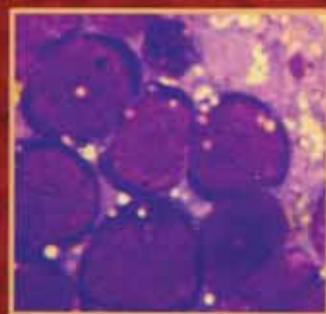
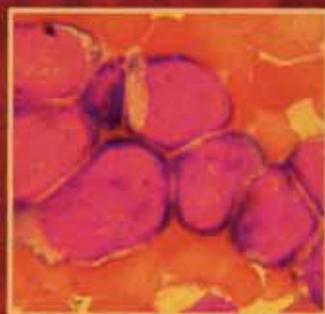


НИИ детской онкологии и гематологии

# ЛЕЙКОЗЫ у детей

Под редакцией  
Г. Л. Менткевича,  
С. А. Маяковой



практическая медицина

АВТОРЫ

# ЛЕЙКОЗЫ

## у детей

*под редакцией*

Г. Л. Менткевича,

С. А. Маяковой

**практическая медицина**

Москва ■ 2009

УДК 616-006.446-053.2  
ББК 57.33  
Л42

Л42 **Лейкозы у детей** / под. ред. Г. Л. Менткевича,  
С. А. Маяковой. — М.: Практическая медицина,  
2009. — 384 с.: ил.

ISBN 978-5-98811-118-4

Впервые в монографической отечественной литературе обобщены основные позиции современной диагностики (морфология, иммунофенотипирование, цитогенетика), классификации и лечения различных вариантов острых лимфоидных, миелоидных лейкозов и хронического миелолейкоза у детей. Показаны перспективы химиотерапии, трансплантации стволовых клеток крови, сопроводительного лечения для увеличения выживаемости больных.

Для педиатров, детских гематологов и онкологов.

УДК 616-006.446-053.2  
ББК 57.33

ISBN 978-5-98811-118-4

© Коллектив авторов, 2009  
© «практическая медицина», 2009

## Авторы

*Барышников А. Ю.* — д-р мед. наук, проф., зам. директора ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН по научной работе, директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

*Долгополов И. С.* — д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отделения трансплантации костного мозга НИИ детской онкологии и гематологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Матвеева И. И.* — д-р мед. наук, зав. лабораторией клинко-диагностической Централизованного клинко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Маякова С. А.* — д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Менткевич Г. Л.* — д-р мед. наук, проф., зам. директора НИИ детской онкологии и гематологии ГУ

РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН по научной работе, зав. отделением трансплантации костного мозга НИИ детской онкологии и гематологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Попа А. В.* — д-р мед. наук, зав. отделением химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Тупицын Н. Н.* — д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

*Флейшман Е. В.* — д-р мед. наук, проф., главн. науч. сотр. лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

## Содержание

Список сокращений.....	8
Глава 1. Лабораторная диагностика лейкозов у детей .....	10
<i>Матвеева И.И.</i>	
1.1. Острые лейкозы .....	16
1.2. Хронический миелолейкоз .....	39
Глава 2. Иммунодиагностика острого лейкоза .....	41
<i>Тупицын Н.Н.</i>	
2.1. Острые лимфобластные лейкозы .....	42
2.2. Острые миелоидные лейкозы .....	73
Глава 3. Хромосомный анализ в диагностике и прогнозировании лейкозов у детей .....	93
<i>Флейшман Е.В.</i>	

3.1. Цитогенетические термины .....	96
3.2. Методики .....	97
3.3. Изменения кариотипа и малигнизация (краткие сведения) .....	102
3.4. Острые лимфобластные лейкозы .....	108
3.5. Острые миелоидные лейкозы .....	129
3.6. Вторичные острые миелоидные лейкозы .....	158
3.7. Хронический миелолейкоз .....	159
3.8. Мониторинг минимальной остаточной болезни при лейкозах .....	175
3.9. Лейкозы с нормальным кариотипом .....	190

Глава 4. Апоптоз .....	195
<i>Барышников А. Ю.</i>	

Глава 5. Острые лимфобластные лейкозы .....	214
<i>Маякова С. А.</i>	

5.1. Патогенез .....	216
5.2. Диагностика .....	216
5.3. Клиника .....	224
5.4. Прогноз .....	229
5.5. Лечение .....	234

Глава 6. Острые миелоидные лейкозы .....	253
<i>Попа А. В.</i>	

6.1. Патогенез .....	254
6.2. Диагностика .....	258
6.3. Клиника .....	260
6.4. Прогноз .....	263
6.5. Лечение .....	265

Глава 7. Хронический миелолейкоз .....	289
<i>Маякова С. А.</i>	

7.1. Клиника .....	291
7.2. Прогноз .....	298
7.3. Лечение .....	299

Глава 8. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток .....	308
<i>Менткевич Г. Л.</i>	

8.1. Показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток .....	310
8.2. Высокодозная химиотерапия .....	310
8.3. Донорство гемопоэтических стволовых клеток .....	312
8.4. Профилактика реакции «трансплантат против хозяина» .....	318
8.5. Острые лимфобластные лейкозы .....	320
8.6. Острые миелоидные лейкозы .....	322
8.7. Хронический миелолейкоз .....	326
8.8. Частично-совместимые трансплантации гемопоэтических стволовых клеток .....	328
8.9. Посттрансплантационные осложнения .....	329

Глава 9. Сопроводительная терапия .....	341
<i>Долгополов И. С.</i>	

9.1. Инфекционные осложнения .....	342
9.2. Геморрагический синдром .....	368
9.3. Анемический синдром .....	372
9.4. Гиперлейкоцитоз .....	373
9.5. Синдром острого лизиса опухоли .....	374
9.6. Гиперкальциемия .....	376
9.7. Антиэметическая (противорвотная) терапия .....	376
9.8. Терапия болевого синдрома .....	377
9.9. Парентеральное питание .....	378

## Список сокращений

<b>БОЕ-Э</b>	— ранние эритроидные предшественники
<b>БРВ</b>	— безрецидивная выживаемость
<b>БСВ</b>	— бессобытийная выживаемость
<b>ВОЗ</b>	— Всемирная организация здравоохранения
<b>ГСК</b>	— гемопоэтические стволовые клетки
<b>ДВС-синдром</b>	— синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания
<b>ИЛ</b>	— интерлейкин
<b>КОЕ</b>	— колониеобразующие единицы
<b>КОЕ-ГМ</b>	— колониеобразующие единицы гранулоцито-, моноцитопоеза
<b>КОЕ-ГЭММ</b>	— колониеобразующие единицы гранулоцито-, эритро-, моноцито- и мегакариоцитопоеза
<b>КСФ</b>	— колониестимулирующий фактор
<b>КТ</b>	— компьютерная томография
<b>ЛДГ</b>	— лактатдегидрогеназа

## ЛЕЙКОЗЫ У ДЕТЕЙ

<b>МТТ</b>	— тетразолиевая соль: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>МРТ</b>	— магнитно-резонансная томография
<b>ОЛЛ</b>	— острый лимфобластный лейкоз
<b>ОМЛ</b>	— острый миелобластный лейкоз
<b>ОПЛ</b>	— острый промиелоцитарный лейкоз
<b>ПЦР</b>	— полимеразная цепная реакция
<b>СОД</b>	— суммарная очаговая доза
<b>ТГСК</b>	— трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
<b>ХМЛ</b>	— хронический миелолейкоз
<b>ЦМВ</b>	— цитомегаловирус(-ный)
<b>ЦНС</b>	— центральная нервная система
<b>ЩФ</b>	— щелочная фосфатаза
<b>FAV-классификация (French-American-British)</b>	— франко-американо-британская классификация
<b>FISH (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)</b>	— флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
<b>NK (natural killer)</b>	— естественные киллеры
<b>Ph (Philadelphia)</b>	— филадельфийская(-ий)
<b>TNF (tumor necrosis factor)</b>	— фактор некроза опухолей

## Глава 1

### Лабораторная диагностика лейкозов у детей

*Матвеева И. И.*

**С**овременная диагностика лейкозов у детей должна основываться на комплексной оценке, включающей, помимо клинических данных, морфологические, цитохимические, иммунологические, цитогенетические параметры бластных клеток.

