспонденции:

Назарова Елена Львовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России». 610027, г. Киров, Россия. E-mail: nazarova.yelena@mail.ru.

For correspondence:

Nazarova Elena L., MD, PhD, leading researcher of the Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, 610027, Russian Federation. E-mail: nazarova.yelena@mail.ru.

Information about authors:

Nazarova E.L., <http://orcid.org/0000-0002-9890-4264> Researcher ID: G-6806-2015; Demiyanova V.T., <http://orcid.org/0000-0003-1527-3055>; Shardakov V.I., <http://orcid.org/0000-0001-6036-4250>; Zotina E.N., <http://orcid.org/0000-0001-9692-2541>; Dokshina I.A., <http://orcid.org/0000-0002-1447-0199>.

Исследования *in vitro* определили несколько сигнальных путей и клеточных факторов, которые способны увеличивать выживаемость опухолевых клеток при ХЛЛ и поддерживать их ограниченную пролиферацию. К ним относятся не только BCR, но и Toll-подобные рецепторы (TLRs), CD40, CD49d, цитокины, хемокины и компоненты внеклеточного матрикса [4–6]. Многие из этих сигналов передаются через SYK и/или PI3Kδ и/или тирозинкиназу Брутона (Bruton's tyrosine kinase – BTK) и активируют аналогичные внутриклеточные пути: PI3K/AKT/mTOR, NF-κB и MAPK. Поэтому трудно оценить, в какой степени один фактор или сигнальный путь может быть необходимым или достаточным для инициации и прогрессирования ХЛЛ [4, 6].

ММ также является злокачественной опухолью из В-клеток, которые в конечном итоге дифференцируются в долгоживущие, продуцирующие антитела плазматические клетки, прошедшие обычные стадии своего развития [7]. Как и другие виды опухолей, ММ характеризуется многочисленными геномными aberrациями. Последние крупномасштабные исследования с применением метода секвенирования показали обширную внутри- и межопухолевую геномную гетерогенность, эволюцию и замещение клонов в процессе прогрессирования ММ [8, 9].

Помимо указанных изменений, к генетическим факторам риска развития ХЛЛ и ММ также относят наличие в геноме человека аллельных вариантов генов иммунного ответа [1, 2]. Гены врожденного иммунного ответа обладают высокой степенью полиморфизма и рассматриваются как важные факторы развития заболеваний у человека с определенным набором генетических вариантов. Их распределение среди населения соответствует популяционным законам и имеет свои этнографические особенности. К настоящему времени известно о связи развития отдельных форм неходжкинских лимфом (НХЛ) и ММ с однонуклеотидными заменами (single-nucleotide polymorphism – SNPs) в промоторном регионе генов ряда TLRs: *TLR1*, *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR10*; цитокинов (интерлейкинов – *IL-1β*, *IL-10*, *IL-6*), фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor – *TNF*); маннозосвязывающего лектина 2 (*MBL2*); фактора, ингибирующего миграцию

макрофагов (*MIF*); доменсодержащего белка 15, вовлекающего каспазу (*CARD15*), антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (*CTLA-4*) и др. [1, 2, 10, 11].

SNPs в генах врожденного иммунного ответа, локализованные в кодирующих и регуляторных областях, влияют на конечный уровень секреции или экспрессии белка, кодируемого этим геном, а также на его функциональную активность и ассоциированы с риском развития ХЛПЗ [10]. Кроме того, гетерогенность клинической картины опухолей лимфатической системы является отражением существующих генетических и эпигенетических нарушений [11]. Накопленные к настоящему времени данные весьма противоречивы ввиду этнически неоднородных выборов, особенностей климато-географических и социально-экономических условий проживания пациентов. Поэтому исследователи отмечают необходимость проведения дальнейших изысканий по данной проблеме [1, 10].

Цель настоящего исследования – определение роли однонуклеотидных замен в генах врожденного иммунного ответа в риске развития ХЛЛ и ММ.

Материал и методы

Обследованы две группы пациентов: 51 больной ХЛЛ и 70 – ММ, а также 47 здоровых лиц, схожих с больными по полу и возрасту (табл. 1).

Больных ХЛЛ и ММ обследовали с 2012 по 2015 г. на базе клиники ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России». Стадирование патологических процессов базировалось на основании критериев J. Binet [12] и B. Durie, S. Salmon [13]. Все пациенты и лица контрольной группы дали свое письменное информированное согласие на участие в этом исследовании. Материалом для генетических исследований послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной периферической крови стандартным способом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных участков генов иммунного ответа проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле.

Протестировано 20 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа: *IL-1β* (T-31C, G-1473C, C-3953T, T-511C); *IL-2* (T-330G), *IL-4* (C-589T), *IL-6* (C-174G), *IL-10* (C-819, G-1082A), *IL-17A* (G-197A), *TNF* (G-308A), *CD14* (C-159T), *FCGR2A* (His166Arg), *TLR2* (Arg753Gln), *TLR3* (Phe421Leu), *TLR4* (Asp299Gln, Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T-1237C, A2848G). Все указанные SNP являются ранее подтвержденными и имеют частоту минорного аллеля 1% и более (NCBI dbSNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>) (табл. 2).

Распределение генотипов в исследуемых полиморфных локусах было изучено с использованием логистического регрессионного анализа и с проверкой на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Учитывали соответствие больных и лиц контрольной группы по полу и возрасту. Для расчета результатов использовали пакет программ Statistica V.12 и MS Office Excel 2003. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Распределение частот генотипов генов иммунного ответа у больных ХЛПЗ и в контрольной группе представлено в табл. 3. Здесь и далее результаты выражены в долях единицы.

Анализ полученных данных показал, что риск развития ХЛЛ был связан

Таблица 1

Характеристика обследованных групп больных ХЛПЗ и здоровых лиц

Показатель	Группа контроля		Больные ХЛЛ		Больные ММ	
	n	%	n	%	n	%
Возраст, годы:						
до 60	37	78,7	29	56,9	35	50
старше 60	10	21,3	22	43,1	35	50
Медиана возраста, (25–75%)	49 (44–58)		62 (57–67)		60 (52–65)	
Пол:						
мужской	25	53,2	34	66,7	27	38,6
женский	22	46,8	17	33,3	43	61,4
Стадия ХЛЛ по Binet [12]:						
A	–		1	2		
B			37	72,5		
C			13	25,5		
Стадия ММ по Durie-Salmon PLUS [13]:						
IA	–		–		3	4,3
IIA					36	51,4
IIIB					4	5,7
IIIA					20	28,6
IIIB					7	10

Таблица 2

Изученные полиморфные локусы генов иммунного ответа

Ген	Полиморфный локус	Цитогенетическая локализация	RS number	Локализация в гене	Тип мутации
<i>IL-1β</i>	T-31C	2q13-2q14	rs2856841	Интрон	Транзиция
	G-1473C		rs1143623	Промотор	Трансверсия
	C-3953T		rs1143634	Экзон 5	Транзиция/silens
<i>IL-2</i>	T-511C		rs16944	Интрон	Транзиция
	T-330G	4q26-4q27	rs2069762	Интрон	Трансверсия
	C-589T	5q23-5q31	rs2243250	Интрон	Транзиция
<i>IL-4</i>	C-589T	7p15-7p21	rs1800795	Интрон	Трансверсия
<i>IL-6</i>	C-174G	1q31-1q32	rs1800871	Интрон	Транзиция
	C-819		rs1800896	Промотор	Intergen
<i>IL-10</i>	G-1082A		rs2275913	Интрон	Транзиция
<i>IL-17A</i>	G-197A	6p12.2	rs1800629	Интрон	Транзиция
<i>TNF</i>	G-308A	6p21.33	rs34424920	Интрон, 5'-UTR	Транзиция
<i>CD14</i>	C-159T	5q31.1	rs1801274	Экзон 4	Транзиция/mis-sense
<i>FCGR2A</i>	His166Arg	1q23.3	rs5743708	Экзон 3	Транзиция/mis-sense
<i>TLR2</i>	Arg753Gln	4q31.3-4q32	rs3775291	Экзон 4	Транзиция/mis-sense
<i>TLR3</i>	Phe421Leu	4q35.1	rs4986790	Экзон 3	Транзиция/mis-sense
<i>TLR4</i>	Asp299Gln	9q33.1	rs4986791	Экзон 3	Транзиция/mis-sense
	Thr399Ile	9q32-9q33	rs5743810	Экзон 1	Транзиция/mis-sense
<i>TLR6</i>	Ser249Pro	4p14	rs5743836	Интрон	Транзиция
<i>TLR9</i>	T-1237C	3p21.2	rs352140	Экзон 2	Транзиция/silens
	A2848G				

Примечание. RS number – идентификационный номер однонуклеотидной замены согласно The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) (National Center for Biotechnology Information (NCBI) [14]; National Human Genome Research Institute (NHGRI) [15]); silens – сеймсенс-мутация; intergen – межгенный регион; 5'-UTR – 5'-фланкирующая область гена; mis-sense – миссенс-мутация.

Таблица 3

Частота наблюдаемых генотипов больных ХЛЛ, ММ и у лиц контрольной группы

Генотип	Контрольная группа	Больные ХЛЛ	Больные ММ	Генотип	Контрольная группа	Больные ХЛЛ	Больные ММ
<i>IL-1β</i> (T-31C):				<i>TNF</i> (G-308A):			
CC	0,426	0,314	0,371	GG	0,766	0,696	0,729
CT	0,510	0,510	0,514	GA	0,234	0,283	0,271
TT	0,064	0,176	0,115	AA	0,000	0,021	0,000
<i>IL-1β</i> (G-1473C):				<i>CD14</i> (C-159T):			
GG	0,426	0,372	0,377	CC	0,468	0,412	0,486
GC	0,468	0,535	0,475	CT	0,404	0,431	0,300
CC	0,106	0,093	0,148	TT	0,128	0,157	0,214
<i>IL-1β</i> (C-3953T):				<i>FCGR2A</i> (His166Arg):			
CC	0,532	0,587	0,500	GG	0,532	0,456	0,426
CT	0,383	0,370	0,348	GA	0,298	0,370	0,412
TT	0,085	0,043	0,152	AA	0,170	0,174	0,162
<i>IL-1β</i> (T-511C):				<i>TLR2</i> (Arg753Gln):			
CC	0,128	0,238	0,226	GG	0,660	0,686	0,829
CT	0,532	0,500	0,436	GA	0,340	0,314	0,171
TT	0,340	0,262	0,344	AA	0,000	0,000	0,000
<i>IL-2</i> (T-330G):				<i>TLR3</i> (Phe421Leu):			
TT	0,489	0,490	0,343	GG	0,468	0,451	0,529
TG	0,468	0,471	0,571	GA	0,532	0,392	0,343
GG	0,043	0,039	0,086	AA	0,000	0,157	0,128
<i>IL-4</i> (C-589T):				<i>TLR4</i> (Asp299Gln):			
CC	0,383	0,529	0,400	GG	0,588	0,714	0,675
CT	0,553	0,412	0,500	GA	0,353	0,238	0,325
TT	0,064	0,059	0,100	AA	0,059	0,048	0,000
<i>IL-6</i> (C-174G):				<i>TLR4</i> (Thr399Ile):			
CC	0,255	0,235	0,200	CC	0,638	0,651	0,770
CG	0,468	0,510	0,529	CT	0,362	0,326	0,230
GG	0,277	0,255	0,271	TT	0,000	0,023	0,000
<i>IL-10</i> (C-819T):				<i>TLR6</i> (Ser249Pro):			
CC	0,553	0,608	0,657	CC	0,404	0,314	0,414
CT	0,426	0,373	0,257	CT	0,447	0,588	0,386
TT	0,021	0,019	0,086	TT	0,149	0,098	0,200
<i>IL-10</i> (G-1082A):				<i>TLR9</i> (T-1237C):			
GG	0,319	0,326	0,250	TT	0,723	0,745	0,714
GA	0,638	0,522	0,500	TC	0,255	0,216	0,243
AA	0,043	0,152	0,250	CC	0,022	0,039	0,043
<i>IL-17A</i> (G-197A):				<i>TLR9</i> (A2848G):			
GG	0,404	0,370	0,414	AA	0,362	0,465	0,339
GA	0,426	0,522	0,414	AG	0,383	0,209	0,371
AA	0,170	0,108	0,172	GG	0,255	0,326	0,290

с полиморфизмом гена *TLR3* (Phe421Leu), а ММ – с полиморфизмом генов *IL-10* (G-1082A), *TLR2* (Arg753Gln) и *TLR3* (Phe421Leu).

Полиморфизм генов врожденного иммунного ответа и риск развития ХЛЛ

Генотип гена *TLR3*, содержащий мутантный аллель А в позиции -421 в гомозиготном состоянии, встречался у больных ХЛЛ статистически значимо чаще, чем у лиц, не имеющих ХЛЛ (OR 18,56; 95%CI 1,04–331,26; $\chi^2 = 8,03$; $p = 0,005$) (табл. 4).

При анализе распределения вариантных генотипов изучаемых генов у 37 больных ХЛЛ, в стадии В и у 13 в стадии С, установленными на момент постановки диагноза заболевания, обнаружено, что присутствие гаплотипов гена *IL-6*, содержащих мутантный аллель G (CG + GG), снижало риск выявления процесса в терминальной стадии почти в 4,5 раза (табл. 5).

Следовательно, аллель «дикого» типа С гена *IL-6* выступал в качестве протективного маркера риска развития ХЛЛ с более агрессивным типом течения заболевания.

Полиморфизм генов врожденного иммунного ответа и риск развития ММ

У больных ММ в отличие от лиц контрольной группы (табл. 6) отмечена ассоциация риска развития заболевания с полиморфизмом генов *IL-10* (G-1082A), *TLR2* (Arg753Gln) и *TLR3* (Phe421Leu).

При наличии генотипов с мутантным аллелем в гомозиготном состоянии: AA генов *IL-10* (G-1082A) и *TLR3* (Phe421Leu) риск возникновения ММ возрастал в 7,5 и 14,67 раза соответственно. Напротив, при носительстве генотипов с мутантным аллелем А (GA + AA) гена *TLR2* (Arg753Gln) риск развития заболевания уменьшался в 2,49 раза.

При исследовании различий в частоте выявляемых полиморфных маркеров у 40 больных ММ в II стадии и у 27 в III стадии на момент диагностики обнаружено, что на более быстрый характер прогрессирования процесса может влиять мутационный статус гена *IL-17A* (G-197A) (табл. 7).

Обнаружено, что наличие мутантного аллеля А гена *IL-17A* в гомозиготном состоянии в 4 раза снижало риск быстрого прогрессирования ММ. Следовательно, аллель «дикого» типа G выступал в качестве аллеля риска неблагоприятного течения заболевания.

Обсуждение

Механизмы, которые управляют нормальной дифференцировкой и активацией В-клеток, при ХЛЛ часто нарушаются, приводя к неограниченному росту и длительному выживанию трансформированных клеток. В-лимфоциты особенно склонны к злокачественному перерождению, поскольку механизмы, используемые для создания всего многообразия синтезируемых ими антител, могут привести к хромосомным транслокациям и онкогенным мутациям [16].

Таблица 4

Ассоциация между гаплотипами *TLR3* и риском развития ХЛЛ

Генотип	Группа контроля	Больные ХЛЛ	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
TLR3:						
GG+GA	1,000	0,843	8,03	0,005	18,56	1,04–331,26
AA	0,000	0,157			0,05	0,00–0,96

Примечание. Здесь и в табл. 5–7: p – значимость различий; OR (odds ratio) – отношение шансов; 95% CI – доверительный интервал (confidence interval), в котором статистическая значимость различий параметра, полученного на основе исследования, имеет степень вероятности 95%.

ММ и ХЛЛ – весьма схожие гемопозитические опухоли, субстрат которых представлен клетками В-ряда. У них присутствуют как общие черты, так и весьма значительные различия. К общности заболеваний можно отнести то, что ММ и ХЛЛ стратифицируются в зависимости от наличия анемии и иммунной недостаточности. Кроме того, злокачественные элементы при обоих заболеваниях реагируют на алкилирующие агенты, но заметно различаются по своей чувствительности к флударабину (клетки ХЛЛ более чувствительны, чем клетки ММ) и глюкокортикоидам (злокачественные элементы при ММ более чувствительны, чем клетки больных ХЛЛ). Различия заключаются в том, что ММ является результатом как увеличения скорости пролиферации, так и накопления опухолевых клеток, в то время как ХЛЛ характеризуется только аккумуляцией злокачественных клеточных элементов. Кроме того, при ММ наблюдается экспрессия нескольких гемопозитических дифференцировочных антигенов, которые предполагают трансформацию плюрипотентных стволовых клеток. При ХЛЛ в процесс трансформации, более вероятно, вовлекаются коммитированные В-клетки-предшественники. Различия между ММ и ХЛЛ также связаны с важной ролью дисбаланса цитокинов, что особенно заметно при ММ. Например, остеокластактивирующие свойства некоторых цитокинов составляют основу поражения костной ткани при ММ, чего не наблюдается при ХЛЛ. Различия между этими заболеваниями также заключаются в продолжительности безрецидивной и общей выживаемости [17]. Эти общности и гетерогенность между ММ и ХЛЛ могут быть связаны в том числе с генетическими особенностями компонентов врожденного иммунитета.

TLRs играют важную роль в активации В-лимфоцитов, созревании и формировании клеточной-памяти и могут быть вовлечены в патогенез ХЛЛ, так как экспрессия этих рецепторов обнаруживается не только на неизмененных, но и на опухолевых клетках. По имеющимся данным, TLRs могут быть причастны к злокачественной трансформации клеток, прогрессированию опухоли и уклонению опухоли от иммунного надзора [18]. TLR3 располагается в эндосомах клеток и может связываться с такими экзогенными патоген-ассоциированными паттернами как двуспиральная РНК вирусов, а также с эндогенными веществами, образуемыми в процессе повреждения тканей: двуспиральной и матричной РНК. Активация TLR3 индуцирует запуск ядерного фактора каппа В (NF- κ B) и продукцию интерферонов I типа. Ранее было установлено, что неизмененные В-клетки, а также опухолевые элементы при ХЛЛ и ММ или вовсе не экспресси-

Таблица 5

Различия в частоте распределения гаплотипов гена *IL-6* у больных с В и С стадиями ХЛЛ

Генотип	В стадия ХЛЛ	С стадия ХЛЛ	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
IL-6:						
CC	0,162	0,462	4,73	0,03	0,23	0,06–0,91
CG+GG	0,838	0,538			4,43	1,09–17,92

Таблица 6

Генотипы, ассоциируемые с риском развития ММ

Генотип	Группа контроля	Больные ММ	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
<i>IL-10</i> -1082:						
GG+GA	0,953	0,75	8,67	0,003	7,5	1,64–34,26
AA	0,043	0,25			0,13	0,03–0,61
TLR2:						
GG	0,66	0,829	4,41	0,04	0,40	0,17–0,95
GA + AA	0,34	0,171			2,49	1,05–5,92
TLR3:						
GG + GA	1,000	0,871	6,55	0,01	14,67	0,83–258,55
AA	0,000	0,129			0,07	0,00–1,20

руют TLR3, или его экспрессия выявляется на очень низком уровне, что, вероятно, может быть связано с особенностями мутационного статуса гена, кодирующего данный рецептор. Ген *TLR3* локализован на хромосоме 4. Мутация в 4-м экзоне гена *TLR3* в позиции 421 связана с заменой в эктодомене фенилаланина на глицин [14]. Данный полиморфизм может влиять на транскрипцию и экспрессию TLR3 на клеточной поверхности, снижать способность рецептора распознавать лиганды, что приводит к подавлению активации NF- κ B [19]. В доступной литературе не было найдено сведений, касающихся участия полиморфизма гена *TLR3* в развитии ХЛЛ. Нами обнаружено, что мутантный гомозиготный гаплотип гена *TLR3* встречался у больных ХЛЛ и ММ статистически значимо чаще, чем у лиц, не имевших ХЛЛ, повышая риск развития данных заболеваний. Таким образом, аллель «дикого» типа гена *TLR3* выступал в качестве протективного фактора, препятствующего возникновению ХЛЛ. Передача сигнала TLRs играет важную роль в биологии В-клеток. Стимуляция TLRs требуется в качестве третьего сигнала активации наивных В-клеток, которые экспрессируют эти рецепторы на низком уровне. Данная экспрессия некоторых TLRs может быть индуцирована одновременным запуском BCR с последующей экспрессией некоторых TLRs на В-клетках памяти на конститутивно высоком уровне [11].

Цитокины представляют собой разнородную группу белков или гликопротеинов, которые действуют в качестве гормональных регуляторов или сигнальных молекул, контролирующих активность различных клеток в основном системы гемопоза. Цитокины действуют на клетки-мишени путем связывания со специфическими цитокиновыми рецепторами, что может приводить к апоптозу, росту, делению и дифференцировке клеток. Нарушения функционирования иммунной системы играют важную роль в процессе созревания и дифференцировки опухолевого клона при развитии ХЛЛ. В частности, в патогенезе этих заболеваний важное значение отводится дисбалансу цитокинов. С одной стороны, опухолевые клетки способны самостоятельно продуцировать цитокины. С другой, рост опухолевого клона регулируется цитокинами, которые условно можно разделить на индуцирующие и ингибирующие пролиферацию опухолевых клеток. Кроме того, злокачественные клетки, взаимодействуя со стромальными клетками костного мозга, стимулируют секрецию цитокинов, которые снижают эффективность лекарственных препаратов и способствуют

Таблица 7

Частоты распределения гаплотипов гена *IL-17A* у больных ММ на разных стадиях заболевания

Генотип	II стадия ММ	III стадия ММ	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
IL-17A:	0,475	0,333	7,59	0,02	1,81	0,66-4,98
GG	0,275	0,593			0,26	0,09–0,73
GA	0,250	0,074			4,17	0,83–20,81
AA						

выживанию и росту опухолевых клеток. Одним из таких медиаторов является IL-6 – плейотропный провоспалительный цитокин, участвующий в различных биологических процессах, таких как кроветворение, воспаление и канцерогенез. Функция IL-6 реализуется через его связывание с мембраносвязанной или растворимой α -субъединицей рецептора IL-6, приводя к индукции сигнальных каскадов, включая JAK/STAT-3, фосфоинозитидин-3-киназный (PI3K), протеинкиназный B/Akt (PKB/Akt) и *gas/gaf*/митогенактивируемый протеинкиназой путь (MAPK). Ген *IL-6* локализован на хромосоме 7 и является полиморфным в обоих 5'-и 3'-фланкирующих областях. Полиморфизм в этих регуляторных последовательностях может оказывать существенное влияние на транскрипцию гена путем изменения сайтов связывания транскрипционных факторов [20]. Наиболее изученным полиморфизмом гена *IL-6* является трансверсия в виде замены цитозина на гуанин в позиции -174 интрона гена. Исследования *in vitro* обнаружили аллельспецифичное влияние -174G/C-варианта на активность промотора гена *IL-6*, приводящее к изменению скорости синтеза и деградации IL-6. Указывается, что полиморфизм -174G/C связан с концентрацией IL-6 в сыворотке крови, однако данные литературы не всегда имеют сходные результаты. С одной стороны, найдено, что присутствие -174C-аллеля сопровождалось снижением экспрессии гена, более высоким содержанием циркулирующего IL-6 и медленно прогрессирующим течением ХЛЛ. Выявление аллеля G было связано не только с плохим прогнозом при различных В-ХЛПЗ, но и являлось маркером агрессивного характера течения процесса [21, 22]. Ранее была описана роль полиморфизма 174G/C в развитии ХЛЛ и ММ [23]. В исследованиях турецких авторов [20] найдено, что по сравнению с 30 здоровыми добровольцами у 23 больных ХЛЛ отмечалось преобладание аллеля «дикого» типа, и его присутствие в генотипе статистически значимо ассоциировалось с риском развития ХЛЛ. Тогда как в нашем исследовании выявлено, что аллель «дикого» типа С гена *IL-6* (С-174G) выступал в качестве маркера риска развития заболевания с более агрессивным типом течения ХЛЛ (стадия С) в отличие от более благоприятного, длительно существующего процесса на стадии В. Наряду с генотипом гена *TLR3* в проведенном исследовании выявлена связь определенных гаплотипов генов *TLR2* и *IL-10* с риском развития ММ. *TLR2* в отличие от *TLR3* экспрессируется на клеточной мембране, формируя функциональные гетеродимеры с *TLR1* и/или *TLR6* [18]. Кроме того, установлено, что экспрессия *TLR2* колеблется во время нормальных биологических процессов созревания В-клеток: от слабо экспрессирующих наивных В-клеток до сильно экспрессирующих В-клеток зародышевого центра и обратно к слабо экспрессирующим данный рецептор В-клеткам памяти [24]. При ХЛЛ и ММ опухолевые элементы экспрессируют *TLR2* на достаточно высоком уровне [18], что, вероятно, также может быть связано с особенностями мутационного статуса гена, кодирующего данный рецептор. Ген *TLR2* локализован на длинном плече 4-й хромосомы и входит в одну группу сцепления с такими генами, как *TLR3* и *NFKB* (p50) [14]. SNP *TLR2* Arg753Gln – наиболее изученный полиморфизм, который находится в пределах внутриклеточного TIR-домена. Его присутствие приводит к снижению стимуляции *TLR2* бактериальными липопептидами и к повышенному риску развития некоторых инфекционных заболеваний [24]. Исследования, проведенные нами ранее, выявили, что частота генотипа GA гена *TLR2* (20% против 0%; $p = 0,05$; OR 10,36; 95%CI 0,49–218,61) у пациентов с индолентными НХЛ в целом и при агрессивном их течении в частности (25% против 0%; $p = 0,03$; OR 1,36; 95%CI 0,64–292,12) статистически значимо превышала таковую у больных ММ [25]. В данном исследовании найдено, что при носительстве генотипов с мутантным аллелем А (GA + AA) гена *TLR2* (Arg753Gln) риск развития ММ уменьшался. Также установлена роль отдельных гаплотипов гена *IL-10*-1082 в риске развития ММ, но не ХЛЛ.

IL-10 представляет собой цитокин, вырабатываемый многими типами клеток, включая В-лимфоциты [26]. Он стимулирует антиген- или митогенактивируемую дифференцировку В-клеток и действует на них как фактор роста и выживания. Ранее проведенные исследования показали возможное участие IL-10 в патогенезе лимфоидных злокачественных новообразований и его связь с прогнозом и резистентностью к проводимой терапии [26, 27], так как данный цитокин регулирует экспрессию BCL-2 на неизмененных гемопоэтических клетках, а также на трансформированных клетках у больных лимфомами. Нарушение продукции IL-10 связывают с полиморфизмом в промоторе гена *IL-10*, который ассоциирован с повышением секреции IL-10, что чаще наблюдается у больных ХЛПЗ, чем у здоровых людей. Приводятся данные, что больные ХЛПЗ с высоким содержанием IL-10 имеют худший прогноз [27]. Ген *IL-10* состоит из 5 экзонов, охватывает 5,2 kb и расположен на хромосоме 1. Описано около 49 полиморфизмов гена *IL-10* [28]. Один из них, *IL-10*-1082A>G, локализован в проксимальной области промотора гена *IL-10* между -4 kb и -1,1 kb [27]. Он может влиять на конечный уровень транскрипции гена и концентрацию продуцируемого цитокина, поэтому исследован и в нашей работе. Найдено, что при наличии генотипа с мутантным аллелем в гомозиготном состоянии AA гена *IL-10* (G-1082A) риск возникновения ММ возрастал в 7,5 раза, чего не наблюдалось в исследованиях С. Zheng и соавт. [29] и G. Mazur и соавт. [30]. В то же время ранее описано [28], что IL-10 может играть важную роль в развитии ММ, так как является фактором роста, в том числе для трансформированных плазматических клеток через аутокринную индукцию онкостатина М. Более того, повышенная концентрация IL-10 в сыворотке крови больных ММ также наблюдалась и при прогрессировании заболевания. М. Rudzianskiene и соавт. [31] установили, что больные ММ, несущие гетерозиготный гаплотип гена *IL-10*-1082 A/G, имели более выраженный ответ на проводимую радиотерапию очагов миеломного поражения костной ткани, чем больные с другими генотипами. У больных с гаплотипом -1082 A/A в промоторе гена *IL-10* наблюдалось более быстрое облегчение болевого синдрома (в первые 4 нед проведения лучевой терапии). Ранее проведенные исследования показали [32], что полиморфизм гена *IL-10* (G-1082A) коррелирует с развитием и прогрессированием и других ХЛПЗ, в том числе ХЛЛ. Так, носительство *IL-10*-1082G-аллеля чаще выявлялось у больных с более продвинутыми стадиями ХЛЛ (III или IV по Rai), а также более высоким содержанием ЛДГ. Кроме того, этот аллель выступал в качестве маркера плохого прогноза ХЛЛ, в частности быстрого прогрессирования заболевания и более короткого периода выживаемости без назначения лечения. Интересно, что поверхностный антиген CD5, который экспрессируется на высоком уровне при ХЛЛ, регулирует концентрацию IL-10, постоянно поддерживая активацию факторов транскрипции STAT3 и NFAT2 [32].

У больных ММ в нашем исследовании также найдены различия в частоте распределения гаплотипов гена *IL-17A* в зависимости от стадии заболевания в момент диагностики (II или III стадии). IL-17A – цитокин, продуцируемый в основном Т-хелперами 17-го типа (Th17), который может образовывать либо гомодимеры или гетеродимеры с IL-17F. IL-17A вырабатывается не только Th17-клетками, но и цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, $\gamma\delta$ Т-клетками, инвариантными естественными Т-киллерными клетками, клетками-индукторами лимфоидной ткани, а также другими гемопоэтическими и негемопоэтическими клеточными элементами. IL-17A играет важную роль в реализации защитных сил организма против бактериальных и грибковых инфекций. Кроме того, экспрессия IL-17A и связанные с ним факторы, а также инфильтрация IL-17A-продуцирующими клетками микроокружения опухоли вовлечены в реализацию противоопухолевых или обеспечивающих опухолевый рост эффектов при различных видах злокачественных опухолей. Ген, кодирующий IL-17A, расположен на хромосоме 6. Ранее

была продемонстрирована связь между низким уровнем продуцируемого IL-17A и присутствием мутантного гаплотипа AA гена *IL-17A* в точке мутации -197 [33].

Таким образом, можно отметить не только вклад высокополиморфных антигенов главного комплекса гистосовместимости, генетического статуса BCR и цитогенетических нарушений в формировании риска развития ХЛПЗ, но и участие других генов врожденного иммунитета. Проведенные исследования показали, что становление ХЛПЗ, в частности ХЛЛ и ММ, может быть сопряжено с полиморфизмом генов иммунного ответа. В этой связи можно высказать предположение о возможной роли мутаций в кодирующих и регуляторных областях генов образраспознающих рецепторов (TLRs) и провоспалительных цитокинов в возникновении и прогрессировании опухолей лимфатической системы.

Выводы

- маркером повышенного риска развития ХЛЛ является гаплотип AA гена *TLR3* (Phe421Leu);
- наличие генотипов гена *IL-6*, содержащих мутантный аллель G, снижало риск раннего выявления ХЛЛ в терминальной С-стадии заболевания;
- развитие ММ ассоциировано с носительством гаплотипов AA в полиморфных локусах -1082 гена *IL-10* и -421 гена *TLR3*;
- снижение риска развития ММ связано с присутствием генотипов GA+AA гена *TLR2* в точке мутации -753;
- присутствие мутантного аллеля A в гомозиготном состоянии в полиморфном локусе -197 гена *IL-17A* снижало риск быстрого прогрессирования ММ на более продвинутых стадиях (III стадия) опухолевого процесса;
- найденная вероятная связь полиморфизма генов *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *TLR2* и *TLR3* с развитием ХЛПЗ позволяет использовать данные маркеры в качестве ранних факторов прогноза скорости прогрессии ХЛПЗ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Загоскина Т.П., Зотина Е.Н. Диагностика дефектов врожденного иммунитета при В-клеточных опухолях лимфатической системы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(11): 39–42.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Purdue M.P., Lan Q., Wang S.S., Krickler A., Menashe I., Zheng T.Z., et al. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2009; 30(2): 275–81.
- Forrest M.S., Skibola C.F., Lightfoot T.J., Bracci P.M., Willett E.V., Smith M.T., et al. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2006; 134(2): 180–3.
- Apollonio B., Ramsay A.G. Subclonal heterogeneity in chronic lymphocytic leukaemia: revealing the importance of the lymphoid tumor micro-environment. *Br. J. Haematol.* 2016; 172(1): 7–8.
- Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015; 100(12): 1495–507.
- Koehrer S., Burger J.A. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2016; 14(1): 55–64.
- Spina V., Martuscelli L., Rossi D. Molecular deregulation of signaling in lymphoid tumors. *Eur. J. Haematol.* 2015; 95(4): 257–69.
- Verma R., Kumar L. Molecular biology of multiple myeloma. *J. Hematol. Transfus.* 2015; 3(1): 1035–44.
- Gupta A., Place M., Goldstein S., Sarkar D., Zhou S., Potamouis K., et al. Single-molecule analysis reveals widespread structural variation in multiple myeloma. *PNAS*. 2015; 112(25): 7689–94.
- Boyd K.D., Pawlyn C., Morgan G.J., Davies F.E. Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert Rev. Hematol.* 2012; 5(6): 603–17.
- Vangsted A., Klausen T.W., Vogel U. Genetic mutations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 2012; 88(1): 8–30.