**Периферическая кровь.** Изменения в анализе периферической крови при острых лейкозах зависят от массы опухоли. Может наблюдаться угнетение как всех ростков кроветворения, так и каждого по отдельности или в сочетании.

Количество лейкоцитов при первичном обследовании может быть различным, чаще — нормальное или несколько сниженное. Лейкоцитоз наблюдается в 25–30% случаев. Бластные клетки могут отсутствовать, определяться в небольшом количестве или составлять значительную часть клеточного состава (до 95–98%).

Изучение красной крови демонстрирует анемию, носящую нормохромный характер. Наиболее резкое снижение количества эритроцитов, показателей гемоглобина выявляется при эритромиелозе (FAB М6-вариант острого лейкоза) (франко-американо-британская классификация — French-American-British, FAB). При этом отмечается увеличение объема эритроцитов (MCV) и в мазках крови — наличие нормобластов.

Количество тромбоцитов различное: нормальное, повышенное или пониженное. Например, при промиелоцитарном варианте острого лейкоза (FAB М3) наблюдаются наиболее низкие показатели количества тромбоцитов.

При хроническом миелолейкозе (ХМЛ) в периферической крови отмечается нарастающий лейкоцитоз, увеличивается (до 80–95%) количество незрелых форм гранулоцитов — миелоцитов, метамиелоцитов, содержание эозинофилов и/или базофилов (эозинофильно-базофильная ассоциация). Количество бластных клеток колеблется от 3 до 10%. Клетки гранулоцитарного ростка имеют атипичные морфологические признаки: анизоцитоз, полиморфизм. Может отмечаться уменьшение или полное отсутствие азурофильной зернистости, а также появление грубой зернистости. В лейкозных гранулоцитах может наблюдаться диссоциация созревания ядра и цитоплазмы, дегенеративные изменения в клетках. Количество тромбоцитов в большинстве случаев нормальное, но у части больных выявляется тромбоцитоз [1–3, 7].

Окончательная идентификация лейкоза требует исследования пунктатов костного мозга.

**Костный мозг.** Изучение пунктата костного мозга необходимо даже в тех случаях, когда диагноз лейкоза не вызывает сомнения уже при исследовании периферической крови. Пункцию костного мозга производят из подвздошных костей и грудины. У детей в возрасте до 1 года костномозговой пунктат можно получить из пяточной кости.

Подсчет количества миелокариоцитов в пункте костного мозга дает возможность определить степень его клеточности (богат, умеренно клеточный, беден и пр.).

При исследовании мазков костного мозга при остром лейкозе чаще всего обнаруживается мноморфная картина — тотальная метаплазия бластными клетками. В отдельных случаях количество бластных клеток может быть меньше. По рекомендации FAB-классификации (1976) диагноз острого лейкоза может быть установлен при наличии в костном мозге более 30% бластных клеток. В соответствии с FAB-классификацией выделение различных вариантов острого лейкоза основывается на размерах бластных клеток, форме ядер, структуре ядерного хроматина, наличии нуклеол, ядерно-цитоплазматическом соотношении, базофилии цитоплазмы, наличии зернистости в цитоплазме. В настоящее время в соответствии с классификацией опухолей гемопoэтической и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (2008) диагноз острого лейкоза устанавливается при наличии в костном мозге бластных клеток в количестве более 20%. При меньшем количестве бластных клеток необходимо определить процентное содержание эритрокариоцитов. Это позволит провести дифференциальную диагностику между FAB M6-вариантом острого миелоидного лейкоза и миелодиспластическим синдромом, а именно: содержание более 50% эритрокариоцитов и 30% бластных клеток среди незитроидных элементов костного мозга подтверждает FAB M6-вариант острого лейкоза [9, 11, 12].

При ХМЛ костный мозг гиперклеточный, снижено количество клеток эритронормобластического ростка. Количество бластных клеток в хронической фазе — до 5%. Увеличено количество базофилов и/или эозинофилов. При развитии бластного криза отмечается нарастание количества бластных клеток в костном мозге и периферической крови. Клеточная

дифференцировка при бластном кризе нарушается (различные морфологические варианты).

**Спинномозговая жидкость.** Исследование спинномозговой жидкости проводится с целью раннего выявления нейрорлейкоза. Обнаружение более 5 клеток в 1 мкл жидкости предполагает приготовление цитологических препаратов (желательно на цитоцентрифуге «Цитоспин»), что позволяет получить препараты с большим количеством клеточных элементов. После специальной окраски проводится просмотр цитологических препаратов с целью идентификации клеточного состава. Для идентификации бластных клеток используются цитохимические и иммуноморфологические методы.

**Цитохимическое исследование.** Важным этапом является определение варианта острого лейкоза, необходимое для выбора адекватной программы специального лечения. С этой целью используются цитохимические методы исследования бластных клеток, которые позволяют уточнить направленность их дифференцировки. Объектом цитохимического исследования служат бластные клетки костного мозга, периферической крови и спинномозговой жидкости. Проводится панель цитохимических реакций, включающая изучение активности миелопероксидазы, неспецифической эстеразы, наличия ШИК-положительного вещества (PAS-реакция), определение липидов в бластных клетках. Также изучается активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в нейтрофильных лейкоцитах в процессе диагностики ХМЛ [4, 5, 13].

#### Миелопероксидаза

Это фермент, локализующийся в специфической азурофильной зернистости в цитоплазме клеток гранулоцитарного ростка, в связи с чем он (фермент) является специфическим маркером миелоидных клеток. Активность фермента нарастает в процессе созревания клеток.

**Принцип реакции:** пероксидаза, являясь ферментом — лизосомальной каталазой, катализирует окисление бензидина, образуются интенсивно окрашенные соединения.

**Оценка реакции:** при острых миелобластных лейкозах (ОМЛ) активность фермента положительная, варьирует от небольшой и умеренной до выраженной; при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) — отрицательная.

#### Неспецифическая эстераза

Эстеразы — ферменты (гидролазы), которые расщепляют простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот и локализуются в лизосомах.

**Принцип реакции:** альфа-нафтилацетатэстераза ускоряет гидролизное расщепление альфа-нафтилацетатэстеразы до уксусной кислоты и альфа-нафтола, который, соединяясь с диазониевой солью, образует коричнево-черное окрашивание, нерастворимое в воде.