- Rozkova D., Novotna L., Pytlík R., Hochova I., Kozak T., Bartunkova J., Spisek R. Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. *Int. J. Cancer*. 2010; 126(5): 1132–43. doi: 10.1002/ijc.24832.
- Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguet H., Goasguen J., et al. A new Prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48(1): 198–206.
- Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer*. 1975; 36(3): 842–54.
- National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- National Human Genome Research Institute. Available at: <https://www.genome.gov/>
- Shaffer III A.L., Young R.M., Staudt L.M. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 565–610.
- Barlogie B., Gale R.P. Multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: parallels and contrasts. *Am. J. Med.* 1992; 93(4): 443–50.
- Isaza-Correa J.M., Liang Z., van den Berg A., Diepstra A., Visser L. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 57–67. doi: 10.1186/s13045-014-0057-5.
- Sá K.S., Pires-Neto Ode S., Santana B.B., Gomes S.T., Amoras Eda S., Conde S.R., et al. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms are not associated with the risk of hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2015; 48(2): 136–42. doi: 10.1590/0037-8682-0008-2015.
- Mutlu P., Yalcin S., Elci P., Yildirim M., Cetin A.T., Avcu F. Association of -174G/C interleukin-6 gene polymorphism with the risk of chronic lymphocytic, chronic myelogenous and acute myelogenous leukemias in Turkish patients. *J. BUON*. 2014; 19(3): 787–91.
- Tian G., Mi J., Wei X., Zhao D., Qiao L., Yang C., et al. Circulating interleukin-6 and cancer: A meta-analysis using Mendelian randomization. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11394. doi: 10.1038/srep11394.
- Yakupova E.V., Grinchuk O.V., Kalimullina D.Kh., Bakirov B.A., Galimova R.R., Makarova O.V., et al. Molecular genetic analysis of the interleukin 6 and tumor necrosis factor α gene polymorphisms in multiple myeloma. *Mol. Biol.* 2003; 37(3): 358–61.
- Ennas M.G., Moore P.S., Zucca M., Angelucci E., Cabras M.G., Melis M., et al. Interleukin-1B (IL-1B) and interleukin-6 (IL-6) gene polymorphisms are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.* 2008; 26(2): 98–103.
- Heiden L., ed. Toll-like receptors. Novus Biologicals and Innate Immunity: the story of Toll'd. Handbook and Overview. Updated edition. USA: Novus Biologicals; 2014. <http://images.novusbio.com/design/TLRHandbookNovus011514.pdf>
- Nazarova E.L., Shadakov V.I., Demyanova V.T., Zagorskina T.P., Zotina E.N. The diagnostic of defects of inborn immunity under B-cell tumors of lymphatic system. *Clinical laboratory diagnostics. Russian Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 59(11): 39–42. (in Russian)
- Pehlivan M., Sahin H.H., Pehlivan S., Ozdilli K., Kaynar L., Oguz F.S., et al. Prognostic importance of single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , and TNF- α genes in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2014; 18(6): 403–9.
- Domingo-Domènech E., Benavente Y., González-Barca E., Montalbán C., Gumà J., Bosch R., et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*. 2007; 92(11): 1475–81.
- Howell W.M., Rose-Zerilli M.J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J. Nutr.* 2007; 137(1, Suppl.): S194–9.
- Zheng C., Huang D., Liu L., Wu R., Bergenbrant Glas S., Osterborg A., et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in multiple myeloma. *Int. J. Cancer*. 2001; 95(3): 184–8.
- Mazur G., Bogunia-Kubik K., Wróbel T., Karabon L., Polak M., Kuliczowski K., et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol. Lett.* 2005; 96(2): 241–6.
- Rudzianskiene M., Inciura A., Juozaityte E., Gerbutavicius R., Siomoliuniene R., Ugenskiene R., et al. The role of single nucleotide polymorphism of IL-6 and IL-10 cytokine on pain severity and pain relief after radiotherapy in multiple myeloma patients with painful bone destructions. *Genetika*. 2014; 46(2): 455–69.
- Lech-Maranda E., Mlynarski W., Grzybowski-Lyzdorzcyk O., Borowiec M., Pastoreczak A., Cebula-Obrzut B., et al. Polymorphisms of TNF and IL-10 genes and clinical outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52(3): 287–96.
- Resende P.G., Correia-Silva Jde F., Silva T.A., Salomão U.E., Marques-Silva L., Vieira E.L., et al. IL-17 genetic and immunophenotypic evaluation in chronic graft-versus-host disease. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 571231. doi: 10.1155/2014/571231.

Поступила 06.06.16

Принята к печати 22.11.16

Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Чечеткин А.В.

ЗНАЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ В ЭРУ ТАРГЕТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, 191024, г. Санкт-Петербург, Россия

Полная ремиссия (ПР) и длительная беспрогрессивная выживаемость (БПВ) могут быть достигнуты уже после первой линии химиоиммунотерапии у большинства больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Тем не менее в костном мозге значительного числа больных с ПР заболевания иммунологическими и генетическими методами выявляют некоторое количество опухолевых клеток (более 1 на 10 000 нормальных клеток), которые определяют суть минимальной остаточной болезни (МОБ). МОБ-негативный статус больного ассоциируется с длительной БПВ и общей выживаемостью и является единственным благоприятным прогностическим фактором, определяемым после терапии. Появление таргетных препаратов терапии ХЛЛ (ибрутиниб, иделалисиб, венетоклакс), имеющих высокую эффективность и низкий профиль токсичности, позволяет надеяться на увеличение числа МОБ-негативных ремиссий, а изменение тактики лечения – на решение проблемы контроля за остаточным опухолевым клоном.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; минимальная остаточная болезнь; проточная цитометрия; ибрутиниб.

Для цитирования: Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Чечеткин А.В. Значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе в эру таргетных лекарственных препаратов. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 190-196. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-190-196>

Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Martynkevich I.S., Kleina E.V., Chechetkin A.V.

THE MEANING OF THE MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN THE ERA OF TARGETED DRUGS

Russian Scientific-Research Institution of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024, Russian Federation

In the majority of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) the complete remission (CR) and prolonged progression-free survival (PFS) can be achieved already after the first line chemoimmunotherapy. Nevertheless, a number of tumor cells (more than one per normal 10.000 cells) which determine the essence of minimal residual disease (MRD) is revealed by immunological and genetic methods in the bone marrow of significant number of patients in CR of the disease. MRD-negative status of a patient is associated with prolonged PFS and overall survival (OS) and being the only favorable prognostic factor determined after therapy. The delivery of targeted drugs for the therapy of in CLL (Ibrutinib, Idelalisib, Venclexa) possessing of high efficiency and low toxicity, give the hope to increase the number of MRD-negative remissions, and the change in treatment strategy for the solution of problems of control of residual tumor clone

Key words: chronic lymphocytic leukemia; minimal residual disease; flow cytometry; ibrutinib.

For citation: Kuvshinov A. Yu., Voloshin S. V., Martynkevich I. S., Kleina E. V., Chechetkin A. V. The meaning of the minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia in the era of targeted drugs. *Hematology and Transfusiology: Russian Journal (Gematologiya i transfusiologiya)* 2016; 61(4): 190-196. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-190-196>

Acknowledgments. The study was executed in frameworks of the Scientific Research work "Residual disease 15".

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20 October 2016

Accepted 22 November 2016

За последние десятилетия тактика ведения больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) значительно изменилась. Если раньше целью лечения таких больных было купирование симптомов заболевания и достижение клинико-гематологического улучшения, то в последние 20 лет она определяется как достижение ремиссии (полной или частичной) и увеличение выживаемости. Включение в программы химиотерапии боль-

ных ХЛЛ флударабина оказалось достаточно эффективным, однако при этом и весьма токсичным лечением [1–5].

По данным разных авторов [4–5], частота общего ответа (ОО) при монотерапии флударабином составляет 60–83%, полная ремиссия (ПР) – 5–7%. В комбинации с другими химиопрепаратами (циклофосфамид, митоксантрон) частота ОО достигает 75–94%, а ПР встречается приблизительно у 20% больных. Однако, несмотря на высокую эффективность, применение флударабина сопряжено с высокой токсичностью. Основные осложнения терапии связаны с миелосупрессией и развитием инфекционных осложнений. Нейтропения 4-й степени развивается практически у половины больных, а частота инфекционных осложнений достигает 30%.

Внедрение новых диагностических методов и прогностических факторов, разработка современных программ лечения, в том числе с использованием моноклонального антитела ритуксимаб, повысили эффективность терапии ХЛЛ [6–9]. Частота достижения ОО при применении комбинированных программ химиотерапии с включением ритуксимаба соста-

Для корреспонденции:

Кувшинов Алексей Юрьевич, младший научный сотрудник научной лаборатории ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: kuvshinovmd@gmail.com.

For correspondence:

Kuvshinov Sergey V., MD, PhD, Russian Scientific-Research Institution of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024, Russian Federation. E-mail: servolos@gmail.com.

Information about authors:

Kuvshinov A. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-4341-2123>; Voloshin S. V., <http://orcid.org/0000-0003-1784-0375>; Martynkevich I. S., <http://orcid.org/0000-0001-5958-0490>; Chechetkin A. V., <http://orcid.org/0000-0002-7569-0697>.

вила более 90%, а ПР достигалась более чем у 60% больных. В связи с тем что у большинства больных ХЛЛ даже при первоначально достигнутой ПР в конечном итоге возникает рецидив заболевания, определение минимальной остаточной болезни (МОБ) приобрело важное значение при оценке эффективности используемых терапевтических программ [10].

Изучение МОБ при ХЛЛ началось два десятилетия назад в исследованиях с использованием 2-цветной иммунофлюоресцентной проточной цитометрии (ПЦ). Еще в 1992 г. L. Robertson и соавт. [2] показали, что даже при определении МОБ с помощью 2-цветной слабощувствительной ПЦ, больные в ПР могут быть разделены на две группы, различные по продолжительности беспрогрессивной выживаемости (БПВ). МОБ-позитивные пациенты имели БПВ 19 мес по сравнению с более чем 30-месячной БПВ у МОБ-негативных. S. O'Brien и соавт. [3] также показали статистически значимое увеличение БПВ у МОБ-негативных больных в ПР по сравнению с МОБ-позитивными после лечения по программе флударабин + циклофосфамид (FC). Важность достижения МОБ-негативной ремиссии также была продемонстрирована и в других исследованиях [8, 11–13].

Накопленные и систематизированные данные легли в основу опубликованных в 2008 г. Международной рабочей группой по изучению ХЛЛ (IWCLL) рекомендаций по диагностике и лечению ХЛЛ [14]. В рекомендациях были представлены принципы диагностики, стадирования и лечения заболевания, определены прогностические факторы течения болезни, а также критерии эффективности терапии. В разделе 5 рекомендаций дано определение понятия МОБ при достижении ПР как состояния организма при наличии опухолевых клеток в количестве 1 и более на 10 000 нормальных клеток и невозможности их выявления морфологическими методами.

В настоящее время разработаны и применяются два основных метода выявления МОБ при ХЛЛ – иммунофенотипический и молекулярно-генетический. Метод с использованием аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов тяжелых цепей иммуноглобулина (AC-IGH-ПЦР) является общепринятым и демонстрирует самую высокую чувствительность для обнаружения МОБ [11, 15]. В основе метода лежит выявление клональной популяции лимфоцитов по вариабельным регионам генов иммуноглобулинов. В настоящее время определены стандартные ПЦР-праймеры, которые используются при ХЛЛ для обнаружения и мониторинга МОБ [16].

Метод проточной цитометрии основан на детекции флюоресценции клеток ХЛЛ, окрашенных моноклональными антителами, а также определении параметров прямого и бокового светорассеяния. Антитела специфично связываются с присутствующими на клетке антигенами. Каждая молекула антител конъюгирована с флюорохромом, который флюоресцирует при возбуждении молекулы светом определенной длины волны. Флюорохромы светятся в узком диапазоне флюоресцентного спектра. Таким образом, флюоресценция клетки в определенной области спектра указывает на присутствие искомого антигена, а флюоресценция в нескольких областях соответственно на коэкспрессию нескольких антигенов.

Несмотря на высокую чувствительность, время, затрачиваемое на получение результатов AC-IGH-ПЦР, часто необоснованно удлиняет сроки принятия решения относительно дальнейшей лечебной тактики. К тому же метод является трудоемким и дорогостоящим. Именно поэтому 4-цветная ПЦ, обладающая чувствительностью, сопоставимой с AC-IGH-ПЦР, и дающая более быстрый результат, является наиболее востребованным методом оценки МОБ при ХЛЛ на сегодняшний день [11, 17, 18]. Имеются данные по оценке МОБ с помощью высокочувствительных 6-, 8- и даже 10-цветной ПЦ [19]. Однако именно 4-цветная ПЦ остается стандартным методом диагностики МОБ с достаточной чувствительностью (10^{-4}), принятой на сегодняшний день в качестве критерияльной [14].

Наиболее масштабное исследование по оценке значимости МОБ выполнено немецкой группой по изучению ХЛЛ (GCLLSG) [9]. В ходе исследования сравнивали группы больных с разным уровнем МОБ по данным ПЦ после проведенной терапии: низкий риск (уровень МОБ менее 10^{-4}), промежуточный риск (уровень МОБ 10^{-4} – 10^{-2}), высокий риск (уровень МОБ более 10^{-2}). Были получены данные о статистически значимом увеличении БПВ у больных из группы низкого риска по сравнению с другими группами (медианы 68,7; 40,5 и 15,4 мес соответственно). Медиана общей выживаемости (ОВ) была выше в группе низкого риска по сравнению с группой высокого риска (не достигнута и 48,4 мес соответственно). При этом различий в ОВ и БПВ в зависимости от вида предшествующей терапии (FC или FC + ритуксимаб – FCR), не выявлено. Но отмечено, что частота достижения более низкого уровня МОБ выше в группе больных, получавших терапевтический режим FCR, содержащий ритуксимаб. Наименьший риск прогрессирования заболевания отмечен у больных в группе низкого риска, чем в группе промежуточного и высокого риска, отношение рисков (ОР) 2,49 и 14,7 соответственно; $p < 0,0001$.

G. Kovacs и соавт. [12] также продемонстрировали важность достижения МОБ-негативной ремиссии. В исследование включены 542 больных, получавших следующие программы терапии: FC – 121 (22,3%), FCR – 283 (52,2%), бендамустин + ритуксимаб (BR) – 138 (25,5%) больных. МОБ-негативные ремиссии достигнуты у 175 (81,8%) из 214 больных в ПР и у 157 (47,9%) из 328 больных с частичной ремиссией (ЧР). Были выявлены статистически значимые различия БПВ между МОБ-негативными ПР и МОБ-позитивными ПР (69,2 мес против 40,4 мес; ОР 0,445; 95% CI 0,282–0,703; $p = 0,001$). Дополнительно обнаружены значимые различия между МОБ-негативными ЧР и МОБ-позитивными ЧР (61,7 мес против 40,4 мес; ОР 0,537; 95% CI 0,34–0,847; $p = 0,008$). Статистически значимые различия между МОБ-негативными ПР и МОБ-негативными ЧР не выявлены (69,2 мес против 61,7 мес; ОР 0,822; 95% CI 0,572–1,182; $p = 0,29$).

На следующем этапе изучения МОБ ХЛЛ сравнивали наиболее часто используемые в 1-й линии терапии ритуксимабсодержащие программы лечения (BR и FCR) [13]. В исследование был включен 561 больной ХЛЛ. Ответ на лечение, ОВ и БПВ оценены у 282 больных, получавших химиотерапию FCR и у 279 – BR. Общий ответ в обеих группах был 97,8% ($p = 1,0$). ПР в группе FCR составила 40,7%, BR – 31,5% ($p = 0,026$). МОБ оценена с помощью 4-цветной ПЦ у 355 больных, из них у 185 после FCR, у 170 после BR. Частота достижения МОБ-негативных ремиссий, а значит и более длительная БПВ наблюдались у больных, получавших лечение по программе FCR по сравнению с BR – 58,1 и 31,6% соответственно; $p < 0,001$. Через 12 мес наблюдения 46 (58,2%) из 79 больных из группы FCR оставались МОБ-негативными по сравнению с 20 (26,3%) из 76 после BR ($p < 0,001$); через 18 мес: 35 (53,8%) из 65 против 16 (24,6%) из 65 соответственно ($p = 0,006$). Медиана БПВ составила 53,7 мес в группе FCR и 43,2 мес в группе BR (ОР 1,589; 95% CI 1,25–2,079; $p = 0,001$).

Полученные в результате исследований данные подчеркивают важность искоренения болезни на молекулярном уровне (табл. 1). Следовательно, отсутствие МОБ становится решающим показателем успешности лечения. В связи с этим достижение МОБ-негативного статуса было определено в качестве цели терапии при ХЛЛ. По результатам исследования также сделан вывод о том, что достижение МОБ-негативной ремиссии является мощным прогностическим фактором эффективности лечения независимо от клинического ответа, а оценка МОБ необходима не только после завершения программы химиотерапии, но и в период дальнейшего наблюдения.

В последние 5 лет мы вступили в новую эру лечения ХЛЛ. Достижения в области изучения биологии ХЛЛ позволили разработать группу таргетных препаратов ингибиторов

Таблица 1

Основные клинические исследования эффективности терапии при ХЛЛ

Источник литературы	Программа терапии	Число больных	Ответ	<i>p</i>	МОБ-	БПВ	<i>p</i>	ОВ
L.Robertson и соавт. (1992) [2]	F + Pred	159	ПР 19% ПРн 30% ЧР 18%		Менее 10 ⁻² ПР 89% ПРн 51% ЧР 19%	2-летняя: ПР 87% ПРн 55% ПР МОБ- 84% ПРн МОБ- 39%	< 0,03 < 0,001	
B.Eichhorst и соавт. (2006) [4]	FC или F	375	ОО 94 и 83% ПР 24 и 7%	0,001 < 0,001		48 и 20 мес	0,001	
I.Flinn и соавт. (2007) [5]	FC или F	278	ОО 74,3 и 59,5% ПР 23,4 и 4,6%	0,013 0,000007		31,6 и 19,2 мес	0,0001	
F.Bosch и соавт. (2008) [1]	FCM	69	ОО 90% ПР 64% ЧРн 14% ЧР 12%		Менее 10 ⁻⁴ ПР 26%	2-летняя: ПР МОБ- 91% ПР МОБ+ 80% ЧРн 37% ЧР 12%	0,21 0,1 0,03	4-летняя: 70%
C.Tam и соавт. (2008) [6]	FCR	224	ОО 95% ПР 72% ЧРн 10% ЧР 12%		Менее 10 ⁻² ПР 82% ЧРн 39% ЧР 55%	6-летняя 51% МОБ- 85% МОБ+ 49%		6-летняя: 77%; ПР 88% ЧРн 77% МОБ- 84% МОБ+ 65%
M.Hallek и соавт. (2008) [8]	FCR или FC	817	ОО 95 и 88% ПР 52 и 27 %	0,001 < 0,01		2-летняя: 76,6 и 62,3%	< 0,0001	
S.Böttcher и соавт. (2012) [9]	FCR или FC	493				Менее 10 ⁻⁴ : 68,7 мес; 10 ⁻⁴ –10 ⁻² : 40,5 мес; менее 10 ⁻² : 15,4 мес	< 0,0001	Не достигнута; не достигнута; 48,4 мес
G.Covacs и соавт. (2014) [12]	FCR, или FC, или BR	542			Менее 10 ⁻⁴ ПР 81,8% ЧР 47,9%	ПР МОБ- 69,2 мес; ПР МОБ+ 40,4 мес; ЧР МОБ- 61,7 мес	0,001 0,008	
B.Eichhorst и соавт. (2014) [13]	FCR или BR	561	ПР 40,7 и 31,5%	0,026	Менее 10 ⁻⁴ 58,1 и 31,6%	53,7 и 43,2 мес	0,001	

Примечание. F – флударабин; Pred – преднизолон; FC – флударабин, циклофосфамид; FCM – флударабин циклофосфамид, митоксантрон; FCR – флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб; BR – бендамустин, ритуксимаб.

В-клеточного сигнального пути (ибрутиниб, иделалисиб) и BCL-2 (венетоклакс), синтезированы новые моноклональные антитела офатумумаб и обинутузамаб с доказанной эффективностью [20], исследуют эффективность и место в терапии ХЛЛ иммуномодуляторов [21, 22]. В связи с появлением новых таргетных лекарственных препаратов (в первую очередь ибрутиниба) тактика лечения и стандарты терапии ХЛЛ претерпевают значительные изменения. В исследованиях доказаны высокая эффективность современных таргетных препаратов и их относительно низкий профиль токсичности [23–26]. В настоящее время большинство этих препаратов одобрено для лечения рецидивирующих и рефрактерных форм ХЛЛ, а ибрутиниб и обинутузамаб еще и в качестве препаратов 1-й линии терапии. Несмотря на высокий потенциал в достижении МОБ-негативного статуса больных ХЛЛ, его клиническое и прогностическое значение при использовании таргетных препаратов до конца не ясно и всесторонне изучается в рамках исследований и в рутинной практике (табл. 2).

Одобренное применения иделалисиба, перорального селективного ингибитора фосфатидилинозитол-3-дельта-киназы (PI3Kδ), играющей ключевую роль в обеспечении жизнеспособности, пролиферации и миграции опухолевых клеток для лечения прогрессирования/рецидива ХЛЛ, было основано главным образом на данных рандомизированного плацебо-контролируемого исследования III фазы Study 116 [25]. В нем иделалисиб и ритуксимаб получали 220 больных, которым не могла быть проведена стандартная химиотерапия. В октябре 2013 г. исследование Study 116 было завер-

шено досрочно в связи с выявлением статистически значимого преимущества по показателям БПВ у больных, которые получали иделалисиб и ритуксимаб, по сравнению с теми, кто получал только ритуксимаб и плацебо (HR 0,18; 95% CI 0,10–0,32; *p* < 0,0001). Медиана БПВ в группе иделалисиба с ритуксимабом не достигнута (95% CI 10,7 мес), а в группе монотерапии ритуксимабом составила 5,5 мес (95% CI 3,8–7,1). Наиболее частыми осложнениями являлись повышение уровня печеночных трансаминаз, диарея, пневмонит и колит. Эффективность иделалисиба продемонстрирована и в других исследованиях [26, 27], но данные об оценке МОБ при его применении пока не опубликованы.

Обинутузамаб представляет собой рекомбинантное, гуманизированное, моноклональное антитело II типа с модифицированной схемой гликозилирования, принадлежащее к классу IgG1 и обладающее специфичностью к антигену CD20. В сочетании с хлорамбуцилом частота достижения МОБ-негативного статуса у больных ХЛЛ составила 19,5% в костном мозге и 37,7% в крови [28]. Пациенты, включенные в это исследование, были пожилыми людьми или имели сопутствующие заболевания. Несмотря на эти отягчающие факторы, программу терапии больные переносили хорошо. Наиболее частыми побочными эффектами являлись реакции, связанные с введением обинутузамаба при первой инфузии (20%) и нейтропения 3–4-й степени.

В исследовании GREEN больные ХЛЛ получали комбинированную терапию обинутузамабом и бендамустином [29]. Частота достижения ОО в этой группе составила 78,5%, а у 32,2% больных достигнута ПР. У значительного числа

Таблица 2

Клинические исследования эффективности таргетных препаратов в терапии ХЛЛ

Препарат	Исследование	БПВ (в группе исследователя-препарата)	Частота достижения МОБ-негативной ремиссии
Ибрутиниб	RESONATE, P/P ХЛЛ, ибрутиниб в сравнении с офатумумабом RESONATE-17, P/P ХЛЛ и терапия 1-й линии больных с del17p RESONATE-2, 1-я линия терапии ХЛЛ, ибрутиниб в сравнении с хлорамбуцилом HELIOS, P/P ХЛЛ, BR + ибрутиниб в сравнении с BR + плацебо	26 мес – 75% 12 мес – 79% 18 мес – 94% 24 мес – 74,8 и 20,9 мес соответственно	18 и 4,8% ($p < 0,0001$)
Иделалисид	Study 116, P/P ХЛЛ, иделалисид + ритуксимаб в сравнении с ритуксимабом Study 115, P/P ХЛЛ, BR + иделалисид в сравнении с BR + плацебо Фаза II иделалисид + ритуксимаб в 1-й линии терапии больных старше 65 лет	Медиана 19,4 мес Медиана 23,1 мес 36 мес – 83%	
Венетоклак	Фаза I, P/P ХЛЛ, монотерапия венетоклаксом Фаза Ib, P/P ХЛЛ, венетоклак + ритуксимаб	Медиана 25 мес 24 мес – 83%	55,5% 49%
Обинутузумаб	CLL11, 1-я линия терапии и P/P ХЛЛ, обинутузумаб+хлорамбуцил, в сравнении с ритуксимабом+хлорамбуцил и монотерапии хлорамбуцилом	Медиана 26,7 мес	19,5%

Примечание. P/P – рефрактерный/рецидивирующий; BR – бендамустин, ритуксимаб.

больных МОБ не выявлялась при анализе костного мозга (у 28%) или крови (у 59%). Наиболее частыми серьезными нежелательными явлениями были нейтропения (у 10,8%), лихорадка (у 7,6%) и синдром лизиса опухоли (у 5,1%).

При использовании венетоклакса, перорального ингибитора белка BCL-2, участвующего в апоптозе клеток, в качестве монотерапии ХЛЛ частота ОО составила 79%, а ПР достигнута у 20% больных [30]. У 17 из 23 больных, достигших ПР, произведена оценка МОБ. Частота МОБ-негативного статуса отмечена у 6 (35%) из 17 больных. В другом исследовании [31], где прием венетоклакса сочетался с введениями ритуксимаба, МОБ-негативный статус достигнут у 26 (53%) из 49 больных. Среди побочных эффектов, связанных с приемом венетоклакса, чаще всего наблюдали нейтропению, диарею, тошноту, анемию, инфекции верхних дыхательных путей, тромбоцитопению и усталость. Следует также отметить, что применение венетоклакса часто приводит к таким серьезным жизнеугрожающим нежелательным явлениям, как синдром лизиса опухоли, несмотря на постепенную эскалацию дозы препарата.

На сегодняшний день проводят большое количество исследований по изучению эффективности и безопасности программ лечения ХЛЛ с включением в них ибрутиниба. Ибрутиниб – мощный низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы Брутона (БТК), которая является компонентом сигнальных путей, начинающихся с пре-В-клеточного и В-клеточного рецепторов, и играет важную роль в созревании и функционировании В-лимфоцитов.

Клиническая эффективность ибрутиниба при ХЛЛ оказалась весьма высокой. На начальном этапе исследования фаз IB/II (PCYC1102/1103) была отмечена быстрая регрессия лимфаденопатии, сопровождающаяся увеличением лимфоцитоза, который впоследствии сохранялся на протяжении достаточно длительного времени [32]. Это наблюдение, которое является универсальным при терапии ингибиторами БТК, привело к определению новой категории ответа на терапию «частичная ремиссия с лимфоцитозом» (больные, которые отвечают всем критериям ЧР, но с сохранением лимфоцитоза). Со временем, когда количество лимфоцитов уменьшается, ответ расценивают как ЧР в соответствии со стандартными критериями [14].

В первоначальном докладе частота ОО при монотерапии ибрутинибом составила 71%, при 75% 26-месячной БПВ у больных, ранее получавших минимум одну линию терапии (медиана линий терапии была равна 4). Результаты этого исследо-

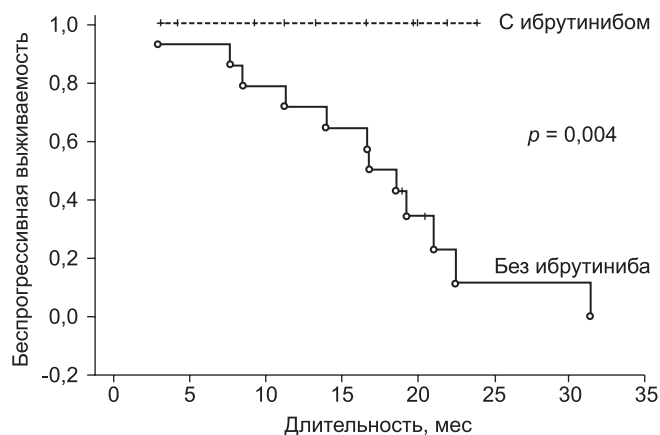
вания привели к тому, что Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в феврале 2014 г. одобрило применение ибрутиниба для больных ХЛЛ после по крайней мере одной предшествующей линии терапии [33].

Подтверждающим высокую эффективность терапии ибрутинибом стали последующие результаты исследования RESONATE, в котором больные с прогрессированием/рецидивом ХЛЛ были рандомизированы в группы, получавших ибрутиниб или офатумумаб [34]. Результаты показали более длительную БПВ ($p < 0,001$) и ОВ ($p = 0,005$) в группе ибрутиниба. В другое исследование фазы II (RESONATE-17) были включены пациенты, имевшие прогностически неблагоприятную генетическую аномалию (del17) и ранее получившие хотя бы одну линию терапии [35]. Первые результаты продемонстрировали 79% 12-месячную БПВ. На основании этих данных FDA в июле 2014 г. окончательно одобрила ибрутиниб для больных ХЛЛ после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии, а также для больных с делецией 17p в любой линии терапии [36].

По результатам 3-летнего периода наблюдения в исследовании фаз IB/II частота ОО у больных с рецидивирующим/рефрактерным течением ХЛЛ увеличилась до 90 с 7% ПР [32]. Медиана длительности терапии составила 23 мес, при этом 53% больных продолжают прием препарата. БПВ через 30 мес составила 69%, при этом медиана БПВ у больных с делецией 17p составила 28 мес; в группе больных с делецией 11q БПВ составила 74% через 30 мес, а среди больных без указанных генетических аберраций – 87%.

Ибрутиниб в целом хорошо переносится, а наиболее частые побочные эффекты включали диарею легкой степени, тошноту, экхимозы и артралгии. Значимыми побочными эффектами в большинстве исследований были фибрилляция предсердий, которая чаще встречалась в группе принимающих ибрутиниб – 5%, а также риски возникновения кровотечений, которые могут быть связаны между собой по крайней мере частично в связи с торможением коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов [24, 32, 34].

Публикуется все больше данных об эффективности ибрутиниба в качестве терапии 1-й линии. В исследование фаз IB/II был включен 31 больной старше 65 лет, ранее не получавший терапию [32]. После 30-месячного периода наблюдения 81% больных остались в исследовании с частотой ОО 84%, при этом 23% больных имели ПР. БПВ составила 96% через 30 мес с одним рецидивом заболевания и смертью больного с делецией 17p.



Беспрогрессивная выживаемость у больных ХЛЛ в зависимости от программы терапии.

В исследование RESONATE-2 включены больные ХЛЛ старше 65 лет и без делеции 17p, ранее не получавшие лечение [37]. Пациенты были рандомизированы в группы: 1-я группа – монотерапия ибрутинибом; 2-я группа – монотерапия хлорамбуцилом. В группе получавших ибрутиниб БПВ была значительно выше (18-месячная 94%; ОР 0,16; $p = 0,001$) так же, как и частота ОО и ОВ. В настоящее время 87% больных продолжают принимать ибрутиниб. Наиболее серьезными побочными эффектами среди 136 больных в группе ибрутиниба были кровотечения (5 случаев), внезапная смерть (2 больных), артериальная гипертензия (14%), фибрилляция предсердий (6%). На основании результатов этого исследования FDA в начале марта 2016 г. одобрила монотерапию ибрутинибом в качестве 1-й линии терапии больных ХЛЛ [38].