**Оценка реакции:** активность фермента проявляется в виде черно-коричневого окрашивания цитоплазмы. Реакция используется с целью дифференциальной диагностики ОМЛ, поскольку в лимфобластах активность фермента, как правило, отрицательная. При FAB M0 активность фермента в бластных клетках не определяется. При FAB M1, FAB M2 активность неспецифической эстеразы слабая, не ингибируемая фторидом натрия. При FAB M3 выявляется высокая активность неспецифической эстеразы, не ингибируемой фторидом натрия. При FAB M4 положительная неспецифическая эстераза, ингибируемая фторидом натрия, определяется в бластных клетках моноцитоидного типа. Высокая активность фермента, ингибируемая фторидом натрия, является специфическим признаком монобластных лейкозов (FAB M5a и FAB M5b). При остром эритромиелозе в эритробластах активность фермента не выявляется, в миелобластах — положительная и не ингибируется

фторидом натрия. При FAB M7 может быть положительная реакция.

#### ШИК (PAS)-реакция по методу McManus

Гликоген, являясь мукополисахаридом, определяется во всех клетках гранулоцитарного ростка, в моноцитоидных клетках, в тромбоцитах, в лимфоидных клетках. Характер распределения различный: в миелоидных и моноцитоидных клетках ШИК-позитивное вещество располагается в цитоплазме клеток диффузно, в клетках лимфоцитарного ряда — в виде гранул.

**Принцип реакции:** механизм ШИК-реакции основан на окислении йодной кислотой гликолевых групп либо их амино- или алкиламинопроизводных до альдегидов, которые при взаимодействии реактивом Шиффа образуют продукт красного цвета.

**Оценка реакции:** ШИК-позитивное вещество красного цвета располагается в цитоплазме клеток диффузно, в виде гранул, глыбок. Для миелобластов характерна диффузная реакция. В лимфобластах — в виде гранул различных размеров, вплоть до глыбок на бесцветном фоне. В монобластах реакция отрицательная или мелкодисперсная на диффузном фоне.

#### Липиды

Локализуются в цитоплазме клеток. При цитохимическом исследовании выявляются свободные фосфолипиды, которые не связаны с белками или другими комплексами. Позитивная реакция выявляется в виде гранул в клетках гранулоцитарного ростка, начиная с миелобласта. Единичные гранулы могут наблюдаться в моноцитоидных клетках.

**Принцип реакции:** при применении липофильных красителей, которые растворяются во внутриклеточных липидах, выявляются фосфолипиды.

**Оценка реакции:** суданофильные гранулы выявляются в клетках гранулоцитарного ростка в виде черных гранул в бластных клетках гранулоцитарного ге-

неза. В лимфобластах цитохимическая реакция на липиды, как правило, отрицательная.

### Щелочная фосфатаза

Активность ЩФ присуща преимущественно нейтрофильным лейкоцитам и используется для дифференциальной диагностики ХМЛ и лейкомоидных реакций.

*Принцип реакции:* используется метод азосочетания — расщепление ЩФ альфа-нафтилфосфата с освобождением альфа-нафтола, образующего с солями диазония окрашенный в черный цвет осадок в местах локализации фермента.

*Оценка результата:* активность ЩФ выявляется в виде серо-черных гранул в цитоплазме клеток нейтрофильного ряда. Подсчет проводят в 100 сегментоядерных нейтрофилах с учетом интенсивности окрашивания (0 — отсутствие окрашивания, 1 — гомотенное слабое окрашивание, 2 — более интенсивное гранулярное окрашивание, 3 — выраженное окрашивание с просматриваемыми ядрами, 4 — полное окрашивание, ядра не просматриваются). Затем проводится подсчет среднего цитохимического коэффициента (СЦК):

$$\text{СЦК} = (\% \text{кл}1 \times 1 + \% \text{кл}2 \times 2 + \% \text{кл}3 \times 3 + \% \text{кл}4 \times 4) : 100.$$

В норме СЦК = 0,6+0,7. При ХМЛ СЦК значительно снижен или равен 0, в то время как при лейкомоидных реакциях, связанных с реактивными процессами, СЦК повышается, иногда значительно.

## 11. Острые лейкозы

Острый лейкоз — диагноз, требующий четкой морфологической верификации и устанавливаемый при нахождении в костном мозге бластных клеток. Основанием для диагностики данного за-

болевания служит определение доминирующей популяции бластных клеток костного мозга и периферической крови. В некоторых случаях необходимо проведение трепанобиопсии с последующим гистологическим исследованием полученного материала.

### 1.1.1. Острые лимфобластные лейкозы

Наиболее часто встречается у детей. В соответствии с FAB-классификацией выделяют три морфологических варианта: L1, L2, L3 (табл. 1.1, рис. 1.1–1.3).

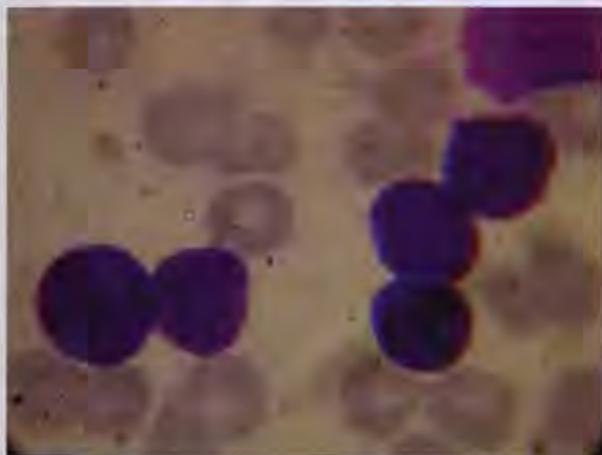


Рис. 1.1. Острый лимфобластный лейкоз, FAB L1. Бластные клетки небольших размеров, с узкой цитоплазмой,  $\times 1000$

В практической работе выделяются подварианты ОЛЛ: L1/L2 и L2/L1. Для уточнения указанных подвариантов подсчитывают 100 бластных клеток. Если количество микроформ варьирует от 75 до 90%, то диагностируется L1/L2 вариант. Если количество микроформ 50–75%, то диагностируется L2/L1-вариант (табл. 1.2).

Таблица 1.1

## Цитологические признаки вариантов ОЛЛ по FAB-классификации (1976)

Цитологические признаки	FAB L1	FAB L2	FAB L3
Размеры бластных клеток	Небольшие	Средние или крупные	Крупные, мономорфные
Форма ядер	Округлая	Различная: округлая, неправильная, с расщеплением	Округлая или овальная
Структура ядерного хроматина	Различная, чаще гомогенная, нежно-петлистая	Различный: от нежно-петлистого до грубого комковатого	Плотная, диффузная
Нуклеолы	Не определяются или единичные	Одна или несколько мелких	Одна или несколько
Количество цитоплазмы	Небольшое	Различное: от небольшого до умеренного	Умеренное
Ядерно-цитоплазматическое отношение	Высокое	Обычно среднее	Умеренное
Базофилия цитоплазмы	Не выражена	Различная, иногда выраженная	Выражена
Вакуолизация цитоплазмы	Чаше отсутствует	Различная	Выражена