Также доказано повышение эффективности стандартной химиоиммунотерапии при включении в программу ибрутиниба [39]. В настоящее время проводится исследование III фазы (HELIO) у 578 больных с рецидивирующим/рефрактерным течением ХЛЛ. Больных рандомизировали поровну на две группы: 1-я группа – химиоиммунотерапия по программе BR + ибрутиниб; 2-я группа – BR + плацебо. Медиана наблюдения в настоящее время составляет 25,4 мес. В течение всего времени наблюдения отмечается тенденция в увеличении БПВ в 1-й группе (БПВ не достигнута) по сравнению со 2-й группой (БПВ 14,2 мес); $p < 0,0001$; 2-летняя БПВ – 74,8 и 20,9% соответственно. Медиана ОВ до сих пор не достигнута в обеих группах ($p = 0,0587$), 2-летняя ОВ составила 86,2% в 1-й группе и 81,5% во 2-й группе. Частота ОО составила 87,2% в группе с ибрутинибом против 66,1% в группе с плацебо ($p < 0,0001$), при этом ПР и ПР с неполностью восстановившимся костно-мозговым кроветворением (ПРН) были у 33,9% против 7,2% соответственно (в первом промежуточном анализе 21,4% против 5,9%). Частота МОБ-негативного статуса наблюдались у 52 (18%) из 289 больных в 1-й группе и у 14 (4,8%) из 289 больных во 2-й группе ($p < 0,0001$; в первом промежуточном отчете 12,8% против 4,8% соответственно). Следует также отметить, что 30% больных из группы, получавшей ибрутиниб, имели прогностически неблагоприятную генетическую аномалию – делецию 11q.

Несмотря на впечатляющие первоначальные результаты, в процессе наблюдения за больными ученые столкнулись с новой проблемой – прогрессирование/рецидив ХЛЛ на фоне приема ибрутиниба. В самом крупном на сегодняшний день исследовании среди больных с прогрессирующим/рецидивирующим течением ХЛЛ во время терапии ибрутинибом кумулятивная частота встречаемости синдрома Рихтера составила 4,5% в течение 1 года и была отмечена у 18 из 31 больного с рецидивом заболевания с медианой выживаемости 3,5 мес [40]. Прогрессирование/рецидив ХЛЛ, как правило,

происходит позже, но также имеет агрессивное течение с медианной ОВ 17,5 мес. Во втором исследовании медиана ОВ после прекращения приема ибрутиниба вследствие прогрессирования/рецидива ХЛЛ составила всего 3,1 мес [41].

Однако следует учесть, что в обеих работах большинство больных относились к группе неблагоприятного прогноза (наличие немутированного статуса тяжелых цепей иммуноглобулинов, делеция 17p, делеция 11q, комплексный кариотип). И тем не менее около 70% больных из этих исследований остаются на терапии ибрутинибом. Таким образом, развитие прогрессирования/рецидива ХЛЛ на фоне применения ибрутиниба становится весьма актуальным и требующим дальнейших исследований вопросом.

В «Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии» ФМБА России (Санкт-Петербург) в исследование по оценке эффективности применения ибрутиниба у больных с прогрессированием/рецидивом ХЛЛ был включен 21 больной. Стратификация больных основывалась на программе терапии: 1-я группа ($n = 14$) – 2-я и последующие линии ритуксимабсодержащей программы химиотерапии (BR – 10 больных, FCR – 4 больных); 2-я группа ($n = 12$) – ибрутинибсодержащая программа терапии (ибрутиниб ± химиоиммунотерапия). Для определения показаний к началу терапии и оценки ее эффективности использовали рекомендации Международной рабочей группы по изучению ХЛЛ (NCI-IWCLL) [14]. Оценку МОБ проводили с помощью 4-цветной ПЦ на образцах костного мозга у больных, достигших ПР или ЧР: 1-я группа – 7 больных в возрасте от 45 до 83 лет (медиана возраста 60,5 года), предшествующей терапии от 1 до 4 линий (медиана 1); 2-я группа – 5 больных в возрасте от 49 до 82 лет (медиана возраста 62,5 года), предшествующей терапии от 1 до 4 линий (медиана 2). Группы больных были однородны по клиническим характеристикам. С неблагоприятным прогнозом, основанным на выявлении генетических аномалий, были выявлены в каждой группе: в 1-й группе 2 больных – сочетание del(11q) с del(13q); во 2-й группе 1 больной с del(17p). Частота ОО в группе стандартной химиотерапии составила 71,4%, из них ПР у 1 больного, ЧР у 9, стабилизация заболевания (СЗ) у 3, прогрессирование у 1 больного. В группе с ибрутинибом частота ОО была 91,7%, из них ПР у 3, ЧР у 8, СЗ у 1 больного. Статистически значимые различия в частоте ОО между группами не выявлены ($p > 0,05$). Частота достижения МОБ-негативного статуса была у 2 (40%) из 5 больных, ПР – у 1 в группе терапии ибрутинибом по сравнению с 1 (14,3%) из 7, ПР в группе терапии без ибрутиниба. Были выявлены различия в БПВ. Медиана БПВ у больных, получавших ибрутиниб, не достигнута, а у больных без ибрутиниба составила 16,9 мес; $p = 0,004$ (см. рисунок).

Таким образом, благодаря рекомендациям FDA [42], количественная оценка МОБ после лечения уже используется в качестве альтернативного средства прогнозирования продолжительности ответа и ОВ, а необходимость ее определения постепенно выходит за рамки клинических испытаний и становится частью рутинной клинической практики. Представленные данные подтверждают высокую эффективность таргетных препаратов в достижении МОБ-негативного статуса больного, а, следовательно, пациенты могут рассчитывать на более длительную БПВ и ОВ. До сих пор остаются вопросы, которые необходимо будет решать в ближайшее время: «Какова длительность терапии?», «Частота развития вторичных опухолей?» и, наверное, самый главный «Что делать при их неэффективности?». Одним из возможных способов решения третьего вопроса является комбинированное использование таргетных препаратов. В настоящее время проводятся исследования таких комбинаций: ибрутиниба с обинутузумабом или венетоклаксом, ибрутиниба с венетоклаксом и обинутузумабом, обинутузумаба с венетоклаксом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР «Остаточная болезнь-15».

ЛИТЕРАТУРА

10. Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Михалева М.А., Абдулкадыров К.М. Хронический лимфолейкоз: прогностическое значение минимальной остаточной болезни, возможности современных методов ее выявления и коррекции (обзор литературы). *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2016; 9(2): 191–8. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-191-198.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Bosch F., Ferrer A., Villamor N., González M., Briones J., González-Barca E., et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(1): 155–61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1371.
2. Robertson L.E., Huh Y.O., Butler J.J., Pugh W.C., Hirsch-Ginsberg C., Stass S., et al. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood*. 1992; 80(1): 29–36.
3. O'Brien S.M., Kantarjian H.M., Cortes J., Beran M., Koller C.A., Giles F.J., et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19(5): 1414–20.
4. Eichhorst B.F., Busch R., Hopfinger G., Pasold R., Hensel M., Steinbrecher C., et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(3): 885–91. doi: 10.1182/blood-2005-06-2395.
5. Flinn I.W., Neuberg D.S., Grever M.R., Dewald G.W., Bennett J.M., Paietta E.M., et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(7): 793–8. doi: 10.1200/JCO.2006.08.0762.
6. Tam C.S., O'Brien S., Wierda W., Kantarjian H., Wen S., Do K.A., et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112(4): 975–80. doi: 10.1182/blood-2008-02-140582.
7. Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., et al. Early results of a chemotherapeutic regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(18): 4079–88. doi: 10.1200/jco.2005.12.051.
8. Hallek M., Fingerle-Rowson G., Fink A.M., Busch R.M., Mayer J., Hensel M., et al. Immunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide (FC) improves response rates and progression-free survival (PFS) of previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2008; 112(11): Abstract 325.
9. Böttcher S., Ritgen M., Fischer K., Stilgenbauer S., Busch R.M., Fingerle-Rowson G., 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; 30(9): 980–8. doi: 10.1200/JCO.2011.36.9348.
10. Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Martynkevich I.S., Kleina E.V., Mikhalova M.A., Abdulkadyrov K.M. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance of minimal residual disease and potential of modern methods of its diagnosis and therapy (literature review). *Clinical oncology: Basic Research and Clinical Practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya)*. 2016; 9(2): 191–8. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-191-198. (in Russian)
11. Moreno C., Villamor N., Colomer D., Esteve J., Gine E., Muntañola A., et al. Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(11): 4563–9. doi: 10.1182/blood-2005-09-3634.
12. Kovacs G., Böttcher S., Bahlo J., Kluth S., Ritgen M., Fink A.M., et al. Value of minimal residual disease (MRD) negative status at response evaluation in chronic lymphocytic leukemia (CLL): combined analysis of two phase III studies of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*. 2014; 124(21): 23. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/23/sso-checked=true>.
13. Eichhorst B., Fink A.M., Busch R., Kovacs G., Maurer C., Lange E., et al. Frontline chemotherapeutic with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) shows superior efficacy in comparison to bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): Final analysis of an international, randomized study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 study). *Blood*. 2014; 124(21): 19. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/19/sso-checked=true>.
14. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., 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; 111(12): 5446–56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
15. Böttcher S., Ritgen M., Pott C., Brüggemann M., Raff T., Stilgenbauer S., et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004; 18(10): 1637–45. doi: 10.1038/sj.leu.2403478.
16. Van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257–317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202.
17. Milligan D.W., Fernandes S., Dasgupta R., Davies F.E., Matutes E., Fegan C.D., et al. Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses. *Blood*. 2005; 105(1): 397–404. doi: 10.1182/blood-2004-01-0298.
18. Rawstron A.C., Kennedy B., Evans P.A., Davies F.E., Richards S.J., Haynes A.P., et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood*. 2001; 98(1): 29–35. doi: 10.1182/blood.v98.1.29.
19. Ringelstein-Harlev S., Fineman R. Minimal Residual Disease Surveillance in Chronic Lymphocytic Leukemia by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Rambam Maimonides Med. J.* 2014; 5(4): e0027. doi: 10.5041/RMMJ.10161. <http://www.rmmj.org.il/userimages/421/1/PublishFiles/446Article.pdf>
20. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Non-Hodgkin's lymphomas, version 3.2016. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nhl.pdf.
21. Strati P., Keating M.J., Wierda W.G., Badoux X.C., Calin S., Reuben J.M., et al. Lenalidomide induces long-lasting responses in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013; 122(5): 734–7. doi: 10.1182/blood-2013-04-495341.
22. Chen C.I., Paul H., Wang T., Le L.W., Dave N., Kukreti V., et al. Long-term follow-up of a phase 2 trial of single agent lenalidomide in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2014; 165(5): 731–3. doi: 10.1111/bjh.12785.
23. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., Flinn I.W., Burger J.A., Blum K.A., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(1): 32–42. doi: 10.1056/NEJMoa1215637.
24. O'Brien S., Furman R.R., Coutre S.E., Sharman J.P., Burger J.A., Blum K.A., et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(1): 48–58. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
25. Furman R.R., Sharman J.P., Coutre S.E., Cheson B.D., Pagel J.M., Hillmen P., et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(11): 997–1007. doi: 10.1056/NEJMoa1315226.
26. O'Brien S., Lamanna N., Kipps T.J., Flinn I., Zelenetz A.D., Burger J.A., et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015; 126(25): 2686–94. doi: 10.1182/blood-2015-03-630947.
27. Brown J.R., Byrd J.C., Coutre S.E., Benson D.M., Flinn I.W., Wagner-Johnston N.D., et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110δ, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123(22): 3390–7. doi: 10.1182/blood-2013-11-535047.
28. Goede V., Fischer K., Busch R., Engelke A., Eichhorst B., Wendtner C.M., et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(12): 1101–10. doi: 10.1056/NEJMoa1313984.
29. Stilgenbauer S., Ilhan O., Woszczyk D., Renner C., Mikuskova E., Böttcher S., et al. Safety and efficacy of Obinutuzumab plus Bendamustine in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: subgroup analysis of the Green Study. *Blood*. 2015; 126(23): 493. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/493/sso-checked=true>.
30. Roberts A.W., Davids M.S., Pagel J.M., Kahl B.S., Puvvada S.D., Gerecitano J.F., et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(4): 311–22. doi: 10.1056/NEJMoa1513257.
31. Ma S., Brander D.M., Seymour J.F., Kipps T.J., Barrientos J.C., Davids M.S., et al. Deep and Durable Responses Following Venetoclax (ABT-199 / GDC-0199) Combined with Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from a Phase 1b Study. *Blood*. 2015; 126(23): 830. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/830/sso-checked=true>.
32. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., Burger J.A., Blum K.A., Coleman M., et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(16): 2497–506. doi: 10.1182/blood-2014-10-606038.
33. FDA Approves Imbruvica to Treat Chronic Lymphocytic Leukemia. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-chronic-lymphocytic-leukemia-4007.html>
34. Byrd J.C., Brown J.R., O'Brien S., Barrientos J.C., Kay N.E., Reddy N.M., et al. Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(3): 213–23. doi: 10.1056/NEJMoa1400376.
35. O'Brien S., Jones J.A., Couture S., Mato A.R., Hillmen P., Tam C., et al. Efficacy and safety of ibrutinib in patients with relapsed or refractory

- chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the phase II RESONATE™-17 trial. (ASH Annual Meeting Abstracts). *Blood*. 2014; 124(21): 327. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/327?ssoc-checked=true>.
36. FDA Expands Approved Use of Imbruvica for Chronic Lymphocytic Leukemia. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-expands-approved-imbruvica-chronic-lymphocytic-leukemia-4061.html>.
37. Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M., Robak T., Owen C., Ghia P., et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(25): 2425–37. doi: 10.1056/NEJMoa1509388.
38. FDA Approves Imbruvica (ibrutinib) for the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-ibrutinib-first-line-chronic-lymphocytic-leukemia-4353.html>.
39. Fraser G., Cramer P., Demirkan F., Silva R.S., Pylypenko H., Grosicki S., et al. Ibrutinib (I) plus bendamustine and rituximab (BR) in previously treated chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): a 2-year follow-up of the HELIOS study. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34: Abstract 7525.
40. Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., Heerema N.A., Zhao W., Abruzzo L., et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol.* 2015; 1(1): 80–7. doi:10.1001/jamaoncol.2014.218.
41. Jain P., Keating M., Wierda W., Estrov Z., Ferrajoli A., Jain N., et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(13): 2062–7. doi:10.1182/blood-2014-09-603670.
42. Public Workshop on Minimal Residual Disease (MRD) as a Surrogate Endpoint in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). <http://www.fda.gov/Drugs/NewsEvents/ucm340707.htm>

Поступила 20.10.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.192-07:575.08

Субботина Т.Н.^{1,3}, Дунаева Е.А.², Миронов К.О.², Дрибноходова О.П.², Харсекина А.Е.¹,
Васильев Е.В.⁵, Хоржевский В.А.⁶, Ольховский И.А.^{1,4}, Шипулин Г.А.²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ МУТАЦИЙ В 12-М ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2

¹Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, Россия;

⁴ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, 660036, г. Красноярск, Россия;

⁵КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, г. Красноярск, Россия;

⁶КГБУЗ Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро, 660022, г. Красноярск, Россия

Соматические мутации в кодонах 532–547 12-го экзона гена *JAK2* высокоспецифичны для подтверждения диагноза истинной полицитемии. Цель настоящей работы – разработка методики для обнаружения и количественной оценки уровня аллельной нагрузки данных мутаций с использованием технологии пиросеквенирования. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе PyroMark Q24. Для верификации наличия мутаций выполняли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов. Секвенирование клонов проводили с использованием реагентов и оборудования фирмы “Applied Biosystems” (США). После подтверждения наличия мутации в клонх методом Сэнгера, образец, содержащий мутацию, повторно анализировали на приборе PyroMarkQ24 в количественном формате для определения уровня аллельной нагрузки. Среди 48 образцов ДНК от пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью диагноза истинной полицитемии и отсутствием мутации V617F в 14-м экзоне гена *JAK2* был идентифицирован один образец, содержащий наиболее распространенную в области 12-го экзона данного гена соматическую мутацию N542-E543 del. Определение уровня аллельной нагрузки проводили трижды в динамике развития заболевания с августа 2013 г. по июнь 2015 г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у пациента возрастает и за 23 мес наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза, что свидетельствует о соответствующем увеличении количества клеток трансформированного клона. В то же время до настоящего момента у пациента наблюдается клинико-гематологическая компенсация заболевания на фоне проведения умеренных терапевтических воздействий – эксфузионной и дезагрегационной терапии. Предложенная методика позволяет детектировать мутации в анализируемом фрагменте, а также проводить количественный мониторинг аллельной нагрузки в динамике заболевания с целью контроля эффективности используемой терапии.

Ключевые слова: мутации в 12-м экзоне гена *JAK2*; миелопролиферативные заболевания; истинная полицитемия; пиросеквенирование.

Для цитирования: Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Харсекина А.Е., Васильев Е.В., Хоржевский В.А., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2*. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 19(4): 196–200. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200>

Для корреспонденции:

Субботина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, старший научный сотрудник Красноярского филиала ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия. E-mail: stn.25@mail.ru.

For correspondence:

Subbotina Tatiana N., BD, PhD, assistant professor of the Department of Medical Biology of the Siberian Federal University; senior researcher Krasnoyarsk branch of the Federal State budgetary Institution Hematology Research Center. Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation. E-mail: stn.25@mail.ru

Information about authors:

Subbotina T.N., <http://orcid.org/0000-0001-7790-5033>; Dunaeva E.A., <http://orcid.org/0000-0002-4477-8506>; Mironov K.O., <http://orcid.org/0000-0001-8207-9215>; Dribnokhodova O.P., <http://orcid.org/0000-0003-4918-4907>; Kharsekina A.E., <http://orcid.org/0000-0003-3395-775X>; Vasiliev E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3780-3758>; Khorzhevskiy V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9196-7246>; Olkhovskiy I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2311-2219>; Shipulin G.A., <http://orcid.org/0000-0002-3668-6601>.

Subbotina T.N.^{1,3}, Dunaeva E.A.², Mironov K.O.², Dribnokhodova O.P.², Harsekina A.E.¹,
Vasilyev E.V.⁵, Khorzhevskiy V.A.⁶, Olkhovskiy I.A.^{1,4}, Shipulin G.A.²

USING OF PYROSEQUENCING METHOD FOR THE DETECTION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MUTANT JAK2 EXON 12 ALLELE BURDEN

¹Krasnoyarsk branch of the Federal State budgetary Institution «Hematology Research Center»

Department of Health, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Federal Budget Institute of Science «Central research institute for Epidemiology», 111123, Moscow, Russian Federation;

³Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
660036, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵Krasnoyarsk regional hospital, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁶Krasnoyarsk State Regional Bureau of Pathology, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

Somatic mutations in codons 532–547 of JAK2 exon 12 are highly specific to confirm the diagnosis of polycythemia vera (PV). The aim of this study was to develop the pyrosequencing method for the detection and quantification of JAK2 exon 12 allele burden. The nucleotide sequencing of the JAK2 exon 12 fragment was carried out with the use of “PyroMark Q24”. To verify the presence of mutations, the DNA sequences extracted from the clinical samples were cloned and obtained clones were sequenced with the use of reagents and equipment of the “Applied Biosystems” (USA). A sample containing the mutation was analyzed again after confirming the presence of mutations in clones by Sanger sequencing with “PyroMark Q24” for the quantification of the JAK2 exon 12 allele burden. Among 48 of JAK2 V617F-negative PV patients, who had a high clinical and hematological probability of PV diagnosis, a N542-E543 del mutation of JAK2 in exon 12 has been detected in the 62-years old male patient. The detection and quantification of the JAK2 exon 12 allele burden by virtue of using a pyrosequencing method for this patient was carried out three times from August 2013 to June 2015. Our results show the JAK2 N542-E543 del allele burden to increase more than twice during 23 months of following up of the patient. These data suggest about increase of the number of the transformed clonal cells. The proposed method allows detecting and carrying out quantitative determination of the mutant JAK2 exon 12 allele burden for monitoring the efficacy of the therapy.

Key words: exon 12 JAK2 mutations; myeloproliferative disease; polycythemia vera; pyrosequencing.

For citation: Subbotina T.N., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Harsekina A.E., Vasilyev E.V., Khorzhevskiy V.A., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. Using of pyrosequencing method for the detection and quantitative determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 19(4): 196–200. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 23 September 2015

Accepted 12 July 2016

Для подтверждения диагноза одного из наиболее распространенных Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ) – истинной полицитемии (ИП), в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ [1], достаточно наличия высокого содержания гемоглобина и гематокрита, а также выявления какой-либо из клинически значимых соматических мутаций в гене JAK2. Ключевым звеном патогенеза ИП является независимая активация JAK-STAT сигнального пути, чаще всего обусловленная мутацией V617F в 14-м экзоне гена JAK2 [2].

Для определенного числа V617F-отрицательных больных с клиническим диагнозом ИП характерны иные мутации в гене JAK2, происходящие в онкоассоциированной последовательности 12-го экзона (микроделеции, микроинсерции и точечные мутации, затрагивающие аминокислотные остатки в положении 532–547 белка Jak2). Согласно информации, представленной в базе данных COSMIC [3], в этом фрагменте описано более 40 соматических мутаций, встречающихся с разной частотой и имеющих клиническое значение для подтверждения ИП [4, 5]. Частота встречаемости таких мутаций среди больных ИП составляет около 5% для европейской популяции [6] и около 13% для китайской [5]. Клиническая картина течения заболевания и факторы риска развития тромбоза и вторичного миелофиброза у больных ИП, обусловленные возникновением мутации в 12-м экзоне гена JAK2, не имеют значимых отличий от соответствующих проявлений у V617F-положительных больных [7].

Для анализа как отдельных, так и всего спектра мутаций в области 12-го экзона гена JAK2 используют различные молекулярно-генетические методики, основанные на секвениро-

вании ДНК [8], модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ): аллель-специфичная ПЦР [9, 10], методы детекции мутаций на основании анализа кривых плавления [11–13], а также некоторые другие методики [14, 15]. Тем не менее ни один из предложенных методов не может одновременно и однозначно определить все возможные варианты указанных соматических мутаций ввиду их разнообразия, а также то, что уровень аллельной нагрузки соматическими мутациями в крови пациента зачастую оказывается ниже уровня чувствительности предложенного метода. В связи с этим выявление мутаций в 12-м экзоне гена JAK2 пока не является рутинной процедурой в практике клинико-диагностических лабораторий.

Ранее мы предложили метод количественного определения аллельной нагрузки мутации JAK2V617F в 14-м экзоне гена JAK2 методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 [16].

Цель настоящей работы – разработка методики для обнаружения и количественной оценки уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в кодонах 532–547 12-го экзона гена JAK2 методом пиросеквенирования.

Материал и методы

Анализ 12-го экзона гена JAK2 проводили на 48 образцах ДНК, собранных в лаборатории Красноярского филиала Гематологического научного центра в период 2012–2015 гг. от пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью диагноза ИП и отсутствием мутации V617F в 14-м экзоне гена JAK2. Отсутствие мутации V617F для всех образцов определено с помощью коммерческой тест-системы фирмы «Литех»

Результаты клинико-гематологического исследования и анализа уровня аллельной нагрузки мутацией N542-E543 del в динамике течения заболевания у обследуемого пациента

Показатель	Август 2013 г.	Январь 2015 г.	Июнь 2015 г.
Гемоглобин, г/л	156	181	134
Гематокрит, %	49,9	61,6	48,4
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,5	9,76	7,82
Ретикулоциты, %	1,43	-	2,05
Фракция незрелых ретикулоцитов, %	12,1	-	36,7
Ретикулоциты с низкой флюоресценцией, %	87,9	-	63,3
Ретикулоциты со средней флюоресценцией, %	10,2	-	19,7
Ретикулоциты с высокой флюоресценцией, %	1,9	-	17
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	5,14	9,13	8,35
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	2	2,27	2,20
Лимфоциты, %	25	24,9	26,3
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	182	102	237
Размер селезенки, см	11,2 $\times$ 6,2	13,6 $\times$ 6,2	12,7 $\times$ 5,7
Уровень аллельной нагрузки, %	15	28	36

(ПЦР-РВ), а также подтверждено при использовании набора реагентов АмплиСенс Пироскрин. Выделение ДНК проводили из лейкоцитов 250 мкл цельной периферической крови с помощью набора ДНК-сорб-В (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии, Москва).

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента 12-го экзона гена *JAK2* проводили с помощью технологии пиросеквенирования по методике, описанной К.О. Мироновой и соавт. [17].

Все реагенты для постановки ПЦР и процедуры пробоподготовки продуктов амплификации произведены ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии («АмплиСенс», Россия). Для амплификации фрагмента длиной 155 п.о., содержащего анализируемую область 12-го экзона гена *JAK2*, были использованы следующие праймеры: CTCACCAACATTACAGAGGCCTACT (прямой праймер) и biotin-GTCACATGAATGTAAATCAAGAAAACAGATG (обратный праймер). Амплификацию проводили в объеме 25 мкл. Смесь для проведения реакции готовили следующим образом: 5 мкл смеси, содержащей праймеры и дезоксинуклеозидтрифосфаты, смешивали с 0,5 мкл реактива полимеразы TaqF, 9,5 мкл 2,5xПЦР-буфера blue и 10 мкл выделенной ДНК. Постановку ПЦР проводили на приборе МахуGene («Axygen», США) по следующей программе: 95 °C – 15 мин; 95 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 20 с (45 циклов).

Анализ продуктов амплификации проводили на приборе PyroMark Q24 (версия программного обеспечения 2.0.6) с использованием набора реагентов PyroMark Gold («Qiagen», Германия). Для получения более точных результатов секвенирование каждого клинического образца проводили с использованием двух праймеров: CTCACCAACATTACAGAGGCCTACT (S1) и GCCTACTCATATGAACCAAATGG (S2). Пиросеквенирование проводили в формате *de novo* (SQA), последовательность добавления нуклеотидов: G, A, C и T 20 циклов.

Параллельно с клиническими образцами анализировали контрольный образец, не содержащий мутацию, ПКД ДНК человека («АмплиСенс», Россия). Полученные данные сохранялись в виде файлов *.xlsx и далее относительные высоты сигналов, соответствующие нуклеотидам в последовательности анализируемого локуса анализировали на наличие каких-либо отклонений от результатов контрольного образца дикого типа.

Для верификации наличия мутаций в образцах с отклонениями от последовательности «дикого типа» проводили секвенирование методом Сэнгера (Sanger) [18]. Для этого ДНК, выделенную из этих клинических образцов, клонировали в вектор pGem-T по стандартной методике («Promega», США) [19].

Секвенирование клонов проводили с помощью реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» (США). После подтверждения мутации в кломах методом Сэнгера образец, содержащий мутацию, повторно анализировали на приборе PyroMark Q24. Анализ проводили в количественном формате (AQ) с использованием последовательности добавления нуклеотидов, соответствующей обнаруженной мутации, для определения уровня аллельной нагрузки выявленной мутации в образце.

Обработку полученных данных проводили с помощью стандартных средств программных возможностей MS Excel.

Результаты

В результате проведенного тестирования с использованием технологии пиросеквенирования из 48 клинических образцов был обнаружен один образец, содержащий наиболее распространенную в области 12-го экзона гена *JAK2* соматическую мутацию N542-E543 del.

Больной, в гене *JAK2* которого обнаружена мутация, мужчина в возрасте 62 лет. На момент диагностики заболевания в июле 2013 г. у больного присутствовал выраженный плеторический синдром, спленомегалия не выявлялась, в периферической крови отмечались повышенная концентрация гемоглобина (204 г/л), гематокрита (71,5%) и количества эритроцитов ($6,43 \times 10^{12}/л$). При этом количество лейкоцитов ($8 \times 10^9/л$) и тромбоцитов ($250 \times 10^9/л$) не превышало норму. На фоне проведения 7 эксфузий крови по 450–500 мл (июль–август 2013 г.) достигнута клинико-гематологическая компенсация заболевания. В течение последующих 18 мес наблюдения у больного медленно рецидивировало полнокровие, сохранялась артериальная гипертензия, амбулаторно проводили терапию дезагрегантами и гипотензивными средствами. В январе–феврале 2015 г. больному выполнен повторный курс кровопусканий (4 кровопускания по 450–500 мл крови). Увеличение селезенки в это время пальпаторно не зарегистрировано, но однократно по данным ультразвукового исследования в феврале 2015 г. отмечалось увеличение ее размера до 13,6 $\times$ 6,2 см (умеренная спленомегалия). Через 5 мес, при очередном контрольном обследовании (июнь 2015 г.) отмечена симптоматика умеренного полнокровия, при этом спленомегалия и панцитоз в гемограмме отсутствовали.

В целом за все время наблюдения за пациентом (июль 2013 г. – июнь 2015 г.) можно отметить, что содержание гемоглобина, гематокрита и эритроцитов на фоне проведения эксфузий либо умеренно превышало норму, либо находилось на ее верхней границе (см. таблицу). Выявлено значительное увеличение фракции незрелых ретикулоцитов (как со средним, так и с высоким содержанием РНК) на фоне относительного снижения наиболее зрелых ретикулоцитов, что свидетельствует о значительном росте пролиферативной активности эритроидного ростка кроветворения. Количество тромбоцитов и лейкоцитов не имело значительных различий от нормы. Тромботических эпизодов не зарегистрировано, циторедуктивная терапия не проводится.

Диагноз ИП был подтвержден морфологическим исследованием трепанобиоптата костного мозга в августе 2015 г. При микроскопическом исследовании отмечено, что клеточность костного мозга равномерно повышена относительно возрастной нормы до 100% (норма 40–50%). Мегакариоцитарный росток был гиперплазирован, представлен большей частью (более 80%) атипичными формами, среди которых преобладают мегакариоциты больших, в меньшей степени средних размеров с нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения. Встречались клетки с гиперглобулированными ядрами и единичные «staghorn-like»-формы. Отдельные мегакариоциты были расположены паракостально, непосредственно контактируя с костными балками. Разрозненно определяются рыхлые кластеры атипичных мегакариоцитов. Эритроидный росток омоложен с наличием большого количества ранних форм, нормобластического типа с формированием большого количества эритроидных островков, в составе которых преобладают промежуточные формы. Гранулоцитарный росток гиперплазирован, определялся на всех

стадиях созревания. При импрегнации солями серебра по Гомори [20] – MF-0. Костные балки с явлениями системного остеопороза.

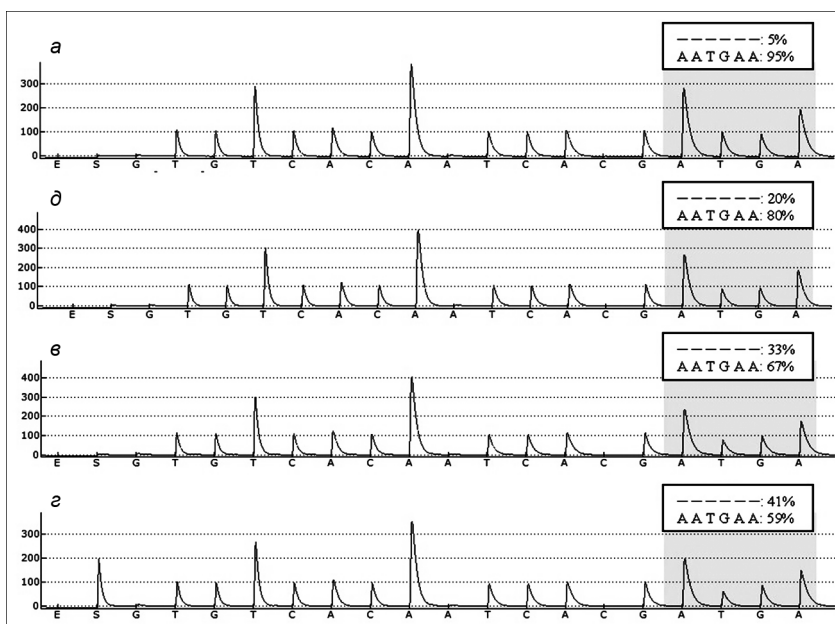
Определение уровня аллельной нагрузки мутацией N542-E543 del проводили трижды в динамике развития заболевания на образцах ДНК, полученных из лейкоцитов цельной крови больного в августе 2013 г., январе 2015 г. и июне 2015 г. Результаты количественного анализа всех трех проб ДНК методом пиросеквенирования приведены на рисунке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у больного возрастает и за 23 мес наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза.