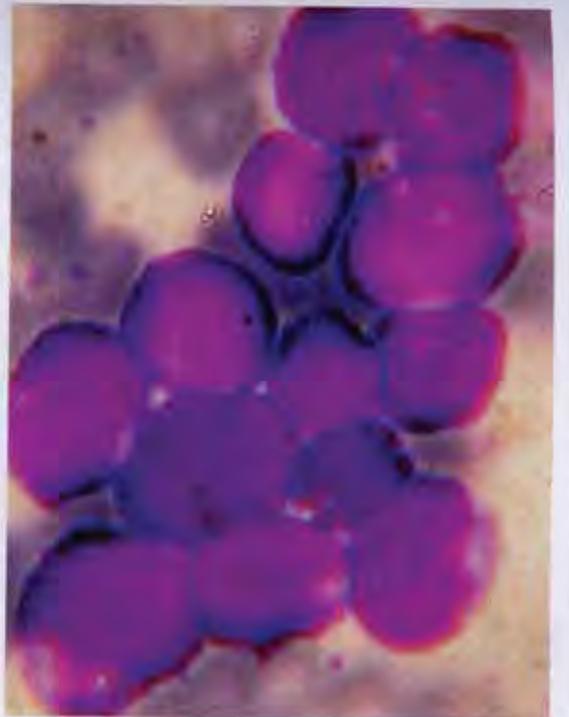


Рис. 1.2. Острый лимфобластный лейкоз, FAB L2. Бластные клетки имеют различные размеры, умеренное ядерно-цитоплазматическое отношение,  $\times 1000$

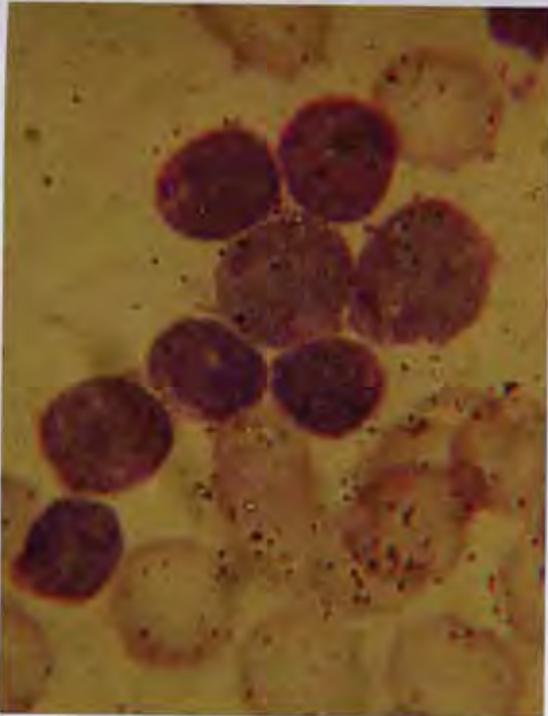


Рис. 1.3. Острый лимфобластный лейкоз, FAB L3. Бластные клетки с выраженными базофилией и вакуолизацией цитоплазмы,  $\times 1000$

Таблица 1.2

Критерии диагностики подвариантов ОЛЛ

Количество бластных клеток	L1	L1/L2	L2/L1	L2
Микрогенерации	Более 90%	75–90%	Менее 25%	До 50%
Мезогенерации	Менее 10%	Менее 25%	50–75%	Более 50%

Цитохимические особенности бластных клеток при ОЛЛ

Несмотря на то, что PAS-реакция не является специфичной для лимфобластов, более чем в 60% случаев ОЛЛ удается выявить наличие конечного продукта ШИК-реакции в виде гранул или глыбок (рис. 1.4). Миелопероксидаза и липиды, как высокоспецифичные маркеры миелоидной дифференцировки бластных клеток, в лимфобластах не определяются. В некоторых случаях ОЛЛ при исследовании неспецифической эстеразы в лимфобластах выявляется положительная реакция, которая не ингибируется фторидом натрия, однако это не имеет диагностического значения.

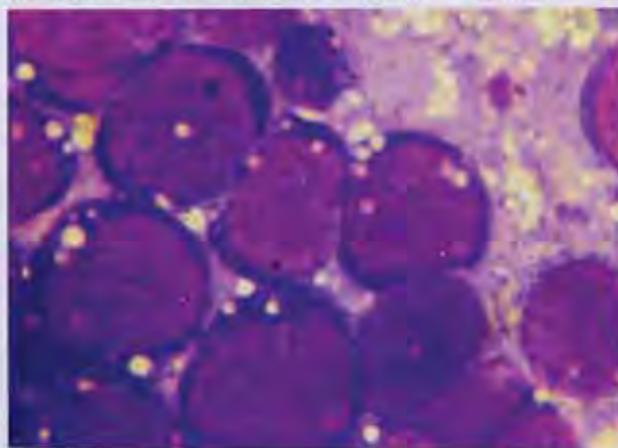


Рис. 1.4. Острый лимфобластный лейкоз, FAB L2. ШИК-положительное вещество в виде гранул,  $\times 1000$

При отсутствии положительных результатов всех цитохимических реакций проводится дифференциальная диагностика с ОМЛ, имеющим минимальную клеточную дифференцировку (FAB M0), с помощью иммунофенотипирования бластных клеток.

1.1.2. Острые миелоидные лейкозы

Составляют 15–18% случаев острого лейкоза у детей. В соответствии с FAB-классификацией выделяют несколько морфологических вариантов ОМЛ, для каждого из которых характерны свои, в значительной мере отличающиеся особенности.

**FAB M0 (минимально дифференцированный ОМЛ).** Бластные клетки средних размеров с округлым ядром, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, отсутствием зернистости и палочек Ауэра в цитоплазме клеток (рис. 1.5).

Положительная активность миелопероксидазы и липидов менее чем в 3% бластных клеток. Низкое количество неспецифической эстеразы в единичных клетках. ШИК-положительное вещество располагается в цитоплазме диффузно (рис. 1.6, 1.7).

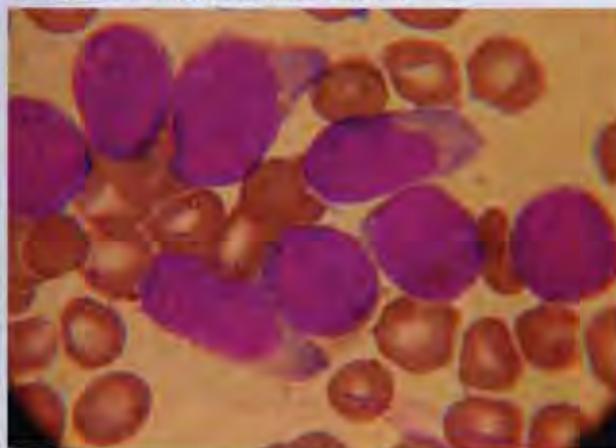


Рис. 1.5. Минимально дифференцированный острый миелоидный лейкоз, FAB M0,  $\times 1000$

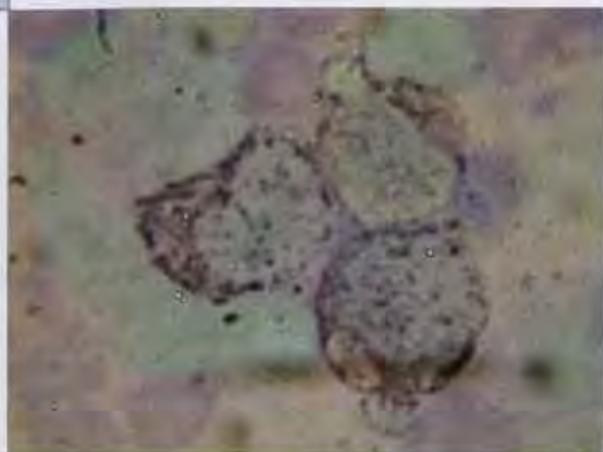


Рис. 1.6. Минимально дифференцированный острый миелобластный лейкоз, FAB M0. Липиды в бластных клетках,  $\times 1000$



Рис. 1.7. Минимально дифференцированный острый миелобластный лейкоз, FAB M0. Peroксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$

Дифференциальная диагностика ОМЛ-M0 проводится с ОЛЛ. Ведущее значение имеет иммунофенотипирование бластных клеток.