Обсуждение

В литературе описаны [21, 22] примеры определения уровня аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* в динамике заболевания, но до сих пор не было описано случаев, когда за наблюдаемый период времени происходило бы ее значимое и одностороннее изменение. L. Kjær и соавт. [21] описали 3 случая наблюдения за изменением уровня аллельной нагрузки при различных вариантах мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2* (в том числе и при наличии мутации N542-E543 del), а также при изначально различном уровне аллельной нагрузки в течение 429, 735 и 203 дней соответственно. Показано, что аллельная нагрузка во всех случаях оставалась стабильной в течение длительного времени наблюдения. A. Theodorides и соавт. [22] также описали случаи стабильного состояния аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* в динамике заболевания для 3 больных ИП в течение 2, 3 и 4,5 лет. Причем у 2 из 3 больных циторедуктивной терапии не было в течение всего времени наблюдения, а 1 больной принимал гидроксимочевину уже на момент начала исследования. В нашем исследовании наблюдается явное увеличение аллельной нагрузки в динамике заболевания. В то же время нужно отметить, что на фоне обнаруженного повышения аллельной нагрузки за данный период времени у обследуемого нами больного не выявлено отрицательной клинической динамики (симптоматика полнокровия умеренная, панцитоз в гемограмме отсутствует, спленомегалия и тромботических осложнений нет).

Представленные данные получены при исследовании ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови со стабильным соотношением лимфоцитов и гранулоцитов (см. таблицу), что исключает вероятность ошибок [21, 23] количественного анализа аллельной нагрузки, обусловленных возможным различием соотношения ДНК-содержащих клеток гранулоцитарного и лимфоцитарного ряда в разные дни взятия крови.

Обнаруженный в нашей работе процесс роста аллельной нагрузки свидетельствует о двукратном увеличении количества клеток трансформированного клона в динамике заболевания у обследованного больного. В то же время до настоящего момента у больного имеется клинико-гематологическая компенсация заболевания на фоне проведения умеренных терапевтических воздействий – эксфузионной и дезагрегационной терапии. В литературе мы не обнаружили данных о риске развития серьезных осложнений ИП при увеличении аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2*, и вопрос обоснованности превентивного терапевтического воздействия с целью редукции трансформированных клеток остается открытым. Предлагаемый нами метод количественного определения аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* будет полезен в клинических исследованиях для



Результаты анализа соматической мутации N542-E543 del методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24. В области выделенных 6 нуклеотидов детектируется делеция в одном из аллелей гена. Об этом свидетельствует снижение уровня сигнала для встраиваемых нуклеотидов в данной области. Количественный расчет соотношения интактных и мутантных молекул ДНК в образцах из венозной крови (аллельная нагрузка) выполняется программным обеспечением прибора.

a – результат анализа образца ДНК «дикого типа» (без мутации); б – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (август 2013 г.); в – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (январь 2015 г.); г – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (июнь 2015 г.).

объективного мониторинга молекулярной прогрессии заболевания и эффективности терапии при ИП.

Таким образом, предложенная методика позволяет детектировать мутации в анализируемом (примыкающем к началу псевдокизного домена гена *JAK2*) фрагменте и проводить количественный мониторинг аллельной нагрузки в динамике развития заболевания, а также может использоваться для контроля эффективности элиминации трансформированного клеточного клона. Предел чувствительности обнаружения соматических мутаций методом пиросеквенирования находится в диапазоне 2–5% мутантной фракции [16, 24–26] и при необходимости может быть увеличен за счет обогащения доли мутантной фракции [27]. Технология пиросеквенирования представляет собой быстрый точный и надежный подход с высокой пропускной способностью для исследования и других мишеней, подобных 12-му экзону гена *JAK2*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

16. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т.Н., Башмакова Е.Е., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 11: 60–3.
 17. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 4: 39–48.
 20. Лилли Р. *Патогистологическая техника и практическая гистология*. Пер с англ. М.: Мир; 1969.
 25. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Демидова И.А., Баринин А.А., Войцеховская Я.А. и др. Выявление активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 6: 49–51.
- Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 WHO criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1): 14–22.

2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464): 1054–61.
3. Catalog of somatic mutations in cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
4. Scott L.M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011; 86(8): 668–76.
5. Wu Z., Zhang X., Xu X., Chen Y., Hu T., Kang Z., et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 48. doi: 10.1186/s13045-014-0048-6.
6. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A., Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007; 21(9): 1960–3.
7. Passamonti F., Elena C., Schnittger S., Skoda R.C., Green A.R., Girodon F., et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117(10): 2813–6.
8. Pietra D., Li S., Brisci A., Passamonti F., Rumi E., Theodorides A., et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 111(3): 1686–9.
9. Scott L.M., Tong W., Levine R.L., Scott M.A., Beer P.A., Stratton M.R., et al. Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(5): 459–68.
10. Percy M.J., Scott L.M., Erber W.N., Harrison C.N., Reilly J.T., Jones F.G., et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica*. 2007; 92(12): 1607–14.
11. Jones A.V., Cross N.C., White H.E., Green A.R., Scott L.M. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica*. 2008; 93(10): 1560–4.
12. Ugo V., Tondeur S., Menot M.L., Bonnin N., Le Gac G., Tonetti C., et al.; French Intergroup of Myeloproliferative disorders. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8893.
13. Schnittger S., Bacher U., Haferlach C., Geer T., Müller P., Mittermüller J., et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica*. 2009; 94(3): 414–8.
14. Laughlin T.S., Moliterno A.R., Stein B.L., Rothberg P.G. Detection of exon 12 Mutations in the JAK2 gene: enhanced analytical sensitivity using clamped PCR and nucleotide sequencing. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(3): 278–82.
15. Furtado L.V., Weigelin H.C., Elenitoba-Johnson K.S., Betz B.L. A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. *J. Mol. Diagn.* 2013; 15(5): 592–9.
16. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. The quantitative testing of V617F mutation in gen JAK2 using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 59(11): 60–3. (in Russian)
17. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Detection of genetic polymorphism with the use of Genetic analysis based on pyrosequencing PYROMARK Q24. *Directory manager of clinical laboratory diagnostics. Russian Journal (Spravochnik zaveduyushchego KDL)*. 2011; 4: 39–48. (in Russian)
18. Lillie R.D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: McGraw Hill Book Co; 1965.
19. Kjaer L., Westman M., Hasselbalch Riley C., Høgdall E., Weis Bjerrum O., Hasselbalch H. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay for determination of mutant JAK2 exon 12 allele Burden. *PLoS One*. 2012; 7(3): 1–8.
20. Theodorides A., Passweg J.R., Medinger M., Looser R., Li S., Hao-Shen H., et al. The allele burden of JAK2 mutations remains stable over several years in patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008; 93(12): 1890–3.
21. Li S., Kralovics R., De Libero G., Theodorides A., Gisslinger H., Skoda R.C. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008; 111(7): 3863–6.
22. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G., Hafez M.J., Gocke C.D., Eshleman J.R., et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(4): 425–32.
23. Dribnokhodova O.P., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Demidova I.A., Barinov A.A., Voytsekhovskaya Ya.A., et al. The detection of activating somatic mutations in gene kras using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2013; 58(6): 49–51. (in Russian)
24. Xie G., Xie F., Wu P., Yuan X., Ma Y., Xu Y., et al. The mutation rates of EGFR in non-small cell lung cancer and KRAS in colorectal cancer of Chinese patients as detected by pyrosequencing using a novel dispensation order. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015; 34(1): 63. doi: 10.1186/s13046-015-0179-9.
25. Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(1): e2. doi: 10.1093/nar/gkq899/

Поступила 23.09.15

Принята к печати 12.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.2-036.11-036.86-07

Комков А.Ю.^{1,2}, Мирошниченкова А.М.², Ольшанская Ю.В.², Мякова Н.В.², Дьяконова Ю.Ю.²,
Минервина А.А.¹, Мамедов И.З.¹, Лебедев Ю.Б.¹, Масчан А.А.², Масчан М.А.²

ДЕТЕКЦИЯ ПЕРЕСТРОЕК ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

¹ФАНО России ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии, иммунологии
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Мониторинг минимальной остаточной болезни является одним из важнейших инструментов при терапии острых лимфобластных лейкозов. Однако применение его в клинической практике имеет ряд существенных ограничений, связанных с методологическими сложностями, высокой стоимостью и зачастую неоднозначностью интерпретации результатов. В данной работе описывается система для идентификации клональных перестроек в локусах иммуноглобулиновых генов с использованием метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Проведена апробация системы на 17 клинических образцах, взятых у детей, больных В-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Для 16 исследованных образцов обнаружено от 1 до 6 различных перестроек иммуноглобулиновых генов. Сравнение новой системы с традиционно используемой системой BIOMED-2 показало высокую корреляцию результатов. Дальнейшее развитие системы позволит создать высоконадежный и чувствительный метод для мониторинга минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз; минимальная остаточная болезнь; перестройки иммуноглобулиновых генов; высокопроизводительное секвенирование.

Для цитирования: Комков А.Ю., Мирошниченкова А.М., Ольшанская Ю.В., Мякова Н.В., Дьяконова Ю.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б., Масчан А.А., Масчан М.А. Детекция перестроек иммуноглобулиновых генов при острых лимфобластных лейкозах с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 200-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204>

Komkov A.Yu.^{1,2}, Miroshnichenkova A.M.², Olshanskaya Yu.V.², Myakova N.V.², Diakonova Yu.Yu.²,
Minervina A.A.¹, Mamedov I.Z.¹, Lebedev Yu.B.¹, Maschan A.A.², Maschan M.A.²

DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN GENES REARRANGEMENTS IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA USING HIGHTHROUGHPUT NEXT GENERATION SEQUENCING

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
Moscow, 117997, Russian Federation

²D. Rogachev Federal Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Moscow, 117997, Russian Federation

Monitoring of minimal residual disease (MRD) proved to be a valuable tool for predicting relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, the universal use of MRD monitoring in routine clinical practice is limited because current MRD assays have some methodological difficulties, high price and ambiguity of assay results interpretation. Here we describe next generation sequencing based system for the detection of clonal rearrangements in immunoglobulin genes loci. We performed testing of the system on 17 initial bone marrow samples from B-ALL patients. We revealed 1 to 6 characteristic immunoglobulin genes rearrangements in each of 16 samples. These results are in a good accordance with the results obtained by traditional BIOMED-2 assay. Further improvement of the reported system will provide highly reliable and sensitive technique for MRD monitoring.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; minimal residual disease; immunoglobulin genes rearrangements; highthroughput sequencing.

For citation: Komkov A.Yu., Miroshnichenkova A.M., Olshanskaya Yu.V., Myakova N.V., Diakonova Yu.Yu., Minervina A.A., Mamedov I.Z., Lebedev Yu.B., Maschan A.A., Maschan M.A. Detection of immunoglobulin genes rearrangements in patients with acute lymphoblastic leukemia using highthroughput next generation sequencing. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(4): 200-204. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204>

Acknowledgments. The study was supported by Grant of Ministry of Education and Science of the Russian Federation (RFMEF160414X0118).
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 10 November 2016
Accepted 22 November 2016

Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) при лейкозах является одним из важнейших инструментов прогнозирования течения заболевания и определения терапевтической стратегии [1]. Для мониторинга МОБ используют различные маркеры и методологические подходы. В опухолевых клетках при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) достаточно часто обнаруживаются перестройки локусов иммуноглобулиновых рецепторов, которые происходят по механизму V(D)J-рекомбинации. Поскольку в результате V(D)J-рекомбинации может образоваться огромное количество вариантов, такой вид маркера удобно использовать для мониторинга МОБ: конкретная перестройка отсутствует в нормальных клетках и уникальна для абнормального клона, а значит ее обнаружение в костном мозге после химиотерапии однозначно указывает на наличие лейкоэмических клеток. Первичная идентификация иммуноглобулиновых перестроек, характерных для патогенного клона при ОЛЛ, на первый взгляд не представляет существенной проблемы: содержание опухолевых клеток в клиническом образце костного мозга или крови пациента составляет от 20 до 95%. Такую идентификацию стандартно проводят с использованием набора BIOMED-2 [2]. Данная система основана на ПЦР-амплификации локусов генов иммуноглобулиновых рецепторов с помощью не-

скольких смесей праймеров с последующим секвенированием полученных ампликонов по методу Сэнгера. Несмотря на широкое использование данной системы на протяжении последних 15 лет, она имеет ряд недостатков, наиболее существенным из которых является невозможность идентификации диагностических перестроек, произошедших в обоих аллелях одного локуса. Кроме того, использование набора BIOMED-2 достаточно трудоемко и для идентификации перестройки требуется довольно много времени. В связи с этим несколькими исследовательскими группами был предложен подход, при котором детекцию перестроек проводят с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (High Throughput Sequencing – HTS или Next Generation Sequencing – NGS) [3–5]. Использование нового метода позволяет различать перестройки двух аллелей в одном локусе и при определенных условиях сократить время и стоимость анализа в расчете на один образец. На основе проведенных исследований были разработаны коммерчески доступные наборы (например, LymphoTrack, InvivoScribe). Однако созданные наборы не позволяют анализировать полную панель перестроек, так как содержат набор праймеров лишь для части иммуноглобулиновых генов.

В данной работе мы описываем созданную оригинальную систему для первичной детекции перестроек иммуноглобулиновых локусов. Разработанная система позволяет проводить детекцию перестроек во всех иммуноглобулиновых локусах, используемых в стандартном наборе BIOMED-2. Проведена апробация системы на наборе из 20 первичных образцов, взятых у больных ОЛЛ.

Материал и методы

В исследование были включены 17 детей больных ОЛЛ в возрасте от 1 года до 15 лет (медиана возраста 4 года). В выборку были включены больные с различным типом В-ОЛЛ по результатам исследования с цитофлюориметрическим окрашиванием образцов (см. таблицу). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФНЦ ДГОИ.

Библиотеки для массивного секвенирования получали в ходе двух этапов ПЦР-амплификации. На обоих этапах каждую ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1X TERSUS Buffer («Евроген», Россия), 1X полимеразу TERSUS («Евроген», Россия), 5 нмоль каждого нуклеозидтрифосфата («Thermo Scientific», США).

Для корреспонденции:

Масчан Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора, директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФНЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. E-mail: mmaschan@yandex.ru.

For correspondence:

Maschan Michael A., MD, PhD, deputy-director of the Dmitriy Rogachev Research Center for pediatric hematology, oncology and immunology. Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: mmaschan@yandex.ru.

Information about authors:

Komkov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9113-698X>; Miroshnichenkova A.M., <http://orcid.org/0000-0003-1833-0430>; Olshanskaya Yu.V., <http://orcid.org/0000-0002-2352-7716>; Myakova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-4779-1896>; Diakonova Yu.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-8725-7532>; Minervina A.A., <http://orcid.org/0000-0001-9884-6351>; Mamedov I.Z., <http://orcid.org/0000-0002-3992-9285>; Lebedev Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-4554-4733>; Maschan A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>; Maschan M.A., <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>.

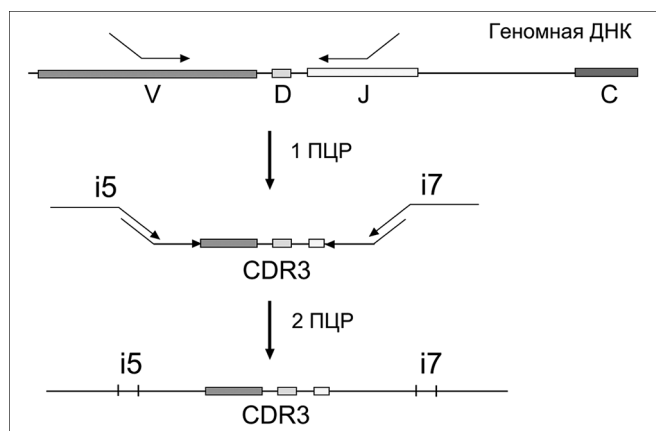


Схема получения библиотек для секвенирования на платформе Illumina. Прямоугольниками разных цветов обозначены геномные сегменты (V, D, J) из которых формируется перестройка в результате рекомбинации. CDR3 – гипервариабельный участок; i5 и i7 – 8-нуклеотидные баркоды образца Illumina.

На первом этапе для каждого образца ДНК выполняли 8 мультиплексных ПЦР, каждая из которых содержала по 40 нг геномной ДНК и соответствующий набор олигонуклеотидных праймеров (5 пмоль каждого). Амплификацию проводили методом "touchdown": предварительный прогрев 95 °С 2 мин, затем четыре цикла с профилем 95 °С 20 с, 68 °С 20 с, 72 °С 40 с, каждые следующие четыре цикла ПЦР осуществляли при пониженной на 2 °С температуре отжига вплоть до достижения 60 °С, затем на последних 15 циклах амплификации температуру отжига поднимали до 72 °С. По завершении ПЦР из каждой реакционной смеси отбирали по 5 мкл, смешивали и экстрагировали ДНК с помощью 0,8 объема магнитных частиц AmPure XP Beads ("Beckman Coulter", США). Реакционная смесь для второго этапа амплификации в дополнение к указанному выше компонентам содержала в качестве матрицы экстрагированные ампликоны, полученные на первом этапе, и пару олигонуклеотидных праймеров (5 пмоль каждого). Температурный профиль амплификации включал предварительный прогрев 2 мин при температуре 95 °С и 15 циклов с профилем 95 °С 20 с, 55 °С 20 с, 72 °С 40 с. Из полученных реакционных смесей с помощью 0,8 объема магнитных частиц AmPure XP Beads экстрагировали ДНК, которую затем секвенировали на платформе Illumina (MiSeq, длина чтения 2x150). Анализ данных секвенирования проводили с помощью веб-платформы Galaxy (<https://usegalaxy.org>) и программы IgBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>).

Результаты

Описание и принцип действия системы

При разработке системы для инициальной детекции перестроек мы использовали принцип, примененный в работах [3–5] для идентификации перестроек локуса IGH. Общий принцип такого подхода проиллюстрирован на рисунке. Для получения библиотек, содержащих перестройки иммуноглобулиновых локусов, адаптированных для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina, проводят ПЦР-амплификацию в две стадии. На первой стадии в качестве матрицы используют геномную ДНК, выделенную из инициального образца костного мозга больных ОЛЛ. Для амплификации всех локусов проводят параллельную амплификацию с 8 разными наборами праймеров, соответствующих генам иммуноглобулинов (IGH, IGL, IGK) и Т-клеточных рецепторов (TRB, TRG, TRD). Наборы праймеров позволяют детектировать как полные (VDJ), так и неполные (DJ) перестройки локусов TRB и IGH. Каждый из 66 праймеров, составляющих 8 наборов, состоит из специфической 3'-части, соответствующей своему иммуноглобулиновому локусу и универсальной 5'-части, содержащей олигонуклеотиды, необходимые для секвенирования. На второй стадии амплификации вводят последовательности, необходимые для гибридизации на сиквеновую ячейку Illumina и 8 нуклеотидные баркоды образцов с двух сторон каждой молекулы

(см. рисунок, i5 и i7). Использование двойного баркодирования потенциально позволяет проанализировать до 384 индивидуальных клинических образцов за один запуск секвенатора. После двухстадийной амплификации проводят очистку полученных библиотек, после чего они напрямую секвенируются в приборе Illumina MiSeq. Общее время подготовки библиотек с момента получения геномной ДНК до запуска прибора составляет около 6 ч.

Проверка и валидация системы на клинических образцах ОЛЛ

Для проверки разработанной системы была проведена детекция перестроек шести иммуноглобулиновых локусов в 17 первичных образцах ОЛЛ (см. таблицу). В результате проведенного секвенирования и анализа полученных данных в 16 образцах были выявлены клональные маркеры опухолевых лимфоцитов, каждый из которых представляет собой нуклеотидную последовательность V(D)J-перестройки одного из иммуноглобулиновых локусов с аномально высокой долей среди всего массива сиквенов данного локуса. Число обнаруженных в одном образце перестроек варьировало от 1 до 6. Доля сиквенов, представляющих собой перестройку, варьировала от 17 до 78%. Для 1 образца перестройки не были обнаружены, а распределение численности отдельных сиквенов каждого из анализируемых локусов соответствовало таковому у здорового человека. Был проведен анализ структуры каждого из выявленных маркеров и идентифицированы V, D и J-сегменты, образовавшие каждую перестройку. Для 4 исследованных образцов было проведено определение перестройки традиционным методом, основанным на амплификации с набором праймеров BIOMED-2 и секвенировании методом Сэнгеру. Полученные результаты совпадают с результатами, полученными с использованием разработанной нами NGS-системы.

Обсуждение

Мониторинг МОБ является важным инструментом прогнозирования риска развития рецидива как у взрослых, так и у детей, страдающих ОЛЛ. Если до недавнего времени единственным методом профилактики рецидива при персистенции МОБ у больных лейкозами из предшественников В-лимфоцитов являлась токсичная и применимая далеко не у всех больных миелоаблативная терапия с трансплантацией гематопозитических предшественников, то с появлением инновационных методов иммунотерапии – биспецифических активаторов Т-лимфоцитов (блинатумомаб) и Т-лимфоцитов с химерными рецепторами (CART), которые способны эффективно элиминировать МОБ, открывает совершенно новые возможности в лечении ОЛЛ [6].

До недавнего времени для детекции МОБ применяли либо проточную цитометрию с мониторингом клеток с «лейкемическим иммунофенотипом», либо поиск и секвенирование по Сэнгеру специфических для конкретного больного реарранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов. Оба этих метода имеют свои недостатки и малоприменимы для массовых исследований, особенно в странах с большой территорией и сложной логистикой перемещения биологических образцов.

Метод высокопроизводительного секвенирования нового поколения находит все более широкое применение в клинической практике, в том числе и для мониторинга МОБ [1, 4, 5, 7–11]. Несмотря на кажущуюся дороговизну метода, его использование дает ряд существенных преимуществ по сравнению с традиционным секвенированием по Сэнгеру при сравнимой стоимости анализа в пересчете на один образец. К таким преимуществам относятся возможность различать множественные перестройки для одного иммуноглобулинового локуса, идентифицировать минорные варианты лимфоидных клонов, оценивать общее распределение патогенных и нормальных перестроек в образце. Другими словами, детекция иммуноглобулиновых перестроек с использованием NGS является более чувствительной и достоверной по

Характеристика больных и результаты идентификации перестроек иммуноглобулиновых локусов

Образец	Тип ОЛЛ	Локус	V*	D*	J*	CDR3**
10802	B3	IGH	V4-39	D2-2	J6	ARDRGL##YQLLWTLGLGVLLRYGR
		IGH	V3-30	D2-2	J6	ARG#YQLLWTLGLGVLLRYGR
		IGH		D3-3	J5	
11160	B2	IGL	V3-25		J3	QSADSSGTYPYWV
		IGH	V3-11	D2-2	J6	ARD#TGYSSTSCFTRQQTITTTTVWT
		TCRG	V11		J1	AL#E
11525	B3	IGK	V1-37		J5	QRTYNAPPPA
		TCRB	V14	D2	J2	GREGTDTQY
10575	B	IGH	V3-74	D1-26	J6	ASRSSHYQWELLEATTTTTWTS
		IGH		D1-26	J6	
16113	B2	IGH	V3-23	D2-15	J6	AQEGIL#WW#LLLRAITTTTVWTS
		IGH	V4-39	D2-15	J4	AREKQGCSGGSCYVVALTT
		IGH	V3-30	D2-15	J4	ARDDIVVVVAATLLLL#L
		TCRG	V2		JP2	ATWDGQSDWIKT
		IGK	V2-30		J2	MQGTHWPQH
16294	B2	IGH	V4-34	D2-2	J5	ARAESPYCSSTSCSTGSTP
		IGH		D3-9	J4	
		IGH		D2-2	J4	
		TCRD	V3	D3	J1	AFPRLPPG#GWPINSS
		TCRD	V3	D3	J1	ALILSSYGGGYAATDKLI
16398	B3	IGH	V2-26	D1-26	J4	ARMTAHWKDQALEDIVGATRRALT
		IGH		D3-16	J4	
		IGH		D1-26	J4	
		TCRG	V11		JP1	ACWTQAGWFKI
15801	B2	TCRG	V4		J1	ATWDGPPENYYKK
		IGH	V3-74		J6	YGMDV
		TCRB	V14		J2-3	ASSPKLRS
		TCRB	V27		J2-5	ASSLTPCHSGDPV
		IGH	V4-34	D1-7	J4	ARKLEL#L
		IGL	V3-25		J1	QSADSSGTYV
13452	B2	IGH	V1-2	D3-22	J5	ITTKGGSTP
		TCRG	V11		J1	ACWIRRIIR
		TCRG	V3		J1	ATWDRGRGLL#E
13630	B2	IGH	V3-33	D2-8	J6	AREKRNLGELGYCTNGVCYTTTTW
		IGH	V3-7	D7-27	J3	ARAGTGDRG#GF#Y
		IGK	V-26		J5	ARCTRSQVT
14006	B	IGL	V3-1		J2	QAWDSSK
		IGK	V1-37		J4	QRTYNAPPRSPLT
		IGH	V3-53	D6-6	J4	ARGGSSSSYFDY
		TCRG	V2		J1	ATWDGPEVR
14108	B	IGL	V2-14		J2	SSYTSSSTPGG
14199	B3	TCRG	V9		J1	ALWRDYYKK
		IGH	V3-30	D6-19	J4	KGDGRLVL#L
		IGH	V1-45	D5-24	J6	ATEENYYYGMDV
14379	B	TCRG	V3		J1	ATWDPQG#E
14501	B3	IGH	V3-23	D2-8	J6	AKDLQGILY#WCMLLLRYGR
		IGH	V3-30	D2-8	J6	ATSKEYCTNGVCYYYYGMDV
		TCRG	V5		J1	ATWD##IIIR
		TCRB	V4-1	D2	J2-5	ASSLAGGGGETQY
		IGL	V3-19		J3	NSRDSSGNHLGV
13603	B	IGK	V2-29		J3	MQGV
		IGH	V4-30	D2-21	J6	AEWGLNCGGDCYSDLLLLRYGR
		TCRD	V3	D3	J1	AFKTARWGIGSDKLI

Примечание. * – указаны V, D и J-сегменты образовавшие перестройку. В случае неполной перестройки локусов IGH, TRB и TRD V-сегмент отсутствует; ** – аминокислотные последовательности CDR3 для каждой перестройки; # – стоп-кодон для неполных перестроек локусов IGH, TRB и TRD последовательность CDR3 не приводится.

сравнению с традиционным подходом. Однако разработка надежной тест-системы для детекции перестроек была ограничена некоторыми методическими сложностями, к которым относятся прежде всего разработка оптимальных смесей олигонуклеотидных праймеров и алгоритм интерпретации результатов секвенирования. В приведенном исследовании разработана и протестирована такая система для детекции клональных перестроек лейкозных клеток при ОЛЛ с использованием высокопроизводительного секвенирования. В отличие от ранее разработанных наборов данная система позволяет детектировать одновременно перестройки всех иммуноглобулиновых локусов, для которых показаны перестройки при ОЛЛ.

Проведенное тестирование системы показало как ее высокую чувствительность, так и достаточно высокую достоверность при сравнении с традиционно используемым аналогом. Дальнейшее развитие данной работы предполагает исследования на большей выборке пациентов и совершенствование программного обеспечения для анализа данных секвенирования. Следующим этапом является создание интегрированной тест-системы, позволяющей проводить не только детекцию перестроек в исходном образце, но и определение непосредственно МОБ в образцах после химиотерапии. Успешная реализация данного проекта приведет к созданию высокопроизводительного метода для высокочувствительного мониторинга МОБ при ОЛЛ.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0118.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015; 125(26): 3996–4009.
2. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257–317.
3. Kotrova M., Muzikova K., Mejstrikova E., Novakova M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fiser K., et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015; 126(8): 1045–7.
4. Wu D., Sherwood A., Fromm J.R., Winter S.S., Dunsmore K.P., Loh M.L., et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(134): 134ra163. doi: 10.1126/scitranslmed.3003656.
5. Wu J., Jia S., Wang C., Zhang W., Liu S., Zeng X., et al. Minimal Residual Disease Detection and Evolved IGH Clones Analysis in Acute B Lymphoblastic Leukemia Using IGH Deep Sequencing. *Front. Immunol.* 2016; 7: 403.
6. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G., Degenhard E., Goebeler M.E., Klinger M., et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012; 120(26): 5185–7. doi: 10.1182/blood-2012-07-441030.
7. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2012; 19(4): 313–8. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283543d5c.
8. Clemente M.J., Przychodzen B., Jerez A., Dienes B.E., Afaible M.G., Husseinadeh H., et al. Deep sequencing of the T-cell receptor repertoire in CD8+ T-large granular lymphocyte leukemia identifies signature landscapes. *Blood*. 2013; 122(25): 4077–85. doi: 10.1182/blood-2013-05-506386.
9. Faham M., Zheng J., Moorhead M., Carlton V. E., Stow P., Coustan-Smith E., et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(26): 5173–80. doi: 10.1182/blood-2012-07-444042.
10. Ladetto M., Brüggemann M., Monitillo L., Ferrero S., Pepin F., Drandi D., et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28(6): 1299–307.
11. Logan A.C., Vashi N., Faham M., Carlton V., Kong K., Buno I., et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(9): 1307–13. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.04.018.

Поступила 10.11.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.382.041

Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ПЛАЗМЫ С СОХРАНЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Применение лиофилизированной плазмы имеет ряд преимуществ перед свежесамороженной плазмой (СЗП) как для оказания трансфузионной помощи в полевых условиях, так и для проведения диагностических исследований системы гемостаза. Выполнение диагностических исследований требует наличия биологических стандартов, плазм-калибраторов и контрольных материалов с высокой стабильностью целевых показателей при хранении лиофилизированных реагентов. Процесс лиофилизации плазмы вызывает значительные изменения коагулологических показателей и сопровождается повышением ее pH. Целью работы являлось получение лиофилизированной плазмы крови человека без выраженных при лиофилизации и хранении изменений активности факторов свертывания крови. Показано, что подкисление пулированной СЗП от не менее 20 доноров перед лиофилизацией до значений pH 7,0–7,1 буферным раствором HEPES в конечной концентрации 50 мМ повышало стабильность факторов системы гемостаза и сохраняло физиологический уровень pH плазмы после лиофилизации. В условиях ускоренного хранения именно такие лиофилизированные плазмы характеризовались большей стабильностью всех определяемых коагулологических показателей. Таким образом, предложенный подход позволяет получать стабильные при хранении лиофилизированные формы диагностических реагентов и контрольных материалов.

Ключевые слова: лиофилизированная плазма; pH; методы стабилизации; факторы свертывания крови; плазм-калибраторы; гемостазиологические стандарты.

Для цитирования: Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г. Получение лиофилизированной плазмы с сохраненной активностью факторов свертывания. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 204–208. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-204-208>

Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Gurvits I.D., Anisimova E.V., Savchenko V.G.

PREPARING LYOPHILIZED PLASMA WITH THE PRESERVED ACTIVITY OF COAGULATION FACTORS

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

The use of a freeze-dried plasma has a number of advantages over fresh frozen plasma (FFP) as for the provision of transfusion care in the field conditions, as well for the carrying out diagnostic studies of the hemostatic system. The execution of diagnostic tests requires for the availability of Biological Standards, plasma calibrator and control material with high stability of target indices in the storage of lyophilized reagents. Plasma lyophilization process causes significant changes in coagulation indices and is accompanied by an increase in plasma pH. The aim of the study was to obtain a freeze-dried human plasma without the pronounced changes in the activity of clotting factors under lyophilization and storage. The acidification of pooled FFP from at least 20 donors before lyophilization to pH values of 7.0–7.1 by HEPES buffer solution at a final concentration of 50 mM was shown to increase the stability of the hemostatic system factors and retain physiological plasma pH after lyophilisation. In conditions of an accelerated storage just so lyophilized plasmas are characterized by the greater stability of all determined coagulation indices. Thus, the proposed approach makes it possible to obtain storage-stable, lyophilized forms of diagnostic reagents and control materials

Key words: freeze-dried plasma; pH; stabilization methods; clotting factors; plasma calibrators; hemostatic standards.

For citation: Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Gurvits I.D., Anisimova E.V., Savchenko V.G. Preparing lyophilized plasma with the preserved activity of coagulation factors. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(4): 204–208. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-204-208>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26 September 2016

Accepted 22 November 2016

Плазма крови человека используется в клинической трансфузионной практике и является объектом диагностики при исследовании нарушений системы гемостаза. В настоящее время наиболее распространенным средством лечения коагулопатий является свежемороженая плазма (СЗП). Однако ее применение в полевых условиях и в труднодоступной местности имеет ряд ограничений, связанных с хранением и транспортировкой при необходимых для обеспечения функциональной полноценности низких температурах. Указанных недостатков лишена лиофилизированная плазма, которая для своего хранения не требует заморозки и отрицательных температур [1–3]. Эффективность плазмы человека после сублимационной сушки/регидратации показана при лечении больных гемофилией [2, 3], массивных кровотечений у военнослужащих в полевых условиях [4]. Клиническое применение лиофилизированной плазмы предполагает обеспечение ее патогенной инактивации, что в настоящее время может быть осуществлено различными методами [4–6]. Лيوфилизированная плазма только тогда пригодна для трансфузии, когда в процессе ее приготовления в ней не нарушается баланс свертывающей и противосвертывающей систем. В США запатентован метод получения стабильной вирус-инактивированной лиофилизированной плазмы, предназначенной для оказания медицинской помощи в полевых условиях. Показано, что наиболее эффективными стабилизаторами являлись глутамин-дипептиды, глутамин и глицин. Кроме обеспечения гемостатического потенциала, проведенная стабилизация белков плазмы повышала их устойчивость к γ -облучению, что позволяло стерилизовать лиофилизированный препарат. Разработанная лиофилизированная

плазма была эффективным средством лечения военнослужащих, получивших ранения в боевых условиях [7].

Важной областью применения образцов лиофилизированной плазмы является использование их для диагностики нарушений гемостаза. Выполнение таких исследований требует наличия биологических стандартов, плазм-калибраторов и контрольных материалов с высокой стабильностью при хранении. Долгосрочная стабильность и упрощенная логистика транспортировки и распределения реагентов достигаются лиофилизацией таких материалов. Оценку стабильности референсных материалов проводят в тесте ускоренного хранения (accelerated degradation tests) по критериям ВОЗ. Особое значение при получении таких материалов имеет процесс лиофилизации и анализ сублимированных реагентов по специфической целевой активности, остаточной влажности, степени окисления, термическим свойствам [1, 7, 8]. Применение качественных лиофилизированных плазм-калибраторов, субстратных плазм, стандартов, контрольных материалов и диагностикумов является также способом стандартизации исследований, обеспечивающим объективность/правильность получаемых результатов при клинической диагностике коагулопатий [1, 8–10]. Одной из основных причин диагностических ошибок при определении параметров свертывающей и противосвертывающей систем крови является недостаточная стабильность используемых в тесте реагентов. Изменения аттестованных значений происходят преимущественно в растворенном состоянии, однако и при хранении лиофилизированных материалов отмечено уменьшение активности различных факторов системы гемостаза [1, 5, 9, 11]. Наиболее выраженные изменения после лиофилизации свежемороженой вирус-инактивированной плазмы человека были характерны для факторов свертывания. Показано, что после сублимационной сушки и через 10 дней ускоренного хранения при 40°C активность факторов FV, FVII, FVIII, FIX и FX значительно снижалась, что вызывало пролонгирование тестов протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). При этом наиболее лабильными были FV и FVIII. На активность антитромбина (АТ) III, протеинов С и S лиофилизация значимого влияния не оказывала [1]. Кроме этого в плазме, подвергнутой сублимационной сушке, происходило существенное повышение величины рН с физиологических 7,1–7,4 до щелочных значений порядка 8,5, что, вероятно, и обуславливает снижение активности факторов свертывания [1, 11]. Эти изменения определяют необходимость разработки метода производства лиофилизированной плазмы с повышенной стабильностью факторов гемостаза при температуре окружающей среды, физиологических значениях рН и осмолярности. В настоящее время устойчивость гемостати-

Для корреспонденции:

Берковский Арон Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фракционирования белков крови и стандартизации методов контроля препаратов плазмы ГНЦ Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: aron56@mail.ru.

For correspondence:

Berkovskiy Aron L., MD, PhD, head of the laboratory of the Laboratory of fractionation of blood proteins and standardization of methods for control of plasma preparations of National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: aron56@mail.ru.

Information about authors:

Berkovskiy A.L., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=274100, SPIN-код: 7483-6451, Author ID: 274100; Sergeeva E.V., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=715035, SPIN-код: 9945-5440, Author ID: 715035; Suvorov A.V., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=715044, SPIN-код: 7178-4822, Author ID: 715044; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>, Researcher ID: C-6191-2016, Scopus Author ID: 8532861000.

Таблица 1
Изменения pH плазмы после лиофилизации
в зависимости от pH СЗП до сушки

Образец плазмы	pH плазмы	
	до лиофилизации	после лиофилизации
Без стабилизатора	7,35 ± 0,05	8,2 ± 0,05
Контроль	7,35 ± 0,05	7,8 ± 0,05
Опыт	7,0 ± 0,05	7,35 ± 0,05

ческих показателей в лиофилизированной плазме обеспечивают добавлением к плазме до сушки стабилизатора (преимущественно глицин), а физиологические значения pH – подкислением плазмы лимонной кислотой или добавлением различных буферных растворов [1, 7–9, 12]. Такой стабилизирующей способностью обладает буферный раствор HEPES [13].

Цель работы заключалась в исследовании возможности получения лиофилизированной плазмы крови человека с сохранением активности факторов свертывания крови при лиофилизации и хранении с помощью буферного раствора HEPES.

Материал и методы

Леофилизированную плазму получали из СЗП крови человека, характеризующейся биологической (гемостатической) полноценностью и получаемой согласно существующим требованиям [14–17]. В работе применяли СЗП доноров после карантинизации. Для исключения возможных индивидуальных различий используемых доз СЗП исследование проводили на пулированной плазме, объединяя СЗП от не менее 20 доноров. Получение лиофилизированной плазмы проводили следующим образом.

К пулированной СЗП добавляли 40% буферный раствор HEPES до конечной концентрации в плазме 50 мМ. При этом pH плазмы до лиофилизации оставляли в физиологической области 7,35 ± 0,05 (контроль) или подкисляли до 7,0 ± 0,05 (опыт). Полученную плазму разливали по 1 мл в силиконированные стеклянные флаконы, замораживали в леофильной сушке (“VirTis”, США) со скоростью изменения температуры полки -1 °C в 1 мин от комнатной температуры (24 °C) до -40 °C и выдерживали в течение 3 ч. Первичную сушку проводили при температуре -20 °C в течение 40 ч. Затем температуру повышали до 30 °C и вторичную сушку при этой температуре проводили в течение 10 ч. В этом же режиме проводили лиофилизацию СЗП без добавления стабилизатора.

Измерение активности факторов гемостаза в пробах контрольной и опытной лиофилизированной плазмы после регидратации проводили общепринятыми методами: фибриноген методом Клаусс, FV, FVIII, FIX одностадийным клоттинговым методом на коагулологическом анализаторе ACL Elite Pro (IL, США) и АТIII – хромогенным методом. Определяли также ПВ и АЧТВ. Остаточную влажность в лиофилизированной плазме измеряли по методу Фишера. Указанные показатели измеряли в пробах до и после лиофилизации/регидратации, через 7 сут ускоренного хранения при 37 °C, через 2, 4 и 24 ч хранения в разведенном (рабочем) состоянии при 24 °C. Статистическую оценку полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Леофилизация пулированной СЗП без добавления стабилизатора вызывала существенные изменения показателей гемостаза. При исследовании 5 пулированных СЗП активность FV, FVIII и содержание фибриногена после сублимационной сушки

снижались в среднем на 38, 24 и 12% соответственно. Значения АЧТВ и ПВ после лиофилизации повышались на 16 и 11%. При этом значение pH плазмы увеличивалось от 7,35 до 8,2 (табл. 1). С целью повышения буферной емкости к пулированной СЗП до лиофилизации добавляли стабилизатор, буфер HEPES, до конечной концентрации 50 мМ, не изменяя физиологических значений pH 7,3–7,4. В этом случае изменения показателей гемостаза после сублимационной сушки по сравнению с таковыми в плазме без стабилизатора были менее выраженными (табл. 2, контроль). Активность FV, FVIII и концентрация фибриногена снижались на 18, 17 и 4%, а значения АЧТВ и ПВ увеличились на 6 и 8%. При этом в процессе лиофилизации такой плазмы pH увеличился только до 7,8 ± 0,05. Затем к пулированной СЗП добавляли буферный раствор HEPES таким образом, чтобы до лиофилизации ее pH был равен 7,0–7,1, что обеспечивало в процессе сушки сохранение pH на физиологическом уровне 7,35 ± 0,05. Значения показателей гемостаза в полученной плазме после лиофилизации (опыт) представлены в табл. 2. В этих условиях активности FV и FVIII в процессе лиофилизации снижались в меньшей степени, а содержание фибриногена, величин АЧТВ и ПВ практически не изменялись; различие с таковыми в плазме без стабилизатора было статистически значимым. Остаточная влажность получаемых лиофилизированных плазм не превышала 1,5%.

Суммарные данные по результатам определения pH в семи изученных пулированных плазмах представлены в табл. 1.

На следующем этапе изучали стабильность лиофилизированной плазмы в зависимости от значений ее pH при ускоренном хранении в течение 7 дней при температуре 37 °C. Результаты в виде среднего арифметического для измерений каждого показателя в 7–10 испытуемых плазмах представлены в табл. 2.

Анализ представленных в табл. 2 данных показывает, что лиофилизация снижала активность определяемых факторов свертывания и АТ III и повышала значения ПВ и АЧТВ в плазмах с величинами pH до сублимационной сушки и 7,35 ± 0,05 и 7,0 ± 0,05 (после сушки 7,8 ± 0,05 и 7,35 ± 0,05; контроль и опыт соответственно). Статистически значимое уменьшение после лиофилизации отмечено для FV и FVIII (на 28 и 17%) только в контроле. Отсутствие статистически значимых изменений других определяемых показателей после лиофилизации в контроле может быть обусловлено стабилизирующим действием буфера HEPES и менее щелочным значением pH по сравнению с pH СЗП без стабилизатора после лиофилизации. Вызываемые сублимационной сушкой изменения величин всех гемостазиологических показателей в опытных плазмах были менее выражены по отношению к таковым и в плазме без стабилизатора и в контроле. Уменьшение активности FV и FVIII после лиофилизации плазм с pH до сушки 7,0–7,1 (после сушки 7,3–7,4) составляло только 15 и 5%.

Значительные различия величин коагулологических показателей между контрольными и опытными плазмами отмечены при их хранении в течение 7 дней при 37 °C. По сравнению с показателями в плазме до лиофилизации в контроле активности FV, FVIII и FIX статистически значимо снижались на 49, 45 и 24% соответственно, а значения ПВ и АЧТВ увеличились на 14 и 18%. В плазмах с физиологической величиной pH после сушки (опыт) эти изменения составляли 18, 12, 12, 4 и 4% соответственно. Различия степени стабильности коагулологических показателей при ускоренном хранении между контрольными и опытными плазмами были статистически значимыми ($p < 0,05$) для FV, FVIII и АЧТВ.

Таблица 2

Изменения коагулологических показателей в процессе лиофилизации и при ускоренном хранении лиофилизированной плазмы с pH до сушки 7,3 ± 0,05 (контроль) и 7,0 ± 0,05 (опыт)

Время определения	Коагулологические показатели													
	FV, %		FVIII, %		FIX, %		фибриноген, г/л		ПВ, с		АЧТВ, с		АТIII, %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До лиофилизации	128	133	95	108	112	108	2,5	2,61	13,1	13,4	33	31,7	103	98
После лиофилизации	92	113	79	103	108	104	2,4	2,6	14,2	13,3	35	32,2	96	95
Через 7 сут хранения при 37 °C	65	109	52	91	85	95	2,2	2,7	14,9	14	39	33,1	92	95

Таблица 3

Изменения коагулологических показателей при хранении лиофилизированной плазмы с рН до сушки $7,3 \pm 0,05$ (контроль) и $7,0 \pm 0,05$ (опыт) в растворенном состоянии при комнатной температуре

Время хранения при температуре 24°C	Коагулологические показатели													
	FV, %		FVIII, %		FIX, %		фибриноген, г/л		ПВ, с		АЧТВ, с		АТIII, %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
После регидратации:	92	113	79	103	108	104	2,4	2,6	14,2	13,3	35	32,2	96	95
2 ч	89	110	74	98	99	98	-	-	14,2	13,2	35,7	31,9	-	-
4 ч	85	110	70	96	97	95	-	-	14,2	13,3	36	31,4	95	94,6
24 ч	80*	107	62*	93	91	93	2,35	2,6	14,7	14,5	36	31,7	94	93,4

Примечание. * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению со значением после регидратации.

Мы также изучили стабильность показателей в тех же контрольных и опытных образцах плазмы после лиофилизации/регидратации, находящихся в разведенном состоянии при комнатной температуре в течение 1 сут. Полученные данные представлены в табл. 3. Хранение лиофилизированных образцов плазмы после регидратации при комнатной температуре в течение 24 ч вызывало снижение активности FV, FVIII и FIX как в контрольных, так и в опытных образцах плазмы. Статистически значимые различия с таковыми сразу после регидратации отмечены для FV и FVIII только в контроле. Содержание фибриногена, АТIII и значения ПВ и АЧТВ при хранении лиофилизированных образцов плазмы после их регидратации в течение 1 сут при 24 °C практически не изменялось как в контроле, так и в опыте.

Обсуждение

Плазменные факторы свертывания крови являются относительно нестабильными и поэтому требуется добавление к плазме до лиофилизации соединений, способных сохранять их функциональную активность при сублимационной сушке и последующем хранении. В настоящее время разработаны методы повышения стабильности факторов системы гемостаза за счет добавления к плазме агентов, относящихся к «полиолам», таких как сахара (сахароза, тригалаза, маннитол), глутамин-дипептиды, глутамин и глицин [1, 8, 12]. В ряде работ [1, 7, 11, 12, 18] показано, что наиболее эффективным стабилизатором гемостатических факторов в процессе лиофилизации и хранения плазмы является глицин. Глицин предотвращал снижение коагулологической активности наиболее лабильных FV и FVIII после лиофилизации и хранения на 21 и 17% соответственно и был самым эффективным из изученных «полиолов» протектором для других плазменных клоттинговых факторов. После сублимационной сушки происходит повышение рН плазмы от физиологических до щелочных [6, 11] значений, что обусловлено практически полной потерей плазмой CO_2 в процессе лиофилизации [1]. Эти изменения крайне нежелательны как при лечении больных с помощью лиофилизированной плазмы крови человека, так и при производстве лиофилизированных гемостазиологических референсных материалов с диагностической целью в связи со снижением стабильности показателей гемостаза в такой плазме. Результаты проведенных исследований [1, 11] предполагают, что для предотвращения снижения активности показателей гемостаза в лиофилизированных референсных материалах при сушке и хранении необходимо стабилизировать белки плазмы и подавлять защелачивание плазмы при лиофилизации. Задачей нашей работы являлось обеспечение сохранности активности показателей гемостаза в лиофилизированных препаратах плазмы с помощью одного активного в этом отношении соединения, а именно концентрированного буферного раствора HEPES.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что подкисление СЗП этим буфером до лиофилизации обеспечивало сохранение активности факторов свертывания в плазмах после сублимационной сушки. Проведенное исследование показало, что повышение буферной емкости плазмы при лиофилизации с помощью буферного раствора HEPES, обеспечивающие физиологические значения рН плазмы после сублимационной сушки, позволило снизить степень изменений коагулологических показателей, вызываемых лиофилизацией. Сохранение физиологических значений рН плазмы после лиофилизации согласно

полученным в работе данным обеспечивало стабильность параметров системы гемостаза в условиях ускоренного хранения. По нашему мнению, стабилизирующая белки плазмы способность буфера HEPES и подкисление с его помощью плазмы до лиофилизации обуславливали и сохранение активности факторов свертывания в течение 24 ч после регидратации лиофилизированной плазмы.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность сохранения активности коагулологических показателей при лиофилизации пулированной донорской СЗП и ее дальнейшем хранении. Повышенная стабильность системы гемостаза в лиофилизированной плазме достигалась подкислением СЗП до сублимационной сушки концентрированным буферным раствором HEPES, что сохраняло физиологические значения рН плазмы в процессе лиофилизации и хранения. Предлагаемый метод позволяет проводить сублимационную сушку СЗП без значительной потери активности факторов свертывания крови в условиях физиологического рН и длительно хранить такую лиофилизированную плазму без статистически значимых изменений величин ПВ, АЧТВ и активности коагулологических факторов. Данный подход может обеспечить получение стабильных при хранении лиофилизированных форм диагностических реагентов и контрольных материалов. После вирусной инактивации такие лиофилизированные плазмы позволяют также увеличить эффективность их клинического применения, в частности, в военно-полевых условиях.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Савиных Е.Ю. Получение лиофилизированных субстратов для исследования активности плазменных прокоагулянтов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; 1999.
- Савиных Е.Ю., Тарасова В.Н., Платонова Г.К. Субстратные плазмы в методах исследования коагуляционного гемостаза. В сборнике материалов науч.-практ. конф. «Препараты крови и кровезаменители, производство, контроль, применение», 1995, Киров; 1995: 41–3.
- Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Утв. Постановлением №29 Правительства РФ от 26.01.2010, <http://base.garant.ru/12172686/> (дата обращения 09.10.2016).
- Рагимов А.А., Щербакова Г.Н. Руководство по инфузионно-трансфузионной терапии. М.: Медицинское Информационное Агентство; 2003.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Bakaltcheva I., O'Sullivan A.M., Hmel P., Ogbu H. Freeze-dried whole plasma: Evaluation sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thromb. Res.* 2007; 120(1): 105–15.
- Krutvacho T., Chuansumrit A., Isarangkura P., Pintadit P., Hathirat P., Chiewsilp P. Response of hemophilia with bleeding to fresh dry plasma. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1993; 24 (Suppl. 1): 169–73.
- Chuansumrit A., Krasaesub S., Angchaisuksiri P., Hathirat P., Isarangkura P. Survival analysis of patients with haemophilia at the International Haemophilia Training Centre, Bangkok, Thailand. *Haemophilia.* 2004; 10(5): 542–9.
- Sailliol A. *Blood plasma lyophilization process.* Patent US 0143198 A1; 2013.
- Hellstern P., Sachse H., Schwinn H., Oberfrank K. Manufacture and in vitro characterization of a solvent/detergent-treated human plasma. *Vox Sang.* 1992; 63(3): 178–85.

6. Trobisch H. Results of a quality-control study of lyophilized pooled plasmas which have been virally inactivated using a solvent detergent method (modified Horowitz procedure). *Beitr. Infusionsther.* 1991; 28: 92–109.
7. Bakaltcheva I. *Freeze-dried plasma format for the trauma care field*. Patent US 0233671 A1; 2010.
8. Matejtschuk P., Stanley M., Jefferson P. Freeze-drying of biological standards. In: Rey L., May J.C., eds. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York, London: Informa Healthcare; 2010: 317–53.
9. Savinykh E.Yu. Preparation of lyophilized substrates for the study of plasma procoagulant activity. Dis. St.Peterburg; 1999. (in Russian)
10. Savinykh E.Yu., Tarasova V.N., Platonova G.K. Substrate plasma in the research methods of coagulation. In: Blood products and blood substitutes, production, control and application: Proceeding of the Science Practice Conference. Kirov; 1995: 41–3. (in Russian)
11. Hugler P., Trobisch H., Neuman H., Moller A., Sirtl C., Derdak M., et al. Quality control of three different conventional fresh-frozen plasma preparations and one new virus-inactivated lyophilized pooled plasma preparation. *Klin. Wochenschr.* 1991; 69(3): 157–61.
12. Bakaltcheva I., Ketchum L. Method of producing glycine-stabilized lyophilized plasma. Patent US 7,931,319; 2011.
13. Heimbürger N., Sieber A., Schwinn H. Stable plasma, process for preparing it and its use as comparative plasma in coagulation tests. Patent US4,056,484; 1977.
14. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, blood-substituting solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree №29 of 26 Jan 2010. (in Russian). Available at: <http://base.garant.ru/12172686/> (Accessed 09.10.16).
15. Ragimov A.A., Shcherbakova G.N. *Guide infusion-transfusion therapy*. Moscow: Medical Information Agency; 2003. (in Russian)
16. Sword-Nilsson A.M., Persson P.O., Johnson U., Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang.* 2006; 90(1): 33–9.
17. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2015.
18. Wilder D., Reid N., Bakaltcheva I. Hypertonic resuscitation and blood coagulation. In vitro comparison of several hypertonic solutions for their action on platelet and plasma coagulation. *Thrombos. Res.* 2002; 107(5): 255–61.

Поступила 26.09.16
Принята к печати 22.11.16

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.273.5.03:616.151.514].012

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И МОДИФИКАЦИИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,
127051, Москва, Россия

Основным методом лечения гемофилии А и В является заместительная терапия с использованием препаратов, получаемых из плазмы доноров или посредством технологии рекомбинантных ДНК. Среди основных недостатков немодифицированных препаратов факторов VIII и IX (FVIII и FIX) следует выделить низкий период циркуляции препарата в организме больного и выработку антител (ингибиторов) к белку препарата, что существенно снижает их эффективность. Повышение эффективности и безопасности рекомбинантных препаратов достигается за счет удаления В-домена в молекуле FVIII, пегилирования или разработки препаратов на основе слитных белков (fusion proteins – слияние молекулы препарата с альбумином или Fc-фрагментом IgG). Данные модификации в первую очередь способствуют повышению стабильности молекулы действующего вещества, увеличению периода полувыведения и снижению иммуногенности рекомбинантных препаратов. Заместительная терапия традиционными препаратами больных гемофилией, у которых определяются антитела (ингибиторы) к препарату, не эффективна. Учитывая это, в последние годы были разработаны новые препараты для альтернативных подходов методов лечения гемофилии. Разработан препарат на основе биспецифичных моноклональных антител, имитирующий функцию FVIII; моноклональные антитела и аптамер, блокирующие активность ингибитора пути тканевого фактора, и препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида, блокирующий мРНК, ответственную за синтез антитромбина III. Основным преимуществом новых препаратов является то, что они не вызывают выработку антител к факторам свертывания и могут быть использованы для лечения больных с наличием в плазме крови ингибиторов.

Ключевые слова: гемофилия; рекомбинантный фактор VIII; рекомбинантный фактор IX; пегилированные белки; препараты моноклональных антител; препараты на основе слитных белков/fusion proteins; аптамер; антисмысловые олигонуклеотиды.

Для цитирования: Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 208–215. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-208-215>

Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir Yu.V., Bondarev V.P.

MAIN DIRECTIONS FOR THE DEVELOPMENT AND MODIFICATION OF PREPARATIONS FOR THE TREATMENT OF HEMOPHILIA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The basic method of the treatment of haemophilia A and B is the replacement therapy by preparations obtained from plasma of donors, or by recombinant DNA technology. Among the major shortcomings of unmodified drugs VIII and IX factors should be allocated between the low time circulation of the drug in the body of the patient and the delivery of antibodies (inhibitors) to a protein preparation that significantly reduces their effectiveness. The improvement of the efficiency and safety of recombinant preparations is achieved by removing B-domain of factor VIII molecule, pegylation or development of preparations of fusion proteins (fusion molecules of the preparation to the albumin or Fc-fragment of IgG). These modifications,

especially, enhance the stability of the molecule of the active substance to increase half-life and reduce immunogenicity of recombinant products. Replacement therapy with traditional preparations in hemophilia patients delivering antibodies (inhibitors) to the preparation is ineffective. Taking this into account, in recent years, new preparations have been developed for alternative approaches treatment of hemophilia. There were developed the preparation based on bispecific monoclonal antibody mimicking the function of factor VIII; monoclonal antibodies and aptamer blocking the activity of tissue factor pathway inhibitor, and the preparation based on antisense oligonucleotide blocking mRNA responsible for the synthesis of antithrombin III. The main advantage of these new formulations is that they do not cause the production of antibodies to coagulation factors and so can be used for the treatment of patients with inhibitors in blood.

Key words: hemophilia; recombinant factor VIII; recombinant factor IX; pegylated proteins; monoclonal antibody preparations; preparations based fusion proteins; aptamer; antisense oligonucleotides.

For citation: Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir J.V., Bondarev V.P. Main directions for the development and modification of preparations for the treatment of hemophilia. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(4): 208-215. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-208-215>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 29 January 2016

Accepted 22 November 2016

Гемофилия – наследственное нарушение свертывания крови, вызванное недостаточностью или полным отсутствием факторов свертывания крови VIII или IX (FVIII или FIX). При недостатке FVIII развивается гемофилия А, FIX – гемофилия В. Дефицит факторов свертывания крови сопровождается спонтанными или индуцированными кровоизлияниями в суставы, мышцы и внутренние органы.

До 1960-х годов лечение гемофилии практически отсутствовало. После разработки метода криопреципитации в 1966 г. был зарегистрирован первый препарат FVIII, который получали из плазмы крови доноров. Следует отметить, что в первые годы наблюдался острый дефицит данных препаратов, в США препараты разыгрывали в лотерею. В 1980-х годах было установлено, что препараты факторов свертывания крови, получаемые из плазмы, инфицированы вирусами (ВИЧ, гепатит С), что привело к заражению около 20 000 больных [1]. Данное обстоятельство послужило импульсом для разработки методов элиминации и инактивации вирусов при производстве плазменных препаратов и создания новых препаратов, получаемых без использования плазмы. В производственный процесс получения препаратов из плазмы (plasma derived – pd) FVIII и pdFIX) был включен этап термической обработки, который позволил устранить инфицирование препаратов микроорганизмами. Параллельно совершенствованию технологического процесса получения препаратов из плазмы проводили исследование по разработке факторов свертывания с использованием технологии рекомбинантных ДНК. На основе данной технологии получены и зарегистрированы препараты рекомбинантного FVIII свертывания крови (rFVIII) в 1992 г. и FIX (rFIX) в 1997 г. Технология получения препаратов на основе рекомбинантной ДНК позволяет значительно снизить риск вирусной контаминации препаратов.

В настоящее время основными препаратами заместительной терапии гемофилии являются плазменные и рекомбинантные препараты, однако они имеют ряд недостатков. Поэтому активно проводят исследования для совершенствования применяемых препаратов и разработки новых препаратов и методов лечения гемофилии. В обзоре представлен анализ основных направлений разработки препаратов для лечения гемофилии, которые были зарегистрированы в последние 2 года, или в настоящее время находятся на разных этапах экспериментальных или клинических исследований.

Для корреспонденции:

Солдатов Александр Алексеевич, доктор медицинских наук, главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. 127051, Москва, Россия. E-mail: Soldatov@expmed.ru.

For correspondence:

Soldatov Aleksandr A., MD, PhD, DSci, Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: Soldatov@expmed.ru.

Основные проблемы, связанные с применением плазменных и рекомбинантных препаратов для лечения гемофилии

Среди препаратов для заместительной терапии гемофилии наиболее эффективными остаются препараты, получаемые из плазмы доноров. Основной проблемой производства данных препаратов является потребность в больших объемах плазмы. При этом, несмотря на то что с конца 1980-х годов не было зарегистрировано случаев инфицирования больных при применении pdFVIII и pdFIX, производители данных препаратов теоретически не могут исключить возможность вирусного их заражения.

Если еще до 1980-х годов основной проблемой использования указанных препаратов была высокая вероятность инфицирования больного, то после включения в производственный процесс методов инактивации/элиминации вирусов основным недостатком осталась их высокая нежелательная иммуногенность. В ответ на введение препаратов FVIII или FIX возможно развитие иммунного ответа с выработкой специфических антител к препарату, которые блокируют специфическую активность препаратов и тем самым снижают их клиническую эффективность. Поэтому антитела, вырабатываемые в ответ на введение препаратов (факторов свертывания крови), получили название ингибиторов. Антитела (ингибиторы) формируются при применении плазменных и рекомбинантных препаратов.

Введение препаратов FVIII может сопровождаться выработкой антител, относящихся к IgG1 или IgG4, которые встречаются в 25–30% (до 52%) случаев. Выработка антител к FIX встречается реже, чем FVIII (до 3% случаев). Однако в ответ на введение препаратов FIX значительно чаще вырабатываются антитела, вызывающие развитие анафилактических реакций [2].

Если у больного гемофилией встречается полный дефицит FVIII или FIX, механизм выработки антител к препарату связан с тем, что система иммунитета до введения препарата не контактировала с фактором. Отсутствие контакта с определенным фактором свертывания не позволяет сформировать иммунологическую толерантность против данного белка. Поэтому вводимые факторы свертывания крови при лечении гемофилии система иммунитета распознает как «чужеродные агенты» и отвечает на них развитием иммунного ответа с выработкой аллоантител (ингибиторов).

Предполагается, что у больных с неполным дефицитом факторов свертывания крови развитие иммунной реакции на препарат может быть связано с наследственными факторами, наличием воспалительного процесса или др. Выработка антител (ингибиторов) к препаратам свертывания крови обусловлена многими факторами, в том числе расовыми различиями, состоянием системы иммунитета, видом генетического дефекта (делеции или миссенс-мутации), чередованием различных антигемофильных средств, иммуногенным потенциалом препаратов и др.

Более редкое развитие иммунной реакции на введение препаратов FIX некоторые авторы связывают с тем, что структура

Таблица 1

Препараты последнего поколения для лечения гемофилии

Группа препаратов	Препарат	Действующее вещество
Модифицированные препараты FVIII	rFVIII-huCL	Рекомбинантный FVIII, полученный с использованием линии клеток почки эмбриона человека
	rhFVIII-SC	Рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом молекулы, полученный с использованием линии клеток почки эмбриона человека
	BAX 855	Пегилированный (20 кД) рекомбинантный FVIII
	BAY 94-9027	Пегилированный (60 кД) рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом
	N8-GP	Пегилированный (40 кД) рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом
	rFVIII-Fc	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FVIII с Fc-фрагментом IgG
Модифицированные препараты FIX	rFIX-FP	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FIX с альбумином
	rFIX-Fc	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FIX с Fc-фрагментом IgG
	N8-GP	Пегилированный (40 кД) рекомбинантный FIX
Препараты, действующие «в обход» FVIII и FIX	rFVIIa-FP	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FVIIa с альбумином
	hbS23	Моноклональные биспецифические антитела, связывающие FXa и FX
Препараты, блокирующие активность факторов противосвертывающей системы гемостаза	mAb2021 (concizumab)	Моноклональные антитела, связывающие (блокирующие) ингибитор пути TF
	BAX 499	Пегилированный аптамер, связывающий ингибитор пути TF
	ALN-AT3	Антисмысловый олигонуклеотид (siRNA), связывающий мРНК АТIII

молекулы FIX имеет сходное строение с К-зависимыми факторами свертывания, синтез которых не нарушается при гемофилии. Поэтому при введении препаратов FIX даже при полном отсутствии их синтеза в организме больного система иммунитета, вероятно, распознает их в качестве «своих», а не «чужеродных» белков.

Разработка рекомбинантных препаратов позволила исключить передачу возбудителей вирусной инфекции с плазменными препаратами. Однако опыт клинического применения препаратов rFVIII и rFIX указывает, что их эффективность ниже, чем аналогичных препаратов, полученных из плазмы. Кроме того, в некоторых работах показано, что введение рекомбинантных препаратов сопровождается и более активной выработкой ингибиторов, чем применение аналогичных плазменных препаратов [2–4]. При назначении rFVIII больным, которые впервые получали лечение, ингибиторы вырабатывались у 29–32% больных, а при назначении в аналогичной популяции больных pdFVIII – у 0–12%. У ранее леченных больных при назначении rFVIII ингибиторы определялись в 36% случаев, а при применении pdFVIII – в 21% [2–5].