**FAB M1 (ОМЛ без созревания).** Менее 90% незрелых клеток представлены бластными клетками. Преобладают бластные клетки мезогенераций с округлыми ядрами и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. В некоторых случаях единичные бластные клетки могут содержать зернистость (рис. 1.8). Зрелые моноциты составляют 10% и меньше всех клеток незрелого ряда. Зрелые гранулоциты — также в количестве 10% и менее всех незрелых клеток.

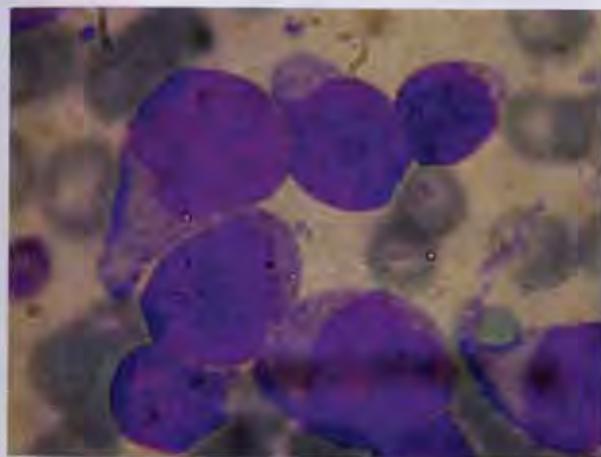


Рис. 1.8. Острый миелобластный лейкоз без созревания, FAB M1,  $\times 1000$

Положительная активность миелопероксидазы и липидов более чем в 3% бластных клеток. В единичных бластных клетках выявляется в небольшом количестве неспецифическая эстераза. ШИК-положительное вещество диффузно располагается в цитоплазме бластных клеток.

**FAB M2 (ОМЛ с созреванием).** 20–90% составляют бластные клетки из всех незэритроидных клеток. Бластные клетки средних размеров, с высоким и умеренным ядерно-цитоплазматическим отношением. Ядра круглой, иногда неправильной формы. Наиболее важным морфологическим признаком бластных клеток этого типа является наличие отчетливой азурофильной зернистости в цитоплазме и палочки Ауэра (рис. 1.9).

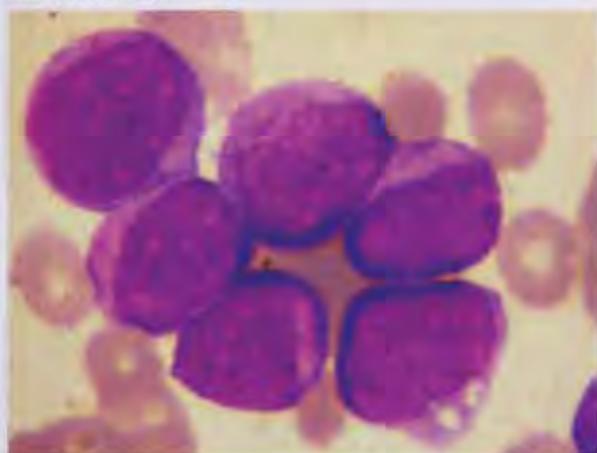


Рис. 1.9. Острый миелобластный лейкоз с созреванием, FAB M2. Палочки Ауэра в бластных клетках,  $\times 1000$

Зрелые гранулоциты — более 10% и зрелые моноциты — менее 10% всех незэритроидных клеток.

Положительная активность миелопероксидазы и липидов выявляется в большинстве бластных клеток (рис. 1.10, 1.11). Неспецифическая эстераза в небольшом количестве, не ингибируется фторидом натрия. ШИК-положительное вещество в диффузной форме.

Дифференциальная диагностика проводится между вариантами ОМЛ-М1 и ОМЛ-М2. По рекомендации FAB-группы наличие в костном мозге 10% и

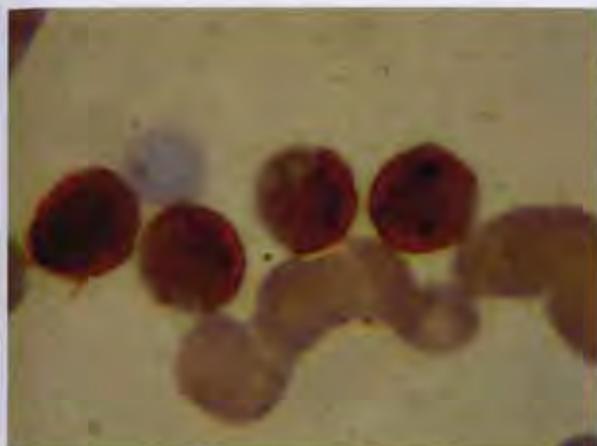


Рис. 1.10. Острый миелобластный лейкоз с созреванием, FAB M2. Миелопероксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$

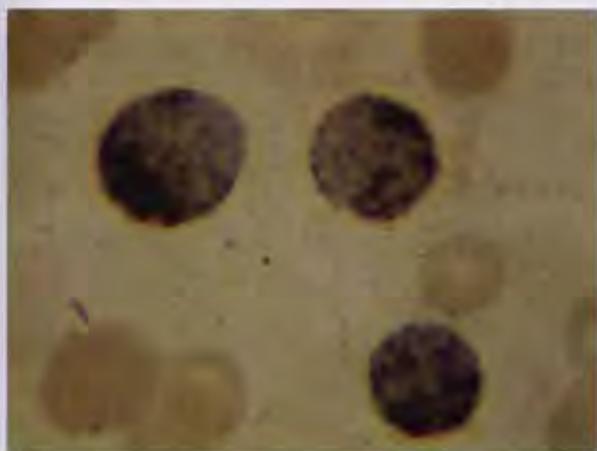


Рис. 1.11. Острый миелобластный лейкоз с созреванием, FAB M2. Липиды в бластных клетках,  $\times 1000$

более созревающих гранулоцитов позволяет отнести бластные клетки к типу ОМЛ-М2. Важное значение имеет также цитогенетическое исследование.

**FAV M2баз (ОМЛ базофильно-клеточный).** Встречается крайне редко (по литературным данным, составляет до 0,5% случаев острых нелимфобластных лейкозов). Характерной особенностью бластных клеток является наличие выраженной грубой базофильной зернистости. При цитохимическом исследовании клетки не содержат миелопероксидазы, липидов, эстеразы.

**FAV M3 (ОМЛ промиелоцитарный) и атипичный вариант FAV M3v (гипогранулярный).** Бластные клетки крупных размеров, часто с неправильной формой ядра. Ядра могут иметь двудольчатое строение. Отмечаются крупная зернистость и палочки Ауэра в цитоплазме, которые могут быть как единичными, так и в большом количестве, располагаясь в виде «вязанок хвоста» и пучков (рис. 1.12 и 1.13). При атипичном варианте M3v зернистость при световой микроскопии не выявляется или же выявляется в незначительном количестве.

Значительно выраженная активность миелопероксидазы и липидов характерна для этого варианта ОМЛ. Бластные клетки содержат неспецифическую эстеразу, которая не ингибируется фторидом натрия. ШИК-положительное вещество в диффузной форме (рис. 1.14–1.16).