Препараты заместительной терапии при гемофилии обычно назначают при развитии у больных кровотечений или для профилактики кровотечений при хирургических вмешательствах. Согласно мнению многих авторов [6–8], оптимальным методом предупреждения кровотечений является использование профилактических схем введения препаратов. Одной из основных проблем для терапевтического и профилактического применения рекомбинантных и плазменных препаратов является низкий период циркуляции FVIII или FIX в крови человека. Период полувыведения FVIII составляет около 12 ч (с колебаниями от 8 до 24 ч) и зависит от клиренса фактора Виллебранда (vWF), который связывается с FVIII. Период полувыведения FIX колеблется от 18 до 24 ч.

В связи с тем что плазменные и рекомбинантные препараты имеют низкий период циркуляции в организме, возникает необходимость их частого введения в процессе лечения и/или профилактики. Частое введение требует использования постоянных систем для введения (постоянных катетеров), что сложно выполнить при лечении детей.

Таким образом, среди недостатков, применяемых в настоящее время для лечения гемофилии немодифицированных препаратов FVIII и FIX, следует выделить следующие: теоретическая вероятность вирусного инфицирования больных плазменными препаратами, высокая иммуногенность плазменных и рекомбинантных препаратов, более низкая (в сравнении с плазменными препаратами) эффективность рекомбинантных препаратов и низкий период циркуляции в крови факторов свертывания крови.

Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии

Для устранения указанных выше недостатков препаратов, используемых для лечения гемофилии, проводят исследования по их совершенствованию по следующим направлениям:

- разработка рекомбинантных препаратов, полученных с использованием клеточной линии человека для того, чтобы действующее вещество препарата имело максимальное сходство с белками человека;
- удаления В-домена молекулы FVIII для повышения ее стабильности и более прочного связывания с vWF;
- конъюгация молекулы факторов свертывания с полиэтиленгликолем или создание слитных белков (fusion proteins) – молекул факторов свертывания с Fc-фрагментом иммуноглобулина (Ig) или альбумином для увеличения периода циркуляции препарата в организме;
- разработка и модификация альтернативных препаратов для лечения гемофилии, таких как препарат FVIIa, аптамер, моноклональные антитела и антисмысловые олигонуклеотиды, блокирующие активность ингибиторов тканевого фактора (TF) и антитромбина III (АТIII).

Препараты, которые были зарегистрированы в последние 2 года или находятся на разных стадиях экспериментального и клинического исследования, представлены в **табл. 1**.

Модифицированные рекомбинантные препараты FVIII

Молекула FVIII содержит 2332 аминокислоты, большой размер молекулы отражается на ее стабильности. Методами компьютерного моделирования (*in silico*) было показано, что в области В-домена имеются аминокислотные последовательности (эпитопы), связывающиеся с антигенами МНС класса II. При этом В-домен не влияет на функциональную активность FVIII и не влияет на связывание с vWF. Соответственно удаление В-домена не повышает риск развития иммунной реакции на препарат FVIII. В то же время уменьшение размера молекулы (приблизительно на 870 аминокислот) приводит к повышению ее стабильности (см. **рисунок**) [9].

Учитывая данные особенности, были разработаны рекомбинантные препараты FVIII, полученные в системе клеток яичника китайского хомячка (CHO), в молекуле которых был удален В-домен. В препарате turoctocog alfa со стороны α2-домена оставлено 11 аминокислот (от 741 до 750), а со стороны α3 – 10 аминокислот (от 1638 до 1648). Данная модификация была использована для получения других препаратов (см. **рисунок**).

Удаление В-домена в препарате (rhFVIII-SC), полученном с использованием клеток почек эмбриона, привело к увеличению стабильности молекулы рекомбинантного rFVIII и более быстрому и сильному связыванию с FW. При проведении кли-

нических исследований препараты с удаленным В-доменом продемонстрировали аналогичную с нативным (немодифицированным FVIII) препаратом эффективность и безопасность [10, 11].

Наиболее распространенной клеточной линией для получения рекомбинантных препаратов является линия клеток CHO. Первые рекомбинантные препараты факторов свертывания крови также были получены с использованием клеток CHO. Однако белки, получаемые в системе клеток животных, отличаются от белков, синтезируемых клетками человека. В первую очередь эти различия касаются посттрансляционных модификаций. Например, гликаны молекулы rFVIII-huCL содержат Gal-α1-3-Gal и не содержат остатков N-гликолилнейраминной кислоты, которые содержатся в белках, получаемых в системе клеток CHO, а белки, получаемые в системе клеток CHO, не содержат Gal-α1-3-Gal. Особенности гликозилирования белков препаратов, синтезируемых клетками животных или микроорганизмов, оказывают влияние в первую очередь на развитие нежелательной иммуногенности препаратов.

Учитывая данные особенности, была разработана технология получения rFVIII с удаленным В-доменом в системе клеток почек эмбриона линии HEK293. На основании данной технологии были получены и зарегистрированы два препарата. Полученный по данной технологии препарат последнего поколения rFVIII-huCL (simostocog alfa) отличается тем, что при его производстве не применяются вещества (сыворотки для культивирования), получаемые от животных или человека [11].

Эффективность данных препаратов соответствует эффективности нативных (немодифицированных) препаратов для заместительной терапии, но значительно снижен риск безопасности их применения [12, 13].

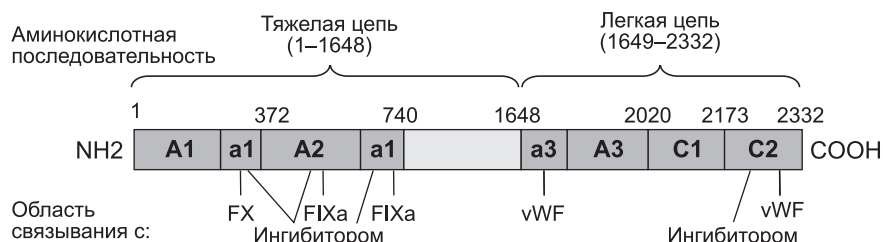
Пегелированные препараты

Проблемы, встречающиеся при применении плазмменных и рекомбинантных препаратов, используемых для заместительной терапии, такие как нежелательная иммуногенность и короткий период полувыведения, характерны практически для всех современных биотехнологических препаратов. Одним из первых подходов, который был применен для устранения данных недостатков ряда препаратов (эритропоэтины, интерфероны, филграстимы и др.), является конъюгация молекулы белка препарата с полиэтиленгликолем. Связывание с полиэтиленгликолем эритропоэтинов, интерферонов, филграстимов и др. значительно повысило их эффективность и безопасность.

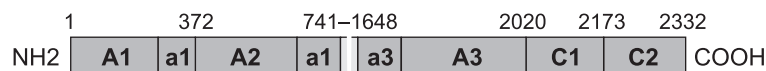
Пегелирование белковых препаратов приводит к увеличению молекулярной массы препарата. Высокая молекулярная масса пегелированного препарата вызывает задержку препарата в организме, что достигается не только за счет замедления его выведения через почки, но и в результате нарушения элиминации препарата в печени. Пегелирование белка сопровождается нарушением связывания препарата с LRP-рецептором (рецептор, связывающий белок клетками печени), необходимого для его метаболизма в клетках печени [14]. Пегелирование препаратов свертывания крови приводит к увеличению периода циркуляции препарата в крови и, следовательно, удлинению времени его действия (табл. 2).

Кроме того, конъюгация белка препарата с полиэтиленгликолем приводит к нарушению (или экранированию) детерминант (эпитопов) белковой молекулы препарата, которые являются ответственными за развитие иммунного ответа и индукцию синтеза антител к препарату, что приводит к значительному снижению нежелательной иммуногенности.

Немодифицированная молекула VIII фактора свертывания крови



Молекула VIII фактора свертывания крови с удаленным В-доменом



Пегелированная молекула VIII фактора свертывания крови



Препарат на основе слитных молекул F VIII (с удаленным В-доменом) Fc-фрагмента иммуноглобулина

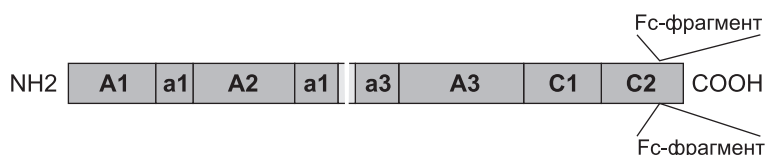


Схема основных подходов к модификации молекулы VIII фактора свертывания крови.

При разработке первых пегелированных препаратов rFVIII установлено, что связывание полиэтиленгликоля с лизином или N-концевыми аминокислотными группами в белковой молекуле действующего вещества приводит к снижению его эффективности и способности связываться с vWF. Связывание полиэтиленгликоля с цистеином не приводило к снижению специфической активности препарата.

Было разработано три варианта пегелированных препаратов rFVIII. В первом случае полиэтиленгликоль (мол. масса 20 кД) связывали с нативной молекулой rFVIII (препарат BAX 855). В двух других случаях препараты созданы на основе молекулы rFVIII с удаленным В-доменом, конъюгированной с полиэтиленгликолем с мол. массой 40 кД (препарат N8-GP) или с полиэтиленгликолем с мол. массой 60 кД (препарат BAY 94-9027) [14, 15].

Пегелирование препаратов приводило к значительному улучшению фармакокинетических свойств препаратов. Например,

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения периода полувыведения и клиренса некоторых препаратов последнего поколения для лечения гемофилии

Исследуемый препарат			Препарат сравнения		
препарат	период полувыведения, ч	клиренс, мл/ч на 1 кг	препарат	период полувыведения, ч	клиренс, мл/ч на 1 кг
rhFVIII-SC	10,83	4,11	Нативный	11,19	4,17
BAY 94-9027	18,5 (9,15–23,4)	0,014 (0,008–0,018)	Нативный	13 (10,2–15,9)	0,023 (0,01–0,029)
N8-GP	18,35	1,61	Нативный	11,73	2,41
rFIX-Fc	57,6 ± 8,27	3,18	rFIX	6,28 ± 1,11	8,4 ± 2,02
rFVIIa-FP	6,1–9,7	7,62	Нативный	3,9–5,99	33–37

при экспериментальном изучении свойств на мышах и собаках показано, что пегилирование приводит к увеличению периода полувыведения BAY 94-9027 и снижению его иммуногенности в сравнении с нативным препаратом rFVIII-FS [14].

В настоящее время заканчивается регистрация пегилированного rFIX (препарат N9-GP), который представляет собой rFIX, конъюгированный с полиэтиленгликолем с мол. массой 40 кД [16].

Пегилирование препаратов факторов свертывания вызывает значительное удлинение периода полувыведения препарата из организма (см. табл. 2). Следует отметить, что в экспериментах на животных увеличение периода полувыведения пегилированных препаратов за счет снижения почечного клиренса сопровождалось вакуолизацией клеток почечных канальцев [16, 17].

Препараты на основе слитных белков (fusion proteins)

Еще один подход для увеличения времени циркуляции препарата в организме основан на слиянии молекулы фактора свертывания с другим белком. Увеличение времени циркуляции возможно при использовании Fc-фрагмента молекулы IgG или альбумина. Увеличение периода полувыведения данных белков обусловлено в первую очередь их способностью за счет Fc-фрагмента связываться с FcRn-рецептором на поверхности клеток.

FcRn-рецептор экспрессируется на поверхностной мембране многих клеток (моноциты/макрофаги, эндотелиальные клетки и др.) и обладает уникальной способностью связываться с Fc-фрагментом молекулы IgG только при pH в диапазоне 6,0–6,5, а при повышении значений pH до 7,0–7,5 отмечается очень слабое или полное отсутствие связывания. При взаимодействии рецептора с Fc-фрагментом происходит неспецифический эндоцитоз образовавшегося комплекса эндотелиальной клеткой (жидкая фаза пиноцитоза). При восстановлении pH до физиологического уровня комплекс транспортируется на поверхность клетки и молекула, содержащая Fc-фрагмент, высвобождается из указанного комплекса.

Таким образом, связывание Fc-фрагмента в составе препарата с FcγR-рецептором сопровождается пиноцитозом в лизосомы с последующим его протеолизом, а при связывании с FcRn-рецептором также происходит пиноцитоз, но препарат сохраняется в клетке, не подвергаясь протеолизу [18, 19].

В ряде работ [20, 21] показано, что FcRn принимают участие в реабсорбции белков и альбуминов в почечных канальцах. В то же время M. Sarav и соавт. [22] считают, что с участием FcRn происходит реабсорбция только альбуминов и FcRn-рецепторы не влияют на метаболизм белков в почках.

Слияние молекулы FVIII и FIX с Fc-фрагментом или альбумином приводит к увеличению периода выведения препарата. Однако молекула FVIII является достаточно большой и не может быть пиноцитирована эндотелиальной клеткой. Учитывая это, для получения препаратов слитых белков использовали FVIII с удаленным В-доменом. На основе данных подходов разработан препарат слитых белков (fusion proteins) молекулы FVIII (с удаленным В-доменом) и двумя Fc-фрагментами. Исследования на модели нокаутированных по FcRn-генам мышей показали, что увеличение периода циркуляции rFc-FVIII препарата происходит за счет участия FcRn-рецепторного механизма.

В 2014 г. был одобрен и препарат Efraloctocog alfa, который представляет собой слитый белок Fc-фрагмента (IgG1) с рекомбинантным FVIII, у которого удален В-домен (rBDD VIII-Fc; аббревиатура BDD означает удаленный В-домен).

Препарат rBDD VIII-Fc получают с использованием линии клеток HEK-293H (клетки 293 почек эмбриона человека). Использование данной линии клеток не случайно, так как это позволяет сохранить естественные посттрансляционные модификации молекулы FVIII. Сохранение естественного гликозирования в препарате rFVIII-Fc позволяет поддерживать стабильность молекулы FVIII и сводит к минимуму образование неозитопов.

При удалении В-домена структура молекулы препарата, аминокислотная последовательность, профиль гликозирования и биологическая активность оставшейся части молекулы препарата на основе белка слияния rBDD FVIII-Fc-фрагмент (rBDD FVIII-Fc) сохраняли функциональные свойства и структурные характеристики соответствующих участков молекулы нативного препарата FVIII. В исследованиях *in vitro* было установлено снижение на 30% аффинности связывания с vWF относительно нативного препарата. В исследованиях [23] на модели нокаутиро-

ванных по гену FVIII мышей показано, что увеличение периода полувыведения обусловлено участием FcRn-рецептора. Клинические исследования продемонстрировали увеличение периода полувыведения препарата rBDD FVIII-Fc (до 18,8 ч) в сравнении с нативным препаратом (12,2–11 ч).

Разработчики препарата предполагают, что препарат rBDD FVIII-Fc будет обладать иммуномодулирующими свойствами. Известно, что распознавание Fc-фрагмента антитела человека иммунокомпетентными клетками приводит к формированию толерантности. Экспериментально было установлено появление Treg (Т-регуляторные клетки, ответственные за развитие толерантности к белку) в ответ на введение rBDD FVIII-Fc. Это позволяет предполагать снижение иммуногенности препарата при введении человеку. Однако эти ожидания пока не были подтверждены в клинических исследованиях [23, 24].

В 2014 г. в США и Канаде зарегистрирован препарат (coagulation Factor IX (Recombinant), Fc Fusion Protein), который представляет собой слитный белок (fusion proteins) рекомбинантных rFIX и Fc-фрагмента (rFIX-Fc).

Молекула rFIX состоит из 641 аминокислоты, Fc-фрагмент содержит 227 аминокислот. Препараты rFIX-Fc получают с использованием той же клеточной линии (HEK-293H), что и препараты rFVIII-Fc. В препарате rFIX-Fc определяется более высокий уровень β-гидроксирования в области Asp-64 относительно нативного плазменного FIX. Слияние молекул rFIX и Fc-фрагмента в препарате увеличивает его растворимость.

При проведении клинических исследований установлено, что соединение rFIX с Fc в первую очередь увеличивает период полувыведения препарата почти в 10 раз (см. табл. 2). Увеличение времени полувыведения препарата было достигнуто за счет замедления клиренса, который для rFIX-Fc составил 3,18 мл/ч на 1 кг массы тела, в то время как для rFIX был на уровне $8,4 \pm 2,02$ мл/ч на 1 кг массы тела. Это сопровождалось увеличением продолжительности циркуляции в крови FIX до 11,2 сут, что в 2 раза выше, чем при введении немодифицированного препарата (5,1 сут). Общее время циркуляции rFIX-Fc в организме составило $71,9 \pm 9,66$ ч ($53,2$ – $85,9$ ч) по сравнению с $26 \pm 6,07$ ч для нативного препарата.

Проведенные клинические исследования обосновали рекомендации для профилактического применения препарата rFIX-Fc в дозе 20 МЕ/кг (1 раз в неделю) или в дозе 40 МЕ/кг (введение каждые 10 дней) для поддержания содержания FIX в крови выше 1% [25].

Альбумин, представляет собой белок, который имеет высокий период полураспада (до 19 сут), в том числе и за счет способности связывания с RnFc-рецептором. Кроме того, молекула альбумина имеет высокую стабильность и не обладает иммуногенностью.

Был разработан препарат на основе слитого белка rFIX и альбумина (rFIX-FP). При клинических исследованиях установлено, что препарат обладает длительным периодом полувыведения ($t_{1/2}$ 99,88 ч; клиренс 0,71 мл/ч на 1 кг массы тела), что в 4,8 раза превышает период полувыведения нативного rFIX.

Лечение больных гемофилией с установленным наличием ингибиторов

Связывание ингибитора с препаратом приводит к блокированию его специфического действия. В подобной ситуации введение препаратов заместительной терапии в случае повреждения сосудистой стенки у больного гемофилией не вызывает остановки кровотечения. Поэтому лечение больных гемофилией, у которых определяются ингибиторы на плазменные или рекомбинантные препараты FVIII или FIX, неэффективно при использовании данных препаратов. Для подавления синтеза ингибиторов разработаны различные схемы десенсибилизации, в основе которых лежит введение больших доз препаратов, что требует и больших материальных затрат.

Альтернативой десенсибилизации является использование препаратов заместительной терапии, на которые не вырабатываются ингибиторы. Например, при развитии иммунного ответа с выработкой антител к препаратам FVIII человека больным до недавнего времени назначали препарат FVIII, полученный из плазмы свиньи (Hyate C). Ингибиторы, которые вырабатывались у больных на человеческий FVIII, не блокировали специфическую активность FVIII, полученного из плазмы свиньи. Недостатком данного препарата является высокая вероятность

выработки антител (ингибиторов) к FVIII свиньи. Препарат был снят с производства из-за опасности контаминации паравирусом свиньи. В связи с этим был разработан рекомбинантный FVIII, аналогичный природному FVIII свиньи (OBI-1), препарат находится на этапе клинических исследований [26].

Препараты FVIIa применяют для лечения и профилактики гемофилии у больных, у которых выявлены антитела (ингибиторы) к препаратам FVIII или FIX. Механизм действия препаратов FVIIa обусловлен их способностью активировать систему свертывания крови без участия («в обход») FVIII или FIX.

Основным недостатком немодифицированных препаратов FVIIa является очень короткий период полувыведения (2,5 ч), что требует введения препаратов 2–3 раза в день с интервалом 2–3 ч при лечении кровотечений.

Учитывая продолжительный период полувыведения альбумина, создание препарата на основе слитного белка, молекул FVIIa и альбумина значительно увеличивало период полувыведения препарата rFVIIa-FP. При введении препарата крысам период полувыведения увеличивался в 5,8–6,7 раза в сравнении с немодифицированным препаратом. Введение препарата мышам приводило к повышению в 4 раза периода полувыведения и в 11 раз к снижению клиренса относительно немодифицированного препарата [27].

Установленные при экспериментальных исследованиях особенности фармакокинетики были подтверждены при клинических исследованиях с участием здоровых добровольцев и больных гемофилией. Период полувыведения rFVIIa-FP был 6,1–9,7 ч и клиренс – 7,62–12,74 мл/ч на 1 кг массы тела в сравнении с немодифицированным препаратом (3,9–5,99 ч и 33–37 мл/ч на 1 кг массы тела соответственно) [28].

Альтернативные препараты

В связи с тем что у больных гемофилией с ингибиторами применение препаратов заместительной терапии неэффективно, используются разные подходы к лечению данной категории больных. Например, для лечения гемофилии в комплексе с препаратами факторов свертывания крови были использованы препараты, подавляющие развитие иммунной реакции, такие как ритуксимаб (моноклональные антитела к CD20), в качестве альтернативы стероидным препаратам. Указанные моноклональные антитела, связываясь с CD20, индуцируют гибель В-клеток и соответственно подавляют выработку ингибиторов. При введении 19 больным гемофилией еженедельно в течение 1 мес препарата ритуксимаб в дозе 375 мг/м² вместе с высокими дозами FVIII привело к подавлению выработки ингибиторов у 14 (74%) больных. При этом у некоторых из этих больных все-таки определялось снижение периода полувыведения FVIII, у 10 больных наблюдался период ремиссии от 90 дней до 2 лет [29].

Кроме препаратов на основе факторов свертывания крови для остановки кровотечений, разработаны препараты, механизм действия которых отличается от действия препаратов заместительной терапии. Разработаны препараты, которые «в обход» FVIII или FIX активируют каскад свертывания крови или подавляют активность антисвертывающих факторов (блокаторы ингибитора пути TF и АТIII).

Действующее вещество препарата ACE 910 является биспецифическим гуманизированным моноклональным антителом, полностью имитирующим свойства FVIII. Связываясь с FIXa и FX, препарат инициирует развитие процесса свертывания крови без участия FVIII.

При экспериментальном исследовании на приматах [30] было показано, что препарат ACE 910 вызывает остановку кровотечения при использовании в дозе 1–3 мг/кг. Клинические исследования препарата ACE 910 у больных гемофилией А (в том числе и больных с ингибиторами) продемонстрировали его высокую эффективность и безопасность. Период полураспада препарата составляет около 3 нед, препарат эффективен при подкожном введении 1 раз в неделю. Самое главное преимущество данного препарата заключается в том, что он, активируя процесс свертывания крови, не вызывает выработки антител (ингибиторов) к факторам свертывания крови и может применяться у больных гемофилией с наличием ингибиторов [30, 31].

В норме TF в комплексе с активированным FVIIa активирует FIX и FX. Однако функция TF подавляется ингибитором TF. Поэтому блокирование ингибитора пути TF повышает прокоагулянтную активность факторов свертывания крови.

Разработан препарат Concizumab, который является моноклональным антителом к ингибитору пути TF. Связывание препаратом Concizumab ингибитора пути тканевого фактора приводит к повышению роли тромбина в процессе свертывания крови [32].

Исследования *in vitro* показали, что Concizumab вызывает выработку тромбина и FVIIa [33]. В экспериментах на кроликах была продемонстрирована способность препарата при подкожном и внутривенном введении останавливать кровотечение с такой же эффективностью, как и препаратов FVIIa. Введение препарата животным за 24 ч до травмы предотвращало развитие кровотечения [33].

Опубликованы результаты клинических исследований на здоровых добровольцах и больных гемофилией [34]. При подкожном введении Concizumab определяется в крови до 43 сут, при внутривенном введении период полувыведения находился в диапазоне 7,4–31,1 ч.

При введении препарата количество ингибитора пути TF в крови было обратно пропорционально концентрации Concizumab и в то же время сопровождалось прямо пропорциональным увеличением прокоагулянтной активности сыворотки крови. Данные изменения системы гемостаза сохранялись в течение 14 сут после последнего введения препарата [32].

В сравнении с препаратами на основе плазменных или рекомбинантных факторов свертывания крови препараты на основе моноклональных антител являются более стабильными, имеют продолжительный период полувыведения, большую растворимость, селективность, специфичность и не вызывают выработки ингибиторов.

Препарат BAX 499 является синтетическим полинуклеотидом (аптамер), конъюгированным с полиэтиленгликолем. В организме препарат связывается с ингибитором пути тканевого фактора [34], блокируя его аналогично действию препарата на основе моноклональных антител (Concizumab).

При проведении клинических исследований на здоровых и больных гемофилией [35] продемонстрирована высокая эффективность и безопасность применения препарата BAX 499. Препарат был эффективен у всех включенных в исследование больных. При этом эффективность была выше у тех больных, которые имели более низкий уровень FVIII и более высокий уровень ингибитора пути TF до лечения.

В сравнении с препаратами на основе моноклональных антител технологический процесс получения аптамера проще и требует значительно меньше затрат. При его производстве отсутствует риск микробиологической контаминации, молекула действующего вещества обладает высокой стабильностью и не вызывает развитие иммунного ответа при его введении [35].

Еще одним направлением современной биотехнологии является разработка препаратов на основе так называемых антисмысловых олигонуклеотидов. Данные препараты обычно представляют собой короткую цепь нуклеотидов (как правило, 15–20 нуклеотидов), комплементарную мРНК, которая отвечает за синтез конкретного белка. В клетке антисмысловый олигонуклеотид может связывать соответствующий участок мРНК, тем самым блокируя синтез белка.

На основе данных подходов был разработан препарат ALT-AT3 (синтетический N-ацетилгалактозамин), представляющий собой антисмысловый олигонуклеотид, взаимодействующий с мРНК, отвечающей за синтез АТIII в гепатоцитах, что сопровождается подавлением синтеза АТIII. На модели гемофилии А и В мышей при повреждении сосудов лазерным излучением и развитии кровотечений, введение препарата приводило к остановке кровотечений. В настоящее время проводятся клинические исследования указанного препарата [36].

Немедикаментозное лечение больных гемофилией с установленным наличием ингибиторов

В качестве немедикаментозного способа удаления ингибиторов применяются методы плазмафереза и иммуноадсорбции. Следует отметить, что для полного освобождения от ингибитора методом плазмафереза необходимо удаление большого объема плазмы.

При проведении иммуноадсорбции в качестве сорбента используют белок А (компонент клеточной оболочки золотистого стафилококка), конъюгированный с сефарозой, который обладает способностью связываться с Fc-фрагментом молекулы IgG,

в том числе и с Fc-фрагментом ингибитора. Кроме белка А, в качестве сорбента могут быть использованы и другие системы, например Ig-Thera Sorb [37, 38]. Иммуноабсорбцию проводят при развитии кровотечений у больных гемофилией или перед хирургическими операциями [39].

Тем не менее указанные выше препараты и методы лечения применяют для заместительной терапии или блокирования различных звеньев системы гемостаза и не устраняют причину развития самого заболевания. В 2011 г. появились сообщения [40] о возможности передачи гена FIX с помощью аденоассоциированного вируса (AAV) в клетки, синтезирующие факторы свертывания крови. В настоящее время ведутся работы по созданию векторов AAV для переноса гена FVIII в соответствующие клетки больным гемофилией. Полученные к настоящему времени результаты исследований свидетельствуют о слабой выработке факторов свертывания крови в ответ на введение данного препарата. Основные исследования по данной проблеме направлены на повышение активности соответствующих векторов для переноса генов.

Таким образом, до 1960-х годов отсутствовали препараты для лечения гемофилии А и В, и продолжительность жизни таких больных была не более 25 лет. С появлением плазменных и рекомбинантных препаратов FVIII и FIX продолжительность жизни больных увеличилась до 65 лет. Однако традиционные препараты для заместительной терапии гемофилии еще далеки до совершенства и имеют ряд недостатков. Разработанные в последние годы биотехнологические препараты позволяют значительно снизить недостатки традиционных препаратов за счет повышения периода выведения препарата и снижения иммуногенности. Кроме того, появились препараты, альтернативные традиционным препаратам, на основе моноклональных антител, аптамера или антисмысловых олигонуклеотидов, которые в основном пока используются для лечения больных с ингибиторами. Усовершенствование традиционных препаратов для лечения гемофилии и разработка новых препаратов значительно повысили эффективность и безопасность терапии данного заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mannucci P.M. AIDS, hepatitis and hemophilia in the 1980s: memoirs from an insider. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1(10): 2065–9.
- Wight J., Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003; 9(4): 418–35.
- Ettingshausen C.E., Kreuz W. Recombinant vs. plasma-derived products, especially those with intact VWF, regarding inhibitor development. *Haemophilia*. 2006; 12(6): 102–6.
- Chalmers E.A., Brown S.A., Keeling D. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2007; 13(2): 149–55.
- Agostini D., Rosset C., Botton M.R., Kappel D.B., Vieira I.A., Gorziza R.P., et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*. 2012; 18(6): e416–28. doi: 10.1111/hae.12015.
- Srivastava A., Brewer A.K., Mauser-Bunschoten E.P., Key N.S., Kitchen S., Llinas A., et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013; 19(1): e1–47.
- Ljung R., Auerswald G., Benson G., Jetter A., Jiménez-Yuste V., et al. Novel coagulation factor concentrates: Issues relating to their clinical implementation and pharmacokinetic assessment for optimal prophylaxis in haemophilia patients. *Haemophilia*. 2013; 19(4): 481–6.
- Collins P.W. Personalized prophylaxis. *Haemophilia*. 2012; 18(4): 131–5.
- Ezban M., Vad K., Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight®) – from design to clinical proof of concept. *Eur. J. Haematol.* 2014; 93 (Issue 5): 369–76.
- Zollner S.B., Raquet E., Müller-Cohrs J., Metzner H.J., Weimer T., Pragst I., et al. Preclinical efficacy and safety of rVIII-Single Chain (CSL627), a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb. Res.* 2013; 132(2): 280–7.
- Tiede A., Klamroth R., Oldenburg J. Turoctocog alfa (recombinant factor VIII) Manufacturing, characteristics and clinical trial results. *Hämostaseologie*. 2015; 35(14): 1–9.
- Casademunt E., Martinelle K., Jernberg M., Winge S., Tiemeyer M., Biesert L., et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol.* 2012; 89(2): 165–76.
- Kessler C., Oldenburg J., Escuriola Ettingshausen C., Tiede A., Khair K., Negrier C., Klamroth R. Spotlight on the human factor: building a foundation for the future of haemophilia A management: report from a symposium on human recombinant FVIII at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne, Australia on 12 May 2014. *Haemophilia*. 2015; 21(Suppl. 1): 1–12. doi: 10.1111/hat.12582.
- Coyle T.E., Reding M.T., Lin J.C., Michaels L.A., Shah A., Powell J. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(4): 488–96.
- Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? *Thromb. Res.* 2008; 122(Suppl. 4): 2–8. doi: 10.1016/S0049-3848(08)70027-6.
- George L.A., Camire R.M. Profile of efralotocog alfa and its potential in the treatment of hemophilia A. *J. Blood Med.* 2015; 6: 131–41. doi: 10.2147/JBM.S54632.
- Negrier C., Knobe K., Tiede A., Giangrande P., Moss J. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood*. 2011; 118(10): 2695–701.
- Krippendorff B.F., Kuester K., Kloft C., Huisinga W. Nonlinear pharmacokinetics of therapeutic proteins resulting from receptor mediated endocytosis. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2009; 36(3): 239–60.
- Xu X., Vugmeyster Y. Challenges and opportunities in absorption, distribution, metabolism, and excretion studies of therapeutic biologics. *AAPS J.* 2012; 14(4): 781–91. doi: 10.1208/s12248-012-9388-8.
- Deng R., Loyet K.M., Lien S., Iyer S., De Forge L.E., Theil F.P., et al. Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. *Drug Metab. Dispos.* 2010; 38(4): 600–5.
- Dall'Acqua W.F., Kiener P.A., Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* 2006; 281(33): 23514–24.
- Sarav M., Wang Y., Hack B.K., Chang A., Jensen M., Bao L., Quigg R.J. Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20(9): 1941–52.
- Lei T.C., Scott D.W. Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood*. 2005; 105(12): 4865–70.
- De Groot A.S., Moise L., McMurry J.A., Wambre E., Van Overvelt L., Moingeon P., et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide “Tregitopes”. *Blood*. 2008; 112(8): 3303–11.
- Young G., Mahlangu J.N., Kulkarni R., Nolan B., Liesner R., Pasi J., et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in previously-treated children with severe hemophilia A (Kids-ALONG). Presented at: 56th Annual Meeting and Exposition, December 17, 2014, San Francisco, CA. Available: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper70146.html>. Accessed February 10, 2015.
- Hoots W.K. Urgent inhibitor issues: targets for expanded research. *Haemophilia*. 2006; 12(6): 107–13.
- Metzner H.J., Pipe S.W., Weimer T., Schulte S. Extending the pharmacokinetic half-life of coagulation factors by fusion to recombinant albumin. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(5): 931–9.
- Golor G., Bensen-Kennedy D., Haffner S., Easton R., Jung K., Moises T., et al. Safety and pharmacokinetics of a recombinant fusion protein linking coagulation factor VIIa with albumin in healthy volunteers. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(11): 1977–85. doi: 10.1111/jth.12409.
- Mathias M., Khair K., Hann I., Liesner R. Rituximab in the treatment of alloimmune factor VIII and IX antibodies in two children with severe haemophilia. *Br. J. Haematol.* 2004; 125(3): 366–8.
- Kitazawa T., Igawa T., Sampei Z., Muto A., Kojima T., Soeda T., et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* 2012; 18(10): 1570–4.
- Muto A., Yoshihashi K., Takeda M., Kitazawa T., Soeda T., Igawa T., et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(2): 206–13.
- Chowdary P., Lethagen S., Friedrich U., Brand B., Hay C., Abdul Karim A., et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13(5): 743–54. doi: 10.1111/jth.12864.
- Hilden I., Lauritzen B., Sorensen B.B., Clausen J.T., Jespersgaard C., Krogh B.O., et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood*. 2012; 119(24): 5871–8.
- Waters E.K., Genga R.M., Thomson H.A., Kurz J.C., Schaub R.G., Schefflinger F., McGinness K.E. Aptamer BAX 499 mediates inhibition of tissue factor pathway inhibitor via interaction with multiple domains of the protein. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(6): 1137–45.
- Gorczyca M.E., Nair S.C., Jilma B., Priya S., Male C., Reitter S., et al. Inhibition of tissue factor pathway inhibitor by the aptamer BAX499 improves clotting of hemophilic blood and plasma. *Thromb. Haemost.* 2012; 10(1): 1581–90.
- Sorensen B., Mant T., Akinc A. Aln-AT3 Investigators. A subcutaneously administered RNAi therapeutic (ALN-AT3) targeting antithrombin for treatment of hemophilia: interim Phase I study results in healthy volunteers and patients with hemophilia A or B. Presented at: 56th Annual Meeting and Exposition, December 17, 2014, San Francisco, CA. Available: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75077.html>. Accessed Feb. 19, 2015.
- Jansen M., Schmaldienst S., Banyai S., Quehenberger P., Pabinger I., Delfler K., et al. Treatment of coagulation inhibitors with extracorporeal immunoadsorption (Ig-Therasorb). *Br. J. Haematol.* 2001; 112(1): 91–7.

38. Zeitler H., Ulrich-Merzenich G., Hess L., Konsek E., Unkrig C., Walger P., et al. Treatment of acquired hemophilia by the Bonn-Malmö Protocol: documentation of an in vivo immunomodulating concept. *Blood*. 2005; 105(6): 2287–93.
39. Berntorp E. Options for treating acute bleeds in addition to bypassing agents: extracorporeal immunoadsorption, FVIII/ FIX, desmopressin and antifibrinolytics. *Haemophilia*. 2006; 12(6): 62–6.
40. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(25): 2357–65. doi: 10.1056/NEJMoa1108046.
41. Nathwani A.C., Reiss U.M., Tuddenham E.G.D., Rosales C., Chowdhury P., McIntosh J., et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(21): 1994–2004.

Поступила 29.01.16
Принята к печати 22.11.16

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.155.392.8-036.12-06-085

Власова Ю.Ю., Морозова Е.В., Смирнова А.Г., Гиндина Т.Л., Афанасьев Б.В.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗЫ 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ И 5-АЗАЦИТИДИНА В ТЕРАПИИ БОЛЬНОГО С МИЕЛОИДНЫМ БЛАСТНЫМ КРИЗОМ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на достигнутые успехи в эру ингибиторов тирозинкиназ, прогноз больных хроническим миелолейкозом с миелоидным бластным кризом остается неблагоприятным. Миелоидный бластный криз характеризуется рефрактерностью к цитотоксическим агентам и высоким риском рецидива. В статье представлены данные литературы об использовании гипометилирующих агентов в терапии миелоидного бластного криза хронического миелолейкоза, а также описание клинического случая успешной терапии больного хроническим миелолейкозом с миелоидным бластным кризом комбинацией ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения и 5-азациитидина.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; миелоидный бластный криз; 5-азациитидин.

Для цитирования: Власова Ю.Ю., Морозова Е.В., Смирнова А.Г., Гиндина Т.Л., Афанасьев Б.В. Клиническая эффективность комбинации ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения и 5-азациитидина в терапии больного с миелоидным бластным кризом хронического миелолейкоза. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 215–217. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-215-217>

Vlasova Yu.Yu., Morozova E.V., Smirnova A.G., Gindina T.L., Afanasiev B.V.

CLINICAL EFFICACY OF THE COMBINATION OF SECOND GENERATION TYROSINE KINASE INHIBITORS AND 5-AZACITIDINE IN THE TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENT IN MYELOID BLAST CRISIS

I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St.Petersburg, 197022, Russian Federation

Even in the tyrosine kinase inhibitors era, the prognosis of patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis remains to be unfavorable. Myeloid blast crisis is characterized to be refractory to cytotoxic agents and high risk of recurrence. We described the patient with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis who was successfully treated by the combination of the second generation tyrosine kinase inhibitor and 5-azacytidine.

Key words: chronic myelogenous leukemia; myeloid blast crisis; 5-azacytidine.

For citation: Vlasova Yu.Yu., Morozova E.V., Smirnova A.G., Gindina T.L., Afanasiev B.V. Clinical efficacy of the combination of second generation tyrosine kinase inhibitors and 5-azacytidine in the treatment of chronic myeloid leukemia patient in myeloid blast crisis. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i Transfusiologiya)*. 2016; 61(4): 215–217. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-215-217>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 06 September 2016
Accepted 22 November 2016

Для корреспонденции:

Власова Юлия Юрьевна, врач-гематолог поликлинического отделения клиники «НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой», ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: jj_vlasova@mail.ru

For correspondence:

Vlasova Yulia Yu., MD, doctor-hematologist of the outpatient department clinics of the I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University. St.Petersburg, 197022, Russian Federation. E-mail: jj_vlasova@mail.ru.

Information about authors:

Vlasova Yu.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-7762-0107>; Morozova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0125-864X>; Smirnova A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6559-6931>; Gindina T.L., <http://orcid.org/0000-0002-1302-3311>; Afanasiev B.V., <http://orcid.org/0000-0002-1235-4530>.

Несмотря на достигнутые успехи в эру ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), прогноз больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) с миелоидным бластным кризом остается неблагоприятным. Миелоидный бластный криз ХМЛ характеризуется рефрактерностью к цитотоксическим агентам и высоким риском рецидива [1, 2]. Результаты трансплантации аллогенного костного мозга в данной ситуации также неутешительны [3]. Только 24–35% больных достигают полный гематологический ответ (ПГО), и общая выживаемость (ОВ) не превышает 6 мес в случае монотерапии ИТК [4–9].

Добавление химиотерапии (цитарабин и/или даунорубин) к ИТК представляется целесообразным, способным увеличить частоту получения ПГО и полного цитогенетического ответа (ПЦГО). Тем не менее ОВ колеблется в пределах от 6 до 12 мес, за исключением небольшого числа больных, которым может быть выполнена трансплантация аллогенного костного мозга в период ремиссии [10–12].

Децитабин в качестве монотерапии или в комбинации с иматинибом имеет ограниченную активность у больных ХМЛ с миелоидным бластным кризом [13–15]. Тем не менее последние данные показывают, что эпигенетические аномалии, с которыми связана прогрессия ХМЛ, привели к пересмотру взглядов на использование гипометилирующих агентов в терапии ХМЛ с миелоидным бластным кризом [16–18]. В 2013 г. опубликована работа группы французских исследователей, сообщивших о лечении 5 больных ХМЛ с миелоидным бластным кризом комбинацией 5-азациитидина и ИТК 2-го поколения (дазатиниб или нилотиниб). У 3 больных сочетание ИТК 2-го поколения и 5-азациитидина индуцировало полный и устойчивый контроль над ХМЛ [19].

Экспериментальные данные позволяют предположить, что эпигенетическая дисрегуляция является особенностью поражения стволовых клеток при ХМЛ [20, 21]. Гиперметилирование генов-супрессоров опухолей играет важную роль в прогрессии заболевания и лейкоэмической трансформации [16–18]. Таким образом, комбинация ИТК 2-го поколения и 5-азациитидина может быть рассмотрена в терапии больных ХМЛ с миелоидным бластным кризом, особенно принимая во внимание, что у большинства больных не может быть использована интенсивная химиотерапия и трансплантация аллогенного костного мозга [19].

Клиническое наблюдение

Больной П., 61 год, впервые обратился к гематологу в августе 2009 г. в возрасте 54 лет в связи с изменениями в гемограмме.

11.08.09 был установлен диагноз: ХМЛ, Ph⁺, 1-я хроническая фаза, на основании данных гемограммы (гиперлейкоцитоз $283 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитоз до $615 \times 10^9/\text{л}$, бластные клетки 3,5%; картины миелограммы (бластные клетки 2,6%), данных стандартного цитогенетического исследования (46XY, t(9;22)(q34;q11) в 100% метафаз). При молекулярно-генетическом исследовании выявлен транскрипт BCR-ABL (тип b2a2, b3a2). На момент установления диагноза у больного наблюдалась гепатоспленомегалия (по данным ультразвукового исследования: размер селезенки $22,3 \times 12,6$ см, печени +6 см). После предварительной циторедуктивной терапии гидроскарбамидом с 24.09.09 начата терапия иматинибом в суточной дозе 400 мг. Через 2 мес достигнут ПГО, через 3 мес – минимальный цитогенетический ответ – флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) Ph⁺ 50%, Ph⁻ 50%; через 6 мес ПЦГО не был получен – FISH Ph⁺ 50%, Ph⁻ 50%. У больного отмечалась гематологическая токсичность. Через 12 мес терапии иматинибом зарегистрирована утрата цитогенетического ответа, уровень экспрессии химерного гена *BCR-ABLp210* – 31,81%. В связи с гематологической токсичностью и цитогенетической резистентностью иматиниб был отменен.

С 05.09.11 выполнена смена терапии на нилотиниб в суточной дозе 800 мг, через 1 мес достигнут ПГО, через 2 мес наблюдалось развитие гематологической токсичности – тромбоцитопения (тромбоциты $13 \times 10^9/\text{л}$), лейкопения (лейкоциты $1,5 \times 10^9/\text{л}$). Препарат был отменен, проводилась трансфузия тромбоконцентрата. Перерыв в лечении составил 5 мес.

Учитывая возраст больного, течение заболевания: резистентность к ИТК 1-го поколения, наличие гематологической токсичности, потребовавшей отмену ИТК 2-го поколения, рекомендовано проведение трансплантации аллогенного костного мозга. Родственные HLA-совместимые доноры у больного отсутствовали. В международном регистре имелось ограниченное количество потенциальных неродственных доноров.

При плановом рестадировании от 01.03.12: в периферической крови сохранялась цитопения (лейкопения, тромбоцитопения),

в миелограмме 2,2% бластных клеток. Стандартное цитогенетическое исследование от 01.03.12: 46XY, t(9;22)(q34;q11)[12]/47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[8]. Патологический клон с реципрокной транслокацией между длинными плечами 9-й и 22-й хромосом выявлен в 100% метафаз. В 40% клеток обнаружена трисомия 8-й хромосомы. Зарегистрирована цитогенетическая прогрессия в виде появления новых клональных хромосомных изменений – клональная эволюция (1-я фаза акселерации). При молекулярно-генетическом исследовании отмечено нарастание уровня экспрессии химерного гена *BCR-ABLp210* до 125%, *BCR-ABLp190* – 0%. Выполнено исследование мутационного статуса методом прямого секвенирования – мутации в гене *BCR-ABL* не выявлены.

С 02.04.12 начата терапия дазатинибом в суточной дозе 70 мг. После 6 мес терапии дазатинибом в дозе 50–70 мг/сут достигнута клинико-гематологическая стабилизация (хроническая 2-я фаза от 10.12.12).

В октябре 2013 г. зарегистрировано появление дополнительных хромосомных поломок – патологический клон с реципрокной транслокацией t(9;22) и трисомией 8 выявлен в 100% клеток, из них в 10% метафаз – клонная эволюция с приобретением изохромосомы 17. Продолжали терапию дазатинибом в суточной дозе 70 мг. Увеличить дозу до терапевтической не представлялось возможным из-за усугубления цитопении.

С сентября 2014 г. отмечено появление единичных бластных клеток в периферической крови на фоне цитопении, впервые зарегистрировано появление химерного гена *BCR-ABL p190* в титре 0,0035%.

Рестадирование от 17.06.15: в миелограмме 7% бластных клеток, при стандартном цитогенетическом исследовании сохраняется 100% Ph⁺, увеличилось процентное соотношение изохромосомы 17. Учитывая нарастающую цитопению, с 04.07.15 начата терапия дазатинибом 35 мг/сут в комбинации с интерфероном 3 000 000 ЕД 1 раз в неделю. На этом фоне с октября 2015 г. прогрессия заболевания (нарастание количества бластных клеток в периферической крови). С декабря 2015 г. смена ИТК на нилотиниб в суточной дозе 400 мг (из-за стойкой цитопении в периферической крови).

Повторно проведен поиск неродственного донора – в международном регистре минимальное число потенциальных полностью и частично HLA-совместимых доноров. 14.01.16 в периферической крови зафиксировано 32% бластных клеток, в миелограмме – 12% бластных клеток. При цитохимическом исследовании обнаружены бластные клетки миелоидного типа. Констатирован 1-й бластный криз по миелоидному типу.

Консилиум в составе ведущих специалистов клиники рекомендовал проведение терапии гипометилирующими препаратами в комбинации с ИТК. 15–19 февраля 2016 г. проведен курс децитабина в суточной дозе 50 мг в течение 5 дней в комбинации с нилотинибом. Лечение больной перенес удовлетворительно, количество бластных клеток в миелограмме снизилось до 8%. В периферической крови в послекурсовом периоде нарастание цитопении, терапия нилотинибом прекращена. Перерыв в лечении составил 18 дней. При мониторинге показателей периферической крови от 10.03.16 обнаружено 50% бластных клеток миелоидного типа.

Начата терапия 5-азациитидином (14–18.03.16) в суточной дозе 100 мг в комбинации с нилотинибом в суточной дозе 200 мг [19]. Терапию перенес удовлетворительно, признаков токсичности не отмечено.

При рестадировании через 3 мес (июнь 2016 г.) в клиническом анализе крови: гемоглобин 124 г/л, лейкоциты $3,6 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты $54 \times 10^9/\text{л}$; в лейкоцитарной формуле миелоцитов 1%, палочкоядерных 15%, сегментоядерных 22%, эозинофилов 2%, базофилов 11%, лимфоцитов 44%, моноцитов 5%; в миелограмме – представленные препараты из пункта костного мозга гипоклеточные. Эритроидный росток составил 13%, представлен элементами с нормобластическим типом кроветворения с наличием мегалобластичности в части элементов. Миелоидный росток сужен до 49%. Отмечена задержка созревания на стадии бластных клеток до 6%, базофилия до 6%, моноцитоз до 8,5%. Выраженный лимфоцитоз до 38% (без особенностей).

Всего проведено 4 курса 5-азациитидина в комбинации с нилотинибом. Терапия нилотинибом продолжается в суточной дозе 400 мг.

В результате проведенного лечения достигнута 3-я хроническая фаза, что свидетельствует об эффективности применения 5-азациитидина в комбинации с ИТК 2-го поколения (нилотинибом) в лечении больного ХМЛ с миелоидным бластным кризом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kantarjian H.M., Shan J., Smith T., Talpaz M., Kozuch P., Rios M.B., et al. Response to therapy is independently associated with survival prolongation in chronic myelogenous leukemia in the blastic phase. *Cancer*. 2001; 92(10): 2501–7.

2. Sacchi S., Kantarjian H.M., O'Brien S., Cortes J., Rios M.B., Giles F.J., et al. Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. *Cancer*. 1999; 86(12): 2632–41.
3. Gratwohl A., Hermans J., Niederwieser D., Frasson F., Arcese W., Gahrton G., et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1993; 12(5): 509–16.
4. Cortes J., Kim D.W., Raffoux E., Martinelli G., Ritchie E., Roy L., et al. Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia*. 2008; 22(12): 2176–83. doi: 10.1038/leu.2008.221.
5. Kantarjian H.M., Cortes J., O'Brien S., Giles F.J., Albitar M., Rios M.B., et al. Imatinib mesylate (ST1571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood*. 2002; 99(10): 3547–53.
6. Palandri F., Castagnetti F., Testoni N., Luatti S., Marzocchi G., Bassi S., et al.; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Chronic myeloid leukemia in blast crisis treated with imatinib 600 mg: outcome of the patients alive after a 6-year follow-up. *Haematologica*. 2008; 93(12): 1792–6. doi: 10.3324/haematol.13068.
7. Sawyers C.L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J.M., Miller C.B., Ottmann O.G., et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002; 99(10): 3530–9.
8. Sureda A., Carrasco M., Miguel M., Martinez J.A., Conde E., Sanz M.A., et al. Imatinib mesylate as treatment for blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2003; 88(11): 1213–20.
9. Saglio G., Hochhaus A., Goh Y.T., Masszi T., Pasquini R., Maloisel F., et al. Dasatinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant chronic myeloid leukemia in blast phase after 2 years of follow-up in a phase 3 study: efficacy and tolerability of 140 milligrams once daily and 70 milligrams twice daily. *Cancer*. 2010; 116(16): 3852–61. doi: 10.1002/cncr.25123.
10. Deau B., Nicolini F., Guilhot J., Huguet F., Guerci A., Legros L., et al. The addition of daunorubicin to imatinib mesylate in combination with cytarabine improves the response rate and the survival of patients with myeloid blast crisis chronic myelogenous leukemia (AFR01 study). *Leuk. Res.* 2011; 35(6): 777–82. doi: 10.1016/j.leukres.2010.11.004.
11. Fruehauf S., Topaly J., Buss E.C., Fischer T., Ottmann O.G., Emmerich B., et al. Imatinib combined with mitoxantrone/etoposide and cytarabine is an effective induction therapy for patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Cancer*. 2007; 109(8): 1543–9.
12. Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Garcia-Manero G., O'Brien S., Faderl S., Ravandi F., et al. A pilot study of imatinib, low-dose cytarabine and idarubicin for patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast phase. *Leuk. Lymphoma*. 2007; 48(2): 283–9.
13. Kantarjian H.M., O'Brien S., Keating M., Beran M., Estey E., Giralt S., et al. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1997; 11(10): 1617–20.
14. Kantarjian H.M., O'Brien S., Keating M., Beran M., Estey E., Giralt S., et al. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2003; 98(3): 522–8.
15. Oki Y., Kantarjian H.M., Gharibyan V., Jones D., O'Brien S., Verstovsek S., et al. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2007; 109(5): 899–906.
16. Janssen J., Denkers F., Valk P., Cornelissen J., Schuurhuis G., Ossenkoppele G. Methylation patterns in CD34 positive chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Haematologica*. 2010; 95(6): 1036–7. doi: 10.3324/haematol.2009.015693.
17. Jelinek J., Gharibyan V., Estecio M., Kondo K., He R., Chung W., et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22110. doi: 10.1371/journal.pone.0022110.
18. Uehara E., Takeuchi S., Yang Y., Fukumoto T., Matsushashi Y., Tamura T., et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Oncol. Lett.* 2012; 3(1): 190–2.
19. Ghez D., Micol J., Pasquier F., Auger N., Saada V., Spentchian M., et al. Clinical efficacy of second generation tyrosine kinase inhibitor and 5-azacytidine combination in chronic myelogenous leukaemia in myeloid blast crisis. *Eur. J. Cancer*. 2013; 49(17): 3666–70. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.147.
20. Li L., Wang L., Li L., Wang Z., Ho Y., McDonald T., Holyoake T., et al. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. *Cancer Cell*. 2012; 21(2): 266–81. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.020.
21. Zhang B., Strauss A., Chu S., Li M., Ho Y., Shiang K., et al. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell*. 2010; 17(5): 427–42. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.011.

Поступила 06.09.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.295-055.5/.7-07

Кумскова М.А., Яструбинская О.И., Лихачева Е.А., Васильев С.А., Двирный В.Н.,
Коняшина Н.И., Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Зозуля Н.И.

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА БЕРНАРА–СУЛЬЕ

ФГБУ «Гематологический научный центр Минздрава России», 126167, г. Москва, Россия

Синдром Бернара–Сульт (СБС) – одна из редких форм наследственных тромбоцитопатий. Основой патогенеза СБС является дефицит или дефект гликопротеинового комплекса GPIb-IX-V на поверхности тромбоцитов – главного тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда (vWF). При связывании vWF с комплексом GPIb-IX-V происходят инициация первичного гемостаза и обеспечение адгезии тромбоцитов в месте повреждения сосуда. Диссоциация плазменного, сосудистого и тромбоцитарного звеньев коагуляции приводит к развитию геморрагического синдрома микроциркуляторного или смешанного типов, характерные особенности которых описаны в клиническом случае больной СБС. Алгоритм диагностики СБС включает в себя оценку функциональных свойств, морфологии и биохимических характеристик тромбоцитов с обязательным использованием метода проточной цитофлюориметрии, позволяющего выявить дефицит комплекса GPIb-IX-V на поверхности тромбоцитов.

Ключевые слова: синдром Бернара–Сульт; тромбоциты; макротромбоцитопения; наследственные тромбоцитопатии; функция тромбоцитов; коагулопатии; гемостаз.

Для цитирования: Кумскова М.А., Яструбинская О.И., Лихачева Е.А., Васильев С.А., Двирный В.Н., Коняшина Н.И., Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Зозуля Н.И. Особенности диагностики синдрома Бернара–Сульт. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 2016; 61(4): 217–221. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-217-221>

Для корреспонденции:

Кумскова Мария Алексеевна, врач-гематолог научно-консультативного отдела коагулопатий «Гематологический научный центр» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия. E-mail: kumskova.m@blood.ru.

For correspondence:

Kumskova Maria A., hematologist of the National Research Center for Hematology. Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: kumskova.m@blood.ru.

Information about authors:

Kumskova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-2477-3011>, Scopus Author ID: 36651226000, Researcher ID: A-7994-2016; Yastrubinskaya O.I., Scopus Author ID: 26424146000; Likhacheva E.A., Scopus Author ID: 7004371191; Vasiliev S.A., Scopus Author ID: 36973343200; Dvirnyk V.N. Scopus Author ID: 36503832100; Konyashina N.I., Scopus Author ID: 36650927000; Alradi L.S., <http://orcid.org/0000-0002-6702-9575>, Researcher ID: I-2390-2016, Scopus Author ID: 6506792955; Moiseeva T.N., Scopus Author ID: 7004165307; Zozulya N.I., <http://orcid.org/0000-0001-7074-0926>, Researcher ID: N-3151-2014, Scopus Author ID: 24451501900.

Kumskova M.A., Yastrubinskaya O.I., Likhachyova E.A., Vasiliev S.A., Dvirnyk V.N.,
Konyashina N.I., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N., Zozulya N.I.

FEATURES OF DIAGNOSTICS OF BERNARD-SOULIER SYNDROME

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Bernard–Soulier syndrome (BSS) is the rare platelet disorder. It is caused by the deficiency or defect of the glycoprotein (GP) Ib-IX-V complex on the surface of platelets – the main receptor for von Willebrand factor (vWF). Binding of vWF with GP Ib-IX-V complex initiates primary hemostasis and provides platelets adhesion at the site of the injured blood vessel. Dissociation of plasma, vascular and thrombocytic hemostasis gives rise to the development of the microcirculatory or mixed hemorrhagic syndrome. The typical features of such types are considered in the clinical case of the BSS female patient. Diagnostic algorithm for BSS includes the evaluation of functional properties, morphology and biochemical characteristics of platelets with the compulsory use of flow cytometry, allowing to reveal the deficiency of GP Ib-IX-V complex on the surface of platelets.

Key words: Bernard–Soulier syndrome; platelets; macrothrombocytopenia; inherited platelet disorders; platelet function; coagulopathy; hemostasis.

For citation: Kumskova M.A., Yastrubinskaya O.I., Likhachyova E.A., Vasiliev S.A., Dvirnyk V.N., Konyashina N.I., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N., Zozulya N.I. Features of diagnostics of Bernard–Soulier syndrome. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)* 2016; 61(4): 217-221. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-217-221>

Commendation. The authors thank I.A. Demina for performing flow cytometry assay.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 12 October 2016

Accepted 22 November 2016

Наследственные тромбоцитопатии представляют собой гетерогенную группу генетически обусловленных заболеваний с функциональной недостаточностью тромбоцитов, обусловленной дефектами мембранной структуры клеток, нарушением содержания внутриклеточных гранул и повреждением сигнальных путей передачи. Жизнеугрожающие кровотечения при наследственном нарушении функции тромбоцитов встречаются редко (1:1000 населения), в то время как спонтанные и посттравматические кровотечения из слизистых, экхимозы распространены достаточно широко [1]. Дифференциальная диагностика различных форм тромбоцитопатий основывается на определении функциональных свойств, морфологии и биохимических характеристик тромбоцитов [2].

Этиология. Синдром Бернара–Суллье (СБС), также известный как геморрагическая тромбоцитарная дистрофия, является наследственным дефектом созревания мегакариоцитов и проявляется геморрагическим синдромом по микроциркуляторному и смешанному типам. В основе патогенеза заболевания лежит количественный дефект или снижение функциональной активности комплекса GPIb-IX-V на поверхности тромбоцитов и мегакариоцитов. Комплекс GPIb-IX-V является основным тромбо-

цитарным рецептором для фактора Виллебранда (vWF), при связывании с которым происходят инициация первичного гемостаза и обеспечение адгезии тромбоцитов в месте повреждения сосуда [3]. GPIb-IX-V состоит из четырех субъединиц: GPIb α (143 кД), GPIb β (22 кД), GPIX (20 кД) и GPV (83 кД). Это гептамер, в котором одна молекула GPV нековалентно связана с двумя молекулами GPIb и GPIX. Связывание с vWF происходит посредством N-терминального конца GPIb α (рис. 1). В дополнение к этому N-терминальный домен GPIb α является основным участком связывания для множества лигандов, отвечающих за взаимодействие тромбоцитов с субэндотелиальным матриксом и другими клетками при воспалении и тромбозе. Кроме того, GPIb-IX-V является ключевым рецептором при регулировке тромбоцитарного каскада свертывания, в частности внутреннего пути активации, посредством связывания N-терминального конца GPIb α с тромбином, факторами свертывания крови XI и XII, высокомолекулярным кининогеном и α -тромбином. Также GPIb-IX-V отвечает за поддержание формы активированного тромбоцита путем связывания поверхности тромбоцита с микротрубочками и микрофиламентами цитоскелета. Плотность гликопротеинового комплекса составляет 25 000 единиц на 1 тромбоцит [4–6].

СБС наследуется по рецессивно-аутосомному типу. Известно 112 мутаций генов *GPIBA* (17q13.2, 45 мутаций преимущественно по типу делеции и нонсенс-мутаций), *GPIBB* (22q11.21, 38 мутаций преимущественно миссенс-мутаций) и *GP9* (3q21.3, 28 мутаций преимущественно миссенс-мутаций), кодирующих субъединицы гликопротеинового комплекса GPIb α , GPIb β и GPIX соответственно. Мутация в гене *GPIBB* часто также ассоциирована с наличием врожденных пороков развития сердца, лицевой мальформацией, аплазией тимуса – симптомами, характерными для синдрома Ди Джорджи. Наличие у таких пациентов макротромбоцитопении и геморрагического синдрома требует исключения СБС [7]. После удаления сигнального белка гены GP состоят из N-терминальных доменов, богатых повторами лейцина (LRR), трансмембранной спирали и короткого цитоплазматического конца (рис. 2) [8]. Большинство мутаций приводит к нарушению взаимодействия между субъединицами, в результате чего значительно снижается экспрессия всего комплекса на поверхности тромбоцитов. Однако возможны варианты, когда комплекс GPIb-IX-V содержится в нормальном количестве или незначительно снижен, но теряет способность связываться с vWF. Чаще всего это ассоциировано с мутацией гена *GPIBA* (p.Leu73Phe, p.Ala156Val и p.Asn41His). При данных мутациях отмечается доминантный тип наследования СБС. Характерной клинической картиной для СБС является умеренная тромбоцитопения с незначительно увеличенным средним объемом тромбоцитов [9, 10]. Кроме того, в результате дефицита

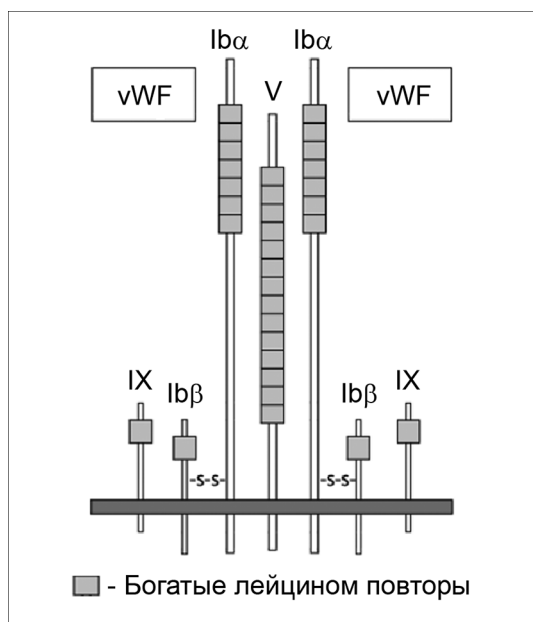


Рис. 1. Схематическое изображение комплекса GPIb-IX-V [4].

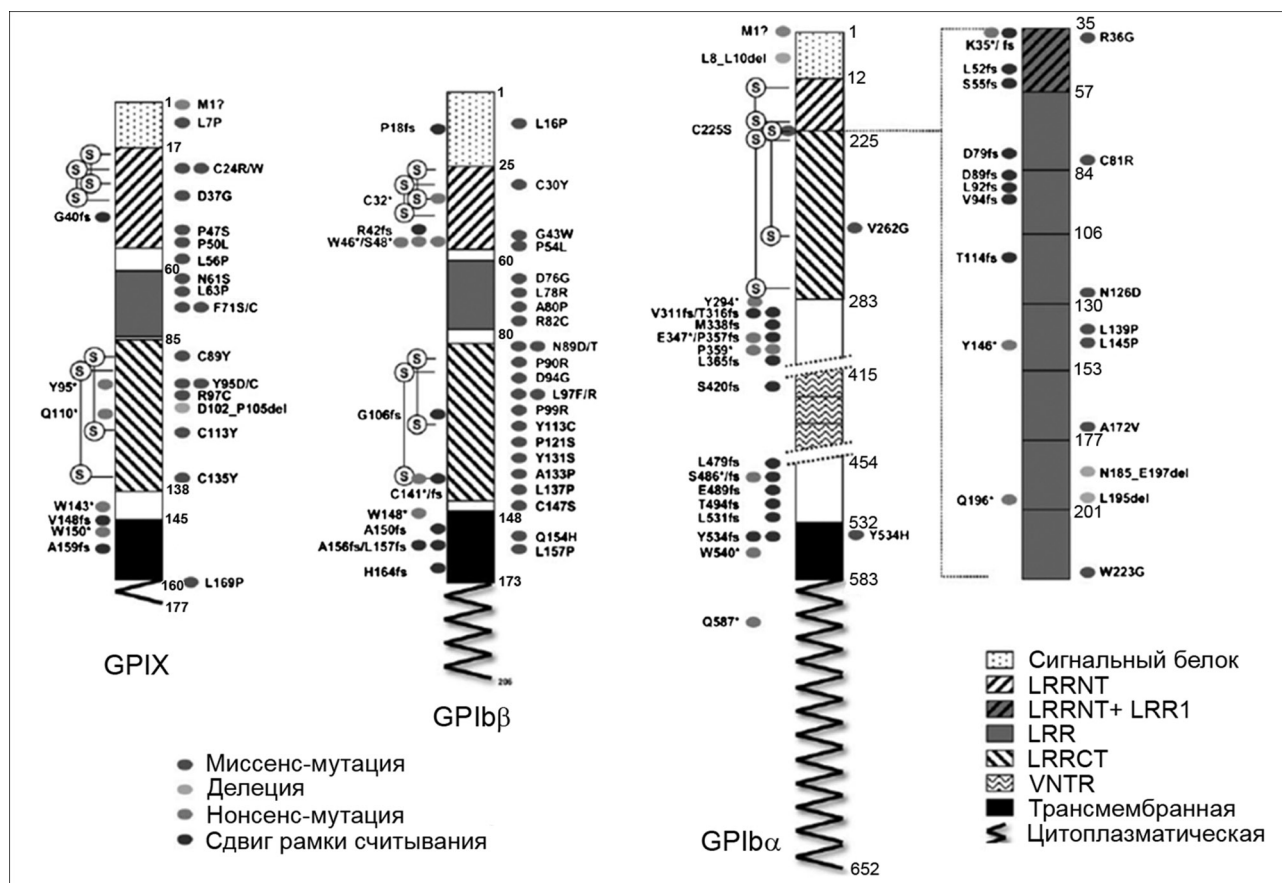


Рис. 2. Схематическое представление *GPIIb*, *GPIIb* и *GPIIX*, отражающее разные домены [8]. Локализация мутация отмечена относительно базы данных UniProt под номером P07359, P13224 и P14770 соответственно. Позиции LRRNT состоят из LRR1, LRR2–8 и LRRCT *GPIIb* [24]. По данным P. McEwan и соавт. [25], ковалентные дисульфидные связи гена *GPIIX* основаны на консервативной последовательности *GPIIX* с *GPIIb*.