Дифференциальный диагноз проводится с ОМЛ-М2, когда обнаруживаются бластные клетки двух типов — М2 и М3. Решающую роль играет цитогенетическое исследование. При гипогранулярном варианте ОМЛ-М3 проводится дифференциальная диагностика с ОМЛ-М5b. Цитохимическое исследование неспецифической эстеразы позволяет разрешить сомнения. При ОМЛ-М5b высокая активность, подавляемая фторидом натрия, при ОМЛ-М3v активность фермента менее выражена и не подавляется фторидом натрия.

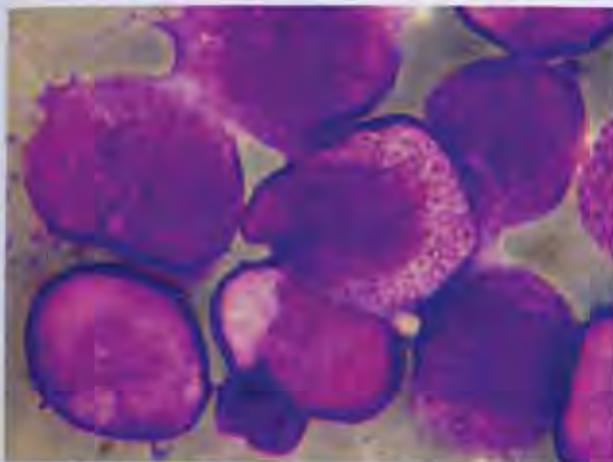


Рис. 1.12. Острый промиелоцитарный лейкоз, FAV M3. Выраженная зернистость в бластных клетках,  $\times 1000$



Рис. 1.13. Острый промиелоцитарный лейкоз, FAV M3,  $\times 1000$

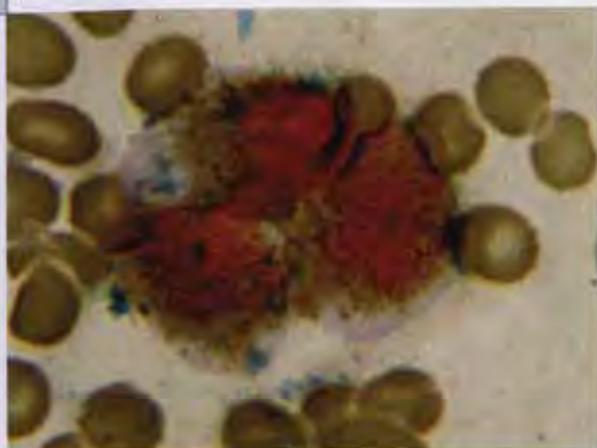


Рис. 1.14. Острый промиелоцитарный лейкоз, FAB M3. Миелопероксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$ .

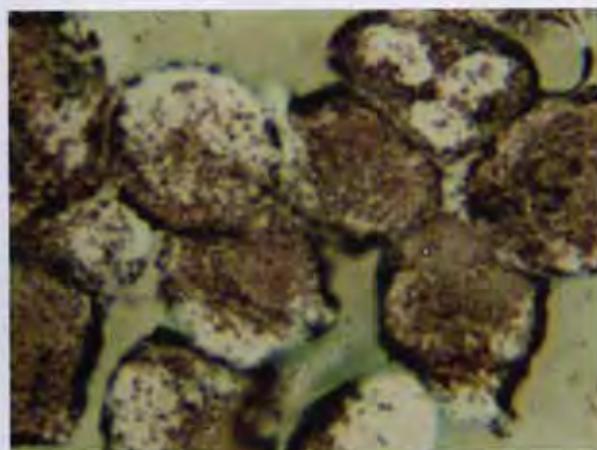


Рис. 1.15. Острый промиелоцитарный лейкоз, FAB M3. Липиды в бластных клетках,  $\times 1000$ .

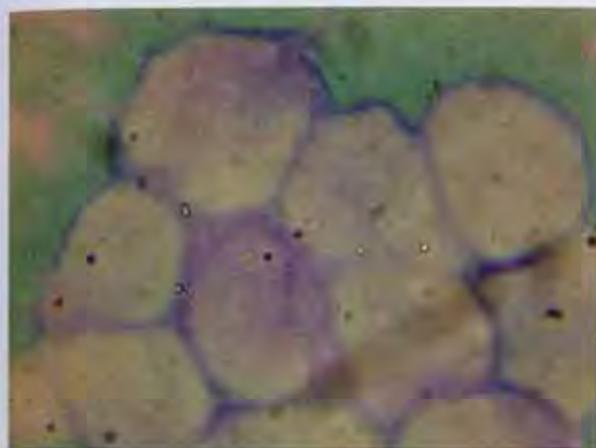


Рис. 1.16. Острый промиелоцитарный лейкоз, FAB M3. ШИК-положительное вещество в бластных клетках, диффузное расположение,  $\times 1000$ .

**FAB M4 (ОМЛ миеломонобластный).** Бластные клетки с ядрами округлой и неправильной формы, низким и умеренным ядерно-цитоплазматическим отношением. Часть бластных клеток содержат зернистость, в единичных клетках могут встречаться палочки Ауэра (рис. 1.17–1.20).

Зрелые гранулоциты составляют более 20% всех незритроидных клеток. Моноцитарный компонент — более 20%.

В бластных клетках выявляются одновременно миелопероксидаза, липиды, неспецифическая эстераза, подавляемая фторидом натрия (рис. 1.21–1.24).

**FAB M5a (ОМЛ монобластный без созревания).** 80% и более моноцитоподобных клеток — монобласты. Бластные клетки преимущественно крупных размеров, но встречаются клетки мезогенераций. Ядра бобовидной или допастной формы. Ядерно-цитоплазматическое отношение различное. Цито-