GPIIb-IX-V в тромбоцитах при СБС в условиях стимуляции отмечаются повышенный выход фосфатидилсерина на поверхность тромбоцитов и значительное снижение внутреннего мембранного потенциала митохондрий, что является начальными признаками апоптоза [11].

Частота встречаемости СБС менее 1 случая на 1 млн населения. В литературе имеется всего около 110 описанных клинических случаев. Однако не исключено, что данная патология может встречаться и чаще ввиду недостаточного обследования населения с геморрагическим синдромом.

Впервые СБС был описан в 1948 г. французскими гематологами J. Bernard и J. Soulier [12], которые обнаружили у молодого человека с удлинённым временем кровотечения тромбоцитопению с гигантскими тромбоцитами. В своей статье они описали это как геморрагическую тромбоцитарную дистрофию. Манифестация заболевания чаще всего происходит сразу после рождения или в раннем детстве и проявляется в виде петехиальной геморрагической сыпи, экхимозов, носовых и десневых кровотечений. Реже отмечаются желудочно-кишечные кровотечения и гематурия. Выраженный геморрагический синдром чаще всего появляется при травмах, начале менструаций у девушек, хирургических вмешательствах, в том числе при аденодонзилэктомии, экстракции зубов. Массивные гематомы мягких тканей встречаются редко. Тяжесть и частота возникновения геморрагического синдрома могут различаться среди пациентов [13, 14].

Приобретенный СБС может встречаться у больных острым миелоидным лейкозом. В результате повышения концентрации гранулоцитарной эластазы происходит разрушение комплекса *GPIIb-IX-V* на поверхности тромбоцитов [15].

Диагностика. Критериями диагноза СБС являются наличие геморрагического синдрома у больного и его родственников, макротромбоцитопения, лабораторное подтверждение качественного дефекта тромбоцитов в виде снижения комплекса *GPIIb-IX-V* на поверхности тромбоцитов. При выявлении клиниче-

ских проявлений тромбоцитопатии вторым этапом диагностики является выполнение клинического анализа крови с обязательным подсчетом количества тромбоцитов по Фонио. Морфологический анализ тромбоцитов позволяет получить дополнительную информацию о количестве и размере тромбоцитов, наличии их конгломератов. Важно помнить, что наличие тромбоцитопении в общем анализе крови не исключает наследственного качественного дефекта тромбоцитов. В группе наследственных тромбоцитопатий с тромбоцитопенией выделяют подгруппы в зависимости от размера тромбоцитов:

- с микротромбоцитопенией – размер тромбоцитов менее 2 мкм (синдром Вискотта–Олдрича, X-сцепленная тромбоцитопения);
- с нормотромбоцитопенией – от 2 до 4 мкм (врожденная мегакариотарная тромбоцитопения, ТАР-синдром, мегакариотарная тромбоцитопения с врожденным радиоульнарным синостомом);
- с макротромбоцитопенией – более 5 мкм (СБС, псевдоблезнь Виллебранда, синдром серых тромбоцитов, группа синдромов MYH9 и др.) [16, 17].

Третий этап лабораторной диагностики – проведение оптической агрегометрии. В настоящее время данный метод является основным для подтверждения нарушения агрегации тромбоцитов. Метод оптической агрегометрии основан на оценке фотометром светопропускающей способности (агрегации в %) богатой тромбоцитами цитратной плазмы при добавлении в нее агонистов агрегации ристомидина, аденозиндифосфата (АДФ), коллагена, адреналина, арахидоновой кислоты, тромбосана. С целью подтверждения нарушения агрегации тромбоцитов исследование необходимо повторить как минимум один раз. Кроме того, при исследовании индуцированной агрегации тромбоцитов необходимо собрать подробный анамнез о приеме лекарственных и гомеопатических препаратов, которые могут влиять на результат анализов. Лишь для небольшого числа тромбоцитопатий

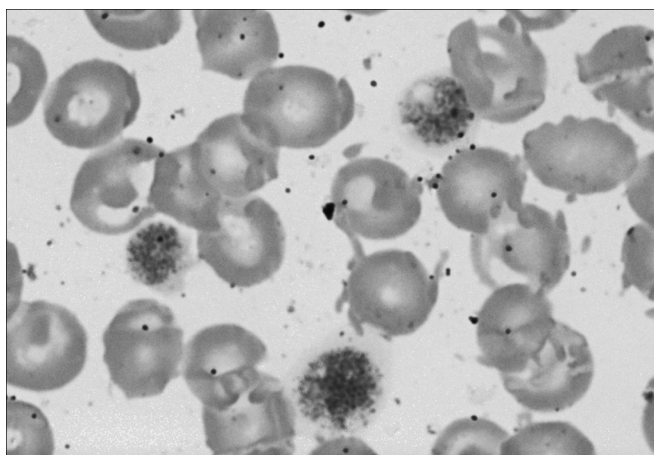


Рис. 3. Гигантские тромбоциты при синдроме Бернара–Сулье. Окраска по Романовскому–Гимзе. Ув. 500.

существует специфическая картина нарушения агрегаций, которая помогает врачу установить соответствующий диагноз. Но даже типичная кривая агрегации не позволяет дифференцировать подтипы внутри конкретного диагноза. С целью верификации диагноза проводят исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Тест основан на определении специфических антител, меченных флюорофорами, связывающихся с тромбоцитарными антигенами. Особенностью настоящего метода также является то, что исследуют тромбоциты как в покое, так и при активации пептидными аналогами коллагена и тромбина. В целом проточная цитофлуориметрия позволяет определить активность поверхностных интегринов (способность к адгезии), гликопротеинов (способность к агрегации), состояние внутриклеточных компонентов тромбоцитов (α и плотных гранул), выход фосфатидилсерина на поверхность тромбоцитов – маркера максимальной степени активации. Это является клинически значимым, так как дает возможность выявить индивидуальные особенности, прогнозировать изменение свойств тромбоцитов, в том числе при назначении терапии. В качестве контроля использовали данные 10 здоровых взрослых доноров [18].

В отличие от других тромбоцитопатий СБС имеет характерную лабораторную картину – макротромбоцитопения в мазке крови, снижение агрегации тромбоцитов с ристомисином на фоне нормальной агрегации с остальными агонистами, также может наблюдаться понижение агрегации с тромбином. При исследовании тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии отмечается снижение комплекса GPIb-IX-V.

С целью дифференциальной диагностики СБС необходимо исключить такие наследственные заболевания, как болезнь Виллебранда (снижение активности и/или количества vWF, нормальный размер тромбоцитов), синдром Вискотта–Олдрича и X-сцепленную тромбоцитопению (микротромбоцитопения в мазке крови), группу синдрома гена *MUN9* (нейтрофильные включения) и другие тромбоцитопатии, ассоциированные с макротромбоцитопенией [19]. Учитывая особенности дебюта заболевания в раннем детском возрасте с тромбоцитопенией в клиническом анализе крови, СБС очень часто принимают за идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру. Многие больные СБС имеют в анамнезе лечение глюкокортикоидами, спленэктомии без значимого клинического эффекта [20].

Лечение. Тактика терапии СБС зависит от клинической картины заболевания. Такие геморрагические проявления, как носовые и десневые кровотечения, купируют антифибринолитическими препаратами (транексамовая и аминокапроновая кислота, гемостатическая губка). При развитии массивных кровотечений, проведении оперативных вмешательств (в том числе при экстракции зубов) препаратом выбора является recombinant активированный фактор свертывания крови VII (rFVIIa, эптаког альфа) в дозе 70–90 мкг/кг каждые 2–4 ч [21]. Доза может варьировать в зависимости от клинической картины или объема оперативного вмешательства. В терапевтических дозах rFVIIa напрямую независимо от тканевого фактора активирует FX на поверхности активированных тромбоцитов, локализованных в зоне повреждения. В результате этого происходит

Результаты исследования функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии у больной С.

Параметр	Значение параметра	
	у больной С.	у здоровых доноров ($n = 10$)
CD42b, усл.ед.:		
неактивированные тромбоциты	0	2471–5347
активированные тромбоциты	0	1991–5136
CD61, усл.ед.:		
неактивированные тромбоциты	6738	1982–4000
активированные тромбоциты	10542	3828–7030
PAC1, усл.ед.:		
неактивированные тромбоциты	128	89–135
активированные тромбоциты	936	884–2476
Merapcrine, усл.ед.:		
неактивированные тромбоциты	2114	655–1179
активированные тромбоциты	1090	107–236
Индекс активации	1,9	3,4–6,7
CD62p, усл.ед.:		
неактивированные тромбоциты	1089	304–631
активированные тромбоциты	49365	11453–17159
Annexin V, %:		
неактивированные тромбоциты	0,9	0,33–1,5
активированные тромбоциты	2,7	2,5–38

Примечание. CD42b – GPIb-IX-V; CD61 – суммарная фракция интегрина α IIb β 3 (GPIIb-IIIa); PAC1 – активная форма интегрина α IIb β 3; Merapcrine – наличие плотных гранул; CD62p – P-селектин α -гранул; Annexin V – фосфатидил-положительные тромбоциты; усл.ед. – условные единицы флюоресценции.

усиление местного образования FXa, тромбина и фибрина. Ввиду особенностей патогенеза СБС и нарушения связи имеющих тромбоцитов с vWF при жизнеугрожающих кровотечениях рекомендовано проводить трансфузию концентрата тромбоцитов. В данном случае нельзя забывать о риске развития антитромбоцитарных антител, что может привести к значимому ухудшению течения основного заболевания. В редких случаях при тяжелом течении СБС возможно проведение трансплантации костного мозга [22]. Кроме того, на сегодняшний день активно ведутся разработки в области генной терапии СБС путем встраивания человеческого *GPIBA* посредством лентивирусного вектора, получены предварительные положительные результаты при применении данной терапии у мышей [23].

Приводим клиническое наблюдение больной с синдромом Бернара–Сулье.

Больная С., 32 года, обратилась в ФГБУ ГНЦ Минздрава России (Москва) с целью диагностики и определения тактики ведения с жалобами на спонтанные и посттравматические гематомы, меноррагии. Геморрагические проявления отмечались с раннего детства в виде спонтанных и посттравматических экхимозов и гематом, длительных носовых и десневых кровотечений, требующих вызовов бригады скорой помощи. В возрасте 2 лет было выявлено снижение тромбоцитов до $20 \times 10^9/\text{л}$ и установлен диагноз идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. С терапевтической целью была выполнена спленэктомия, осложнившаяся развитием геморрагического синдрома в послеоперационном периоде. Повышения тромбоцитов после спленэктомии не отмечалось. С 13 лет наблюдались меноррагии с развитием хронической постгеморрагической анемии. Уменьшение менструальных кровотечений отмечалось при приеме заместительной гормональной терапии. В возрасте 16 лет развилось спонтанное кровоизлияние в брюшную полость. Была проведена лапаротомия, осложнившаяся развитием кровотечения в раннем послеоперационном периоде. В возрасте 31 года пациентку госпитализировали в стационар по месту жительства в связи с острым нарушением мозгового кровообращения по геморрагическому типу с формированием субдуральной гематомы, через месяц у нее произошло повторное спонтанное кровоизлияние в головной мозг. Проводили гемостатическую терапию свежесмороженной плазмой. Неврологической симптоматики не отмечалось. Сведений о наличии семейной отягощенности по коагулопатиям не имеется.

В результате обследования у пациентки в клиническом анализе крови по данным автоматического анализатора выявлено снижение концентрации тромбоцитов до $5 \times 10^9/\text{л}$, при подсчете тромбоцитов по Фаною – $68 \times 10^9/\text{л}$. При морфологическом исследовании выявлены гигантские тромбоциты без дополнительных включений (рис. 3). Исследование методом световой агрегометрии не проводили в виду снижения концентрации тромбоцитов менее $80\text{--}100 \times 10^9/\text{л}$. С целью верификации диагноза больную направили в ФГБУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России (Москва) для проведения исследования функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) методом проточной цитофлюориметрии на приборе Novocyte (“Accea Bioscience”, США). По результатам ФАТ было выявлено отсутствие гликопротеина GPIb-IX-V в сочетании с дефицитом и дисфункцией плотных гранул. Повышенное содержание суммарной фракции интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и α -гранул, возможно, компенсаторного характера (см. таблицу). При измерении показателей плазменного звена гемостаза значимых изменений не выявлено. Молекулярно-генетическую диагностику не проводили.

Таким образом, в результате проведенного обследования у больной С. были выявлены:

- макротромбоцитопения, подтвержденная морфологическим исследованием тромбоцитов в мазке;
- отсутствие нарушений в плазменном гемостазе;
- отсутствие комплекса GPIb-IX-V при проведении ФАТ.

На основании имеющихся клинико-лабораторных данных установлен диагноз СБС. С учетом анамнеза, тяжелого клинического фенотипа заболевания была рекомендована терапия rFVIIa. После назначения терапии rFVIIa у больной С. отмечено значительное уменьшение длительности кровотечения: для купирования одного геморрагического эпизода требовалось 2 введения препарата с интервалом в 4 ч. Улучшение клинической картины заболевания позволило пациентке быть социально активной.

В будущем планируется проведение молекулярно-генетической диагностики у больной и ее родственников.

Таким образом, наследственные тромбоцитопатии требуют комплексного подхода к диагностике начиная с тщательного сбора анамнеза, объективного осмотра и заканчивая проведением специфических тестов. Отсутствие наследственности не исключает наличия дефекта в генах, ответственных за функцию тромбоцитов. При диагностическом поиске наследственных тромбоцитопатий должны быть исключены вторичные тромбоцитопении, нарушения плазменного гемостаза, первичные иммунодефициты, аутоиммунные заболевания. Важным является генетический анализ, позволяющий установить конкретную мутацию и при возможности проследить ее в родословной. Пациенты с наследственной тромбоцитопатией должны наблюдаться в специализированных гематологических центрах с целью своевременной коррекции терапии.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Ирине Андреевне Деминой за проведение исследования проточной цитофлюориметрии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

14. Демина И.А., Кумскова М.А., Пантелеев М.А. Тромбоцитопатии. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2015; 2(1): 54–60.
15. Кумскова М.А., Демина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серегина Е.А., Бондар Е.В. и др. Диагностика тромбоцитопатии Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2015; 14(4): 17–24.
16. Демина И.А., Зозуля Н.И., Лихачева Е.А., Васильев С.А., Яструбинская О.И., Пантелеев М.А. Синдром Германского–Пудлака: особенности дифференциальной диагностики редкой формы наследственной тромбоцитопатии. *Гематология и трансфузиология*. 2015; 60(4): 41–4.
17. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Кумскова М.А. *Федеральные рекомендации по диагностике и лечению тромбоцитопатий у детей и подростков*. М.: Издательство НОДГО; 2015.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Daskalakis M., Colucci G., Keller P., Rochat S., Silzle T., Biasiutti F.D., et al. Decreased generation of procoagulant platelets detected by flow cytometric analysis in patients with bleeding diathesis. *Cytometry Part B Clin. Cytom.* 2014; 86(6): 397–409. doi: 10.1002/cyto.b.21157.

2. Bolton-Maggs P.H., Chalmers E.A., Collins P.W., Harrison P., Kitchen S., Liesner R.J., et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br. J. Haematol.* 2006; 135(5): 603–33.
3. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy) *Orphanet. J. Rare Dis.* 2006; 1: 46.
4. Bussel J.B., Kunicki T.J., Michelson A.D. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2000; 222–40.
5. Andrews R.K., Berndt M.C. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin. Thromb. Hemost.* 2013; 39(6): 656–62.
6. Renhao L., Jonas E. The Organizing Principle of Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(4): 605–14.
7. Kunishima S., Imai T., Kobayashi R., Kato M., Ogawa S., Saito H. Bernard-Soulier syndrome caused by a hemizygous GPIIb/3 mutation and 22q11.2 deletion. *Pediatr. Int.* 2013; 55(4): 434–7.
8. Savoia A., Kunishima S., De Rocco D., Zieger B., Rand M.L., Pujol-Noix N., et al. Spectrum of mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum. Mutat.* 2014; 35(9): 1033–45.
9. Hadjicacem B., Elleuch H., Gargouri J., Gargouri A. Bernard-Soulier syndrome: novel nonsense mutation in GPIIb/3 gene affecting GPIIb-IX complex expression. *Ann. Hematol.* 2009; 88(5): 465–72.
10. Savoia A., Pastore A., De Rocco D., Civaschi E., Di Stazio M., Bottega R., et al. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica*. 2011; 96(3): 417–23.
11. Nurden A.T., Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br. J. Haematol.* 2014; 165(2): 165–78.
12. Bernard J., Soulier J.P. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. *Semin. Hop. Paris*. 1948; 24: 3217.
13. Nurden A.T. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(8): 1773–82.
14. Demina I.A., Kumsikova M.A., Panteleev M.A. Thrombocytopathy. *Russian Journal of Children Hematology and Oncology (Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii)*. 2015; 2(1): 54–60. (in Russian)
15. Aziz K.A. An acquired form of Bernard Soulier syndrome associated with acute myeloid leukemia. *Saudi Med. J.* 2005; 26 (7): 1095–1098.
16. Kumar R., Kahr W.H. Congenital thrombocytopenia clinical manifestations, laboratory abnormalities, and molecular defects of a heterogeneous group of conditions. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2013; 27(3): 465–94.
17. Thon J.N., Italiano J.E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; (210): 3–22. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5_1.
18. Kumsikova M.A., Demina I.A., Podoplelova N.A., Balandina A.N., Seragina E.A., Bondar E.V., et al. Diagnosis of Glanzmann's thrombasthenia by assessment of plasma and platelet hemostatic parameters. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology (Russian Journal (Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii))*. 2015; 14(4): 17–24. (in Russian)
19. Demina I.A., Zozulya N.I., Likhacheva E.A., Vasilyev S.A., Yastrubinskaya O.I., Panteleev M.A. The Germansky-Pudlack syndrome: Differential diagnosis of a rare hereditary thrombocytopathy. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i Transfuziologiya)*. 2015; 60(4): 41–4. (in Russian)
20. Rumiyansev A.G., Maschan A.A., Kumsikova M.A. *Federal recommendations of diagnostics and treatment of platelet disorders in children*. Moscow: National Society of Pediatric Hematology and Oncology; 2015. (in Russian)
21. Franchini M. The use of recombinant activated factor VII in platelet disorders: a critical review of the literature. *Blood Transfus.* 2009; 7(1): 24–8.
22. Locatelli F., Rossi G., Balduini C. Hematopoietic stem-cell transplantation for the Bernard-Soulier syndrome. *Ann. Intern. Med.* 2003; 138(1): 79.
23. Kanaji S., Kuether E., Fahs S., Schroeder J., Ware J., Montgomery R., Shi Q. Correction of murine Bernard-Soulier syndrome by lentivirus-mediated gene therapy. *Mol. Ther.* 2012; 20(3): 625–32. doi: 10.1038/mt.2011.231.
24. Bletter M.A., Dong X., Springer T.A. Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(9): 5565–79.
25. McEwan P.A., Yang W., Carr K.H., Mo X., Zheng X., Li R., et al. Quaternary organization of GPIb-IX complex and insights into Bernard-Soulier syndrome revealed by the structures of GPIIb/3 and a GPIIb/3/GPIX chimera. *Blood*. 2011; 118(19): 5292–301.

Поступила 12.10.16

Принята к печати 22.11.16

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Уважаемые авторы!

Журнал «Гематология и трансфузиология» публикует оригинальные научные работы, посвященные актуальным проблемам кроветворения в норме и при патологии.

В журнале есть разделы «Школа гематолога», «Школа трансфузиолога», «Обмен опытом», «Клинические наблюдения», «Информация», принимаются обзоры литературы.

При направлении статей в редакцию просим авторов соблюдать следующие правила:

1. Статья должна быть напечатана 12 шрифтом размером через 2 интервала, размеры верхнего и левого поля не менее 3 см.

Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице надо указать: название работы; инициалы и фамилии авторов; полное название учреждения, в котором выполнена работа; город.

3. Статья должна быть подписана всеми авторами, что дает право на ее публикацию и размещение на сайте издательства.

4. Рекомендуемый объем статей – 8–10 стр., описание отдельных наблюдений – 5 стр., обзоры литературы – 15 стр., список литературы не более 40 источников, информации и другие материалы – 3 стр.

5. Статья должна сопровождаться расширенным, отражающим содержание работы рефератом на русском языке объемом до 1000 знаков с 2 до 6 ключевыми словами или словосочетаниями, облегчающими классификацию работы в компьютерных поисковых системах.

6. Статья должна быть тщательно выверена и построена по традиционному для журнала плану с выделением следующих рубрик: «Материалы и методы», «Результаты», где представлены собственные данные и «Обсуждение», «Выводы» или «Заключение». Изложение статьи должно быть ясным, без длинных исторических введений.

7. В тексте статьи слева должны быть ссылки на каждый рисунок и таблицу.

8. Таблицы должны быть напечатаны на отдельном листе, иметь название, быть компактными, наглядными, не иметь сокращенных слов, заголовки граф должны точно соответствовать их содержанию. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте и быть обработаны статистически.

9. К статье должно быть приложено минимальное количество рисунков, необходимое для иллюстрирования текста. Графики и схемы не должны быть перегружены текстовыми надписями. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. В них приводятся название рисунка, объяснение значения всех условных обозначений, кривых, букв, цифр и др.

Фотографии, микрофотографии, графики, схемы и т.д. должны быть представлены в электронном виде в редакторах .jpg или .tif.

10. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, напечатанный на отдельном листе, оформленный следующим образом. Источники приводятся в порядке упоминания с указанием фамилии авторов с инициалами (6 соавторов и др.); названия книг, названия статей, журналов, места издания, года издания, тома, номера выпуска, страниц от и до. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на авторефераты диссертаций и на материалы конференций следует избегать, заменяя сопровождающими их публикациями в периодических изданиях.

Пример оформления источников литературы
(и русских авторов и зарубежных):

Статья из журнала:

Автор А.А., Автор Б.Б., Автор В.В., Автор Г.Г., Автор Д.Д., Автор Е.Е. и др. (англ.: et al.) Название статьи. Название журнала. Год; Том (номер): стр от и до.

Статья из книги:

Автор А.А., Автор Б.Б., Автор В.В., Автор Г.Г., Автор Д.Д., Автор Е.Е. и др. (англ.: et al.) Название статьи, главы. ФИО редактора. Название книги. Город издания: издательство; год: стр. от и до.

Ссылаться на неопубликованные работы нельзя. Библиографические ссылки в тексте следует давать в квадратных скобках цифрами в соответствии с пристатейным списком литературы.

11. К статье также должен быть приложен список литературы References (в романском алфавите для международных баз данных).

Пример оформления российских источников литературы:

Книга:

Savchenko V.G., ed. Programs of treatment of diseases of the blood system. Moscow: Practice; 2012. (in Russian)

Статья из журнала:

Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Karabudagova Z.K. The structure and function of platelets. Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiology). 2010; 55(5): 4–10. (in Russian)

12. Представление в редакцию статей, опубликованных в других изданиях или направленных для публикации в другие издания, не допускается.

13. Редакционная коллегия оставляет за собой право сокращения и редактирования материалов, представленных для публикации.

14. Статья должна быть представлена обязательно в электронном варианте, можно по электронной почте редакции.

15. Обязательно указание фамилии, имени, отчества, должности, учреждения, адреса с почтовым индексом и телефона автора, с которым редакция будет вести переписку, его электронный адрес.

16. Необходимо также на отдельной странице указать следующие сведения обо ВСЕХ авторах статьи (информация для РИНЦ):

Название статьи, всех авторов статьи, учреждения, а также фамилию, полное имя и отчество, место работы с указанием полного официального названия учреждения, полного названия отдела, отделения, лаборатории, должности, звания, рабочего и/или мобильного телефона автора, его почтового адреса (служебного) с указанием почтового индекса, электронного адреса.

Пример оформления:

Иванов И.И., Петров Н.Н.

Эссенциальная тромбоцитемия

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Для корреспонденции: Иванов Иван Иванович, канд. мед. наук, руководитель отделения химиотерапии ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва, Россия. E-mail: ivanov@blood.ru

Также к статье должен быть приложен список авторов с уточнением степени участия каждого из авторов в написании статьи.

Статьи следует направлять по адресу:

107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17а, стр. 1Б. ОАО «Издательство «Медицина»», редакция журнала «Гематология и трансфузиология». E-mail: RBelGT@yandex.ru.

С правилами можно также ознакомиться на сайте Издательства «Медицина» www.medlit.ru/journalsview/meditsina

**Институт последипломного профессионального образования
ФГБУ «Государственный научный центр федеральный медицинский
биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России**

открывает на кафедре «Анестезиология-реанимация и интенсивная терапия»

**ЦИКЛ ЛЕКЦИЙ И ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ
«ИНТЕНСИВНАЯ ТЕРАПИЯ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ
В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ»**

Интенсивная терапия больных с заболеваниями системы крови – новая область гематологии и реаниматологии. Ее рождение связано с успехами современной противоопухолевой химиотерапии, позволившей добиться излечения от многих опухолевых заболеваний, считавшихся ранее фатальными. Это повышение эффективности лечения во многом достигнуто благодаря усилению агрессивности химиотерапии, применению трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, что сопровождалось ростом числа угрожающих жизни осложнений, требующих проведения поддерживающей интенсивной терапии. Однако этиология, патогенез, клинические проявления, структура и методы лечения критических состояний у больных в условиях опухолевого роста, депрессии одного или нескольких ростков кроветворения, тяжелой иммуносупрессии отличаются от таковых у больных в общей популяции.

На цикле будет представлен современный подход к диагностике и лечению критических состояний у гематологических пациентов, а также у пациентов без заболевания системы крови, у которых течение болезни осложнилось развитием угрожающих жизни гематологических синдромов (нейтропенией, тромбоцитопенией, гемолизом, нарушениями свертывания крови, тромбофилией и др.).

Создание цикла представляется необходимым, поскольку согласно приказа Минздрава РФ от 15.11.2012 №930н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «гематология» в отделениях гематологии предусматривается создание блоков интенсивной терапии, в штаты которых входят врач анестезиолог-реаниматолог и врач-трансфузиолог. Однако обучение особенностям проведения интенсивной терапии у гематологических больных нигде в Российской Федерации не проводится.

Категории обучающихся – врачи-гематологи, реаниматологи, терапевты.

Режим занятий по 6 академических часов в день.

Срок обучения – 36 учебных часов.

Форма обучения – очная.

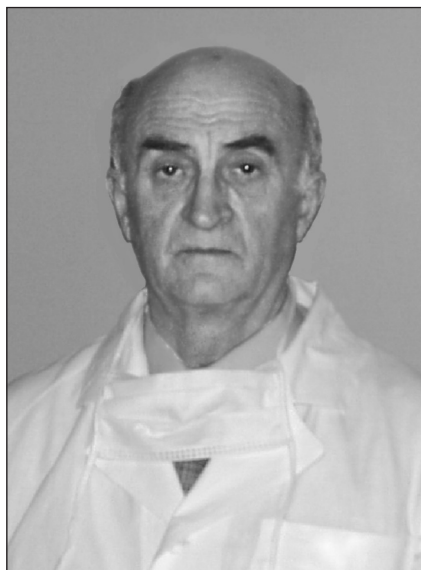
Занятия будут проводиться на базе отделения реанимации и интенсивной терапии
ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России и ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Информация на сайте <http://www.ippofmbc.com/ru/extrapage/1553.html>

Получить более подробную информацию о проведении цикла и записаться на него
Вы можете на странице кафедры анестезиологии-реанимации и интенсивной терапии,
по телефонам: +7-499-190-96-92 и +7-903-146-23-67

НЕКРОЛОГ

ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА ЕВГЕНЬЕВИЧА БАРАНОВА



29 июня 2016 года ушел из жизни Александр Евгеньевич Баранов – замечательный врач, клиницист широкого профиля и ученый, посвятивший всю свою жизнь развитию онкогематологии.

Александр Евгеньевич был непосредственным учеником И.А. Кассирского и сформировался как гематолог в его клинике. Все последующие годы его самостоятельной работы показали, что он являлся достойным преемником и продолжателем традиций этой лучшей гематологической школы в нашей стране.

Когда сталкиваешься с незаурядным врачом и диагностом, обладающим ярким клиническим мышлением, невольно, перефразируя великого классика нашей литературы, приходит в голову мысль – «все плохие врачи похожи друг на друга, каждый хороший врач хорош по-своему». Уникальность Александра Евгеньевича как специалиста основывалась на многих замечательных качествах. Будучи поистине практическим врачом, который умел и любил своими руками прекрасно выполнять многие врачебные манипуляции, он одновременно обладал широчайшим запасом знаний в естественнонаучной области в целом (биология, химия, биохимия и др.) и в сфере базовых медицинских дисциплин, таких как патологическая анатомия, патологическая физиология, фармакология. Умение эффективно применять эти знания и в нужный момент «достать с полки» информацию Александр Евгеньевич сохранял всю жизнь. В нем сочллись на первый взгляд антагонистические качества:

при невероятно развитой врачебной интуиции и чувстве опасности в сложной клинической ситуации он был смелым и решительным врачом, способным брать на себя всю меру ответственности, что крайне важно в онкологии. Важнейшая и замечательная черта Александра Евгеньевича как врача заключалась в неуклонном, подчас даже жертвенном стремлении сделать все возможное и невозможное для тяжелого пациента. Под его руководством всегда применялись все силы и знания, а также наиболее передовые и зачастую совершенно новые подходы в онкогематологии. При этом он никогда не менторствовал и не был, строго говоря, наставником, но все мы, его ученики невольно впитывали такое отношение к делу.

Можно без преувеличения сказать, что все эти особенности Александра Евгеньевича как специалиста позволили ему создать к середине 1970-х годов тогда на базе клиники Института биофизики Минздрава СССР едва ли не лучшее, по крайней мере самое передовое гематологическое отделение в стране. Одни лишь инновационные достижения этого отделения, когда оно являлось пионером применения новых методов лечения лейкозов в нашей стране и сейчас вызывают восхищение. Прежде всего, в области трансплантации костного мозга – это первое тотальное облучение человека, первая трансплантация сингенного костного мозга, первые трансплантации аллогенного и аутологичного костного мозга с высокодозной химиотерапией. Помимо этого, крайне высокой была планка и в повседневной, рутинной работе отделения. Уже в прошлом веке в программу лечения острого лейкоза был включен высокодозный цитозар, регулярно применяли высокодозную химиотерапию при миеломе, лимфомах и многое другое.

Несмотря на столь активную деятельность в области гематологии, Александр Евгеньевич разработал немало вопросов, связанных с совершенствованием диагностики и лечения лучевой болезни. Приоритетными и на сегодня являются его методы биодозиметрии по крови при острой лучевой болезни. В частности, его подходы успешно использовались при лечении пострадавших во время аварии на Чернобыльской АЭС.

В нашей памяти Александр Евгеньевич останется прежде всего как пионер трансплантации в отечественной гематологии. Как-то, выступая на конференции, он сказал: «Высшая награда врачу – вылечить больного от смертельного заболевания. Это вызов природе вещей. Трансплантация аллогенного костного мозга, безусловно, является таким вызовом». Вот так он и провел всю свою жизнь в борьбе за эту награду.

Светлая память о нем навсегда сохранится в сердцах родных, близких, друзей, учеников, коллег.