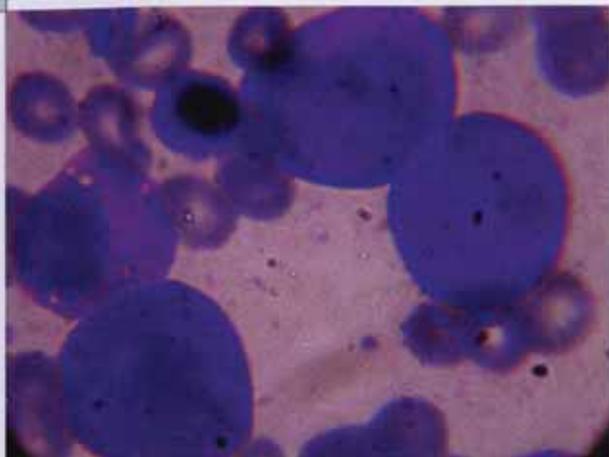


Рис. 1.17. Острый миеломоноцитарный лейкоз, FAB M4,  $\times 1000$

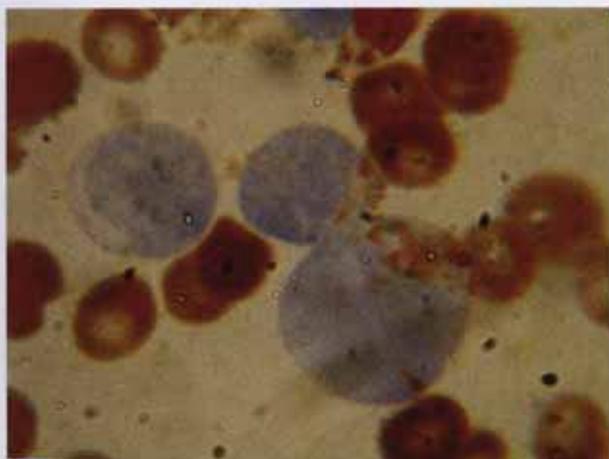


Рис. 1.18. Острый миеломоноцитарный лейкоз с эозинофилией,  $\times 1000$

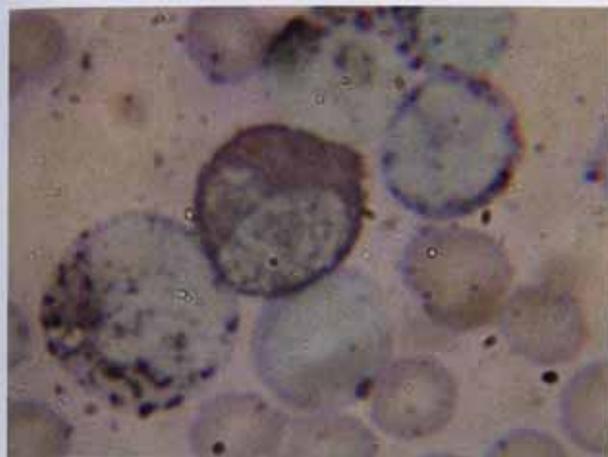


Рис. 1.19. Острый миеломоноцитарный лейкоз с эозинофилией,  $\times 1000$

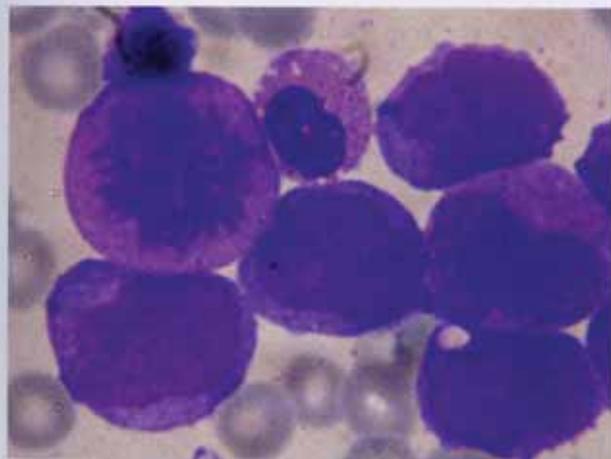


Рис. 1.20. Острый миеломоноцитарный лейкоз с эозинофилией,  $\times 1000$

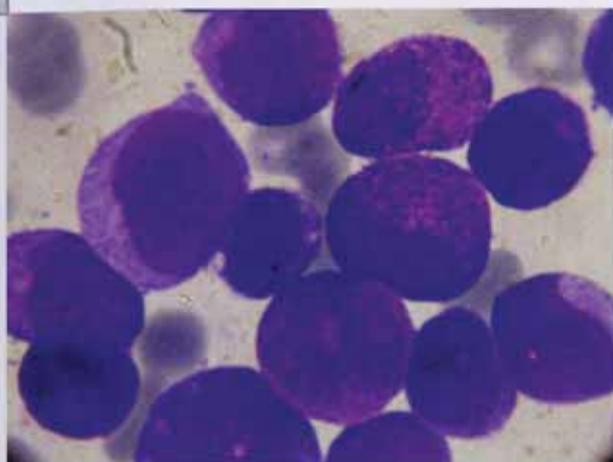


Рис. 1.21. Острый миеломоноцитарный лейкоз, FAB M4. Миело-пероксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$

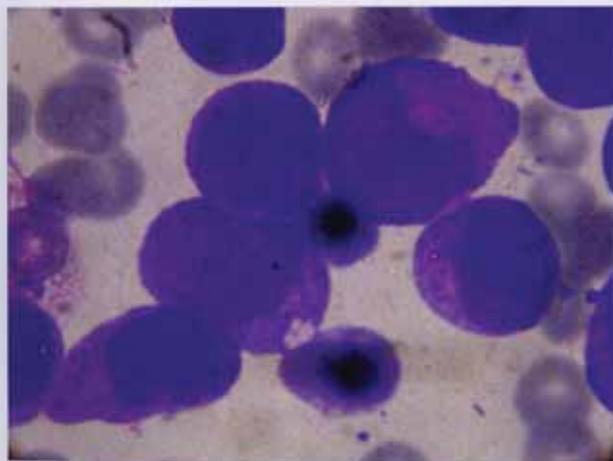


Рис. 1.22. Острый миеломоноцитарный лейкоз, FAB M4. Липи-ды в бластных клетках,  $\times 1000$

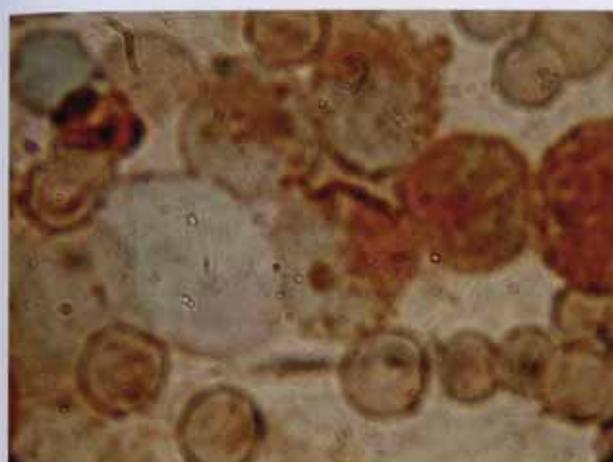


Рис. 1.23. Острый миеломоноцитарный лейкоз с эозинофилией. Миело-пероксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$

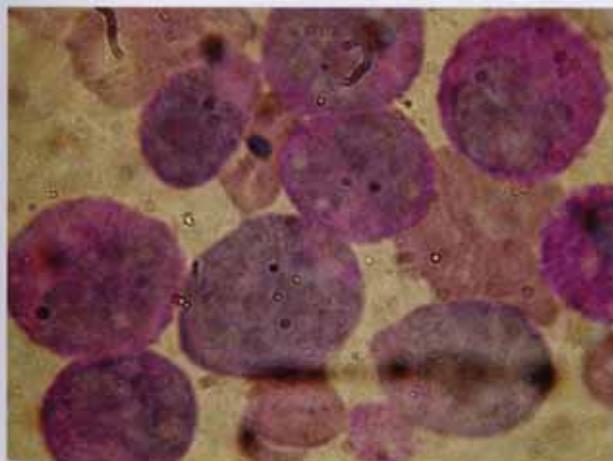


Рис. 1.24. Острый миеломоноцитарный лейкоз с эозинофилией. ШИК-позитивное вещество в бластных клетках

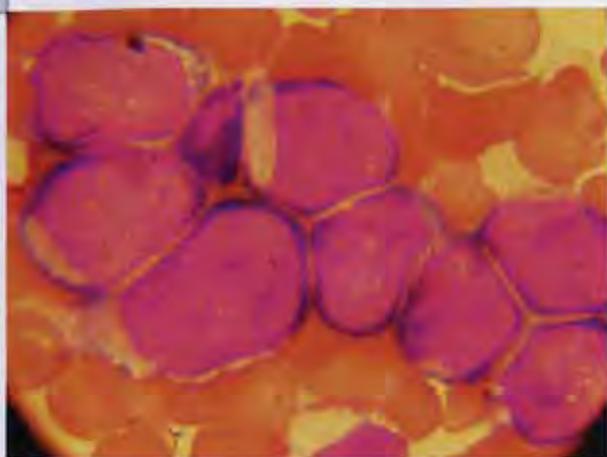


Рис. 1.25. Острый монобластный лейкоз без созревания, FAB M5a,  $\times 1000$

плазма серо-голубого цвета, но может быть и более базофильной. В части бластных клеток просматривается зернистость. Палочки Ауэра не выявляются (рис. 1.25).

В бластных клетках содержится значительное количество неспецифической эстеразы, которая подавляется фторидом натрия; может быть небольшое количество миелопероксидазы и липидов в единичных бластных клетках (рис. 1.26 и 1.27).

Дифференциальный диагноз проводится с ОМЛ-M0 с помощью цитохимически выявляемой реакции на неспецифическую эстеразу. Подавление положительной реакции фторидом натрия позволяет сделать выбор в пользу ОМЛ-M5.

**FAB M5b (ОМЛ монобластный с созреванием).** Менее 80% моноцитонидных клеток — монобласты. Бластные клетки крупных размеров с моноцитонидной формой ядер, обильной сероватой цитоплазмой без зернистости. Палочки Ауэра не выявляются.



Рис. 1.26. Острый монобластный лейкоз без созревания, FAB M5a. Неспецифическая эстераза в бластных клетках,  $\times 1000$



Рис. 1.27. Острый монобластный лейкоз без созревания, FAB M5a. Миелопероксидаза в бластных клетках,  $\times 1000$

Бластные клетки содержат значительное количество неспецифической эстеразы, которая подавляется фторидом натрия, в единичных бластах незначительное количество миелопероксидазы и липидов.

**FAB M6 (ОМЛ, эритромиелоз; ОМЛ, эритробластный лейкоз).** При эритромиелозе в костном мозге более 50% составляют эритробласты. Среди неэритроидных клеток более 30% составляют бластные клетки. Следует отметить наличие признаков дисплазии в клетках эритроидного ростка, проявляющихся в полиморфизме клеток, появлении крупных клеток (мегалобластов), многоядерных клеток. При эритробластном лейкозе в костном мозге преобладают бластные клетки. Как при эритромиелозе, так и при эритробластном лейкозе бластные клетки не имеют специфических морфоцитохимических признаков, напоминают таковые при ОМЛ-M1 (рис. 1.28–1.30).

Диагноз основывается на иммунофенотипировании и цитогенетическом исследовании бластных клеток.

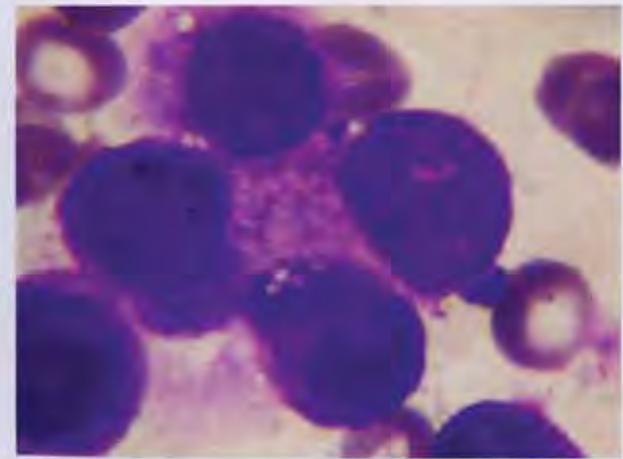


Рис. 1.28. Острый миелобластный лейкоз, эритромиелоз, FAB M6, ×1000

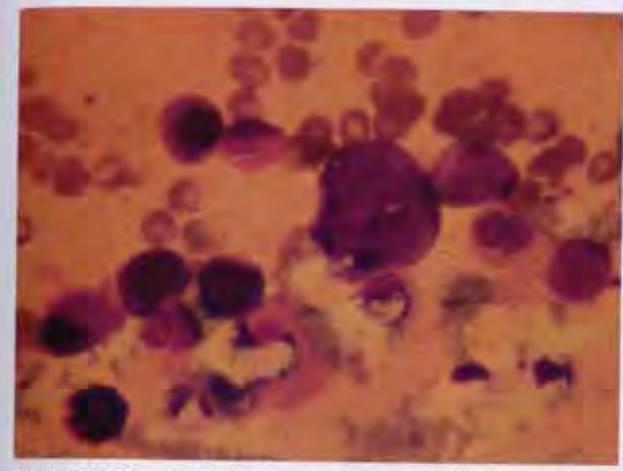


Рис. 1.29. Острый миелобластный лейкоз, эритромиелоз, FAB M6, ×400

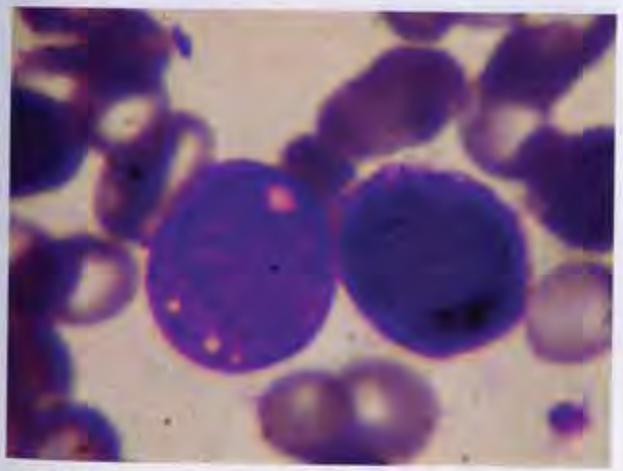


Рис. 1.30. Острый миелобластный лейкоз, эритромиелоз, FAB M6, ×1000

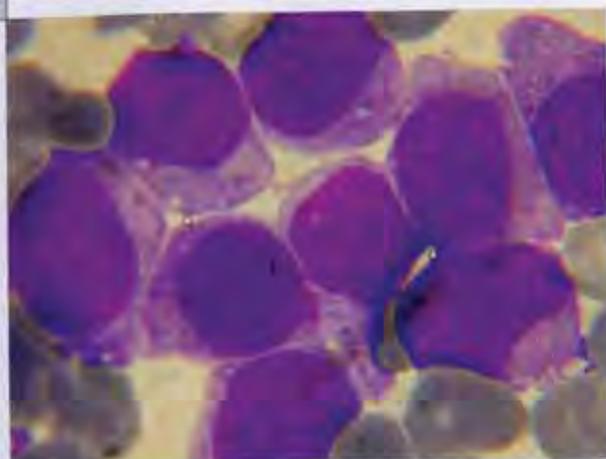


Рис. 1.31. Острый мегакариобластный лейкоз, FAB M7,  $\times 1000$

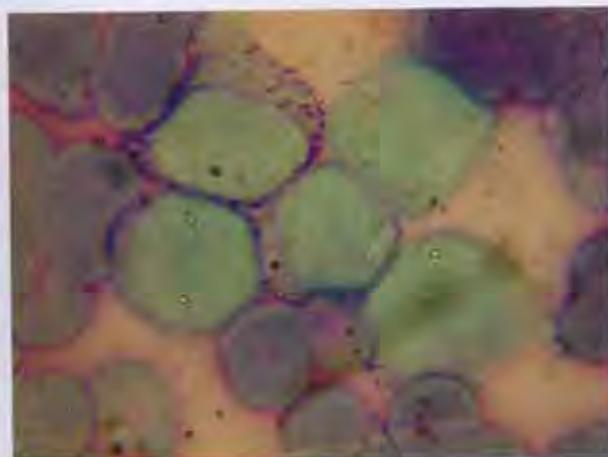


Рис. 1.32. Острый мегакариобластный лейкоз, FAB M7. ШИК-положительное вещество в бластных клетках,  $\times 1000$

**FAB M7 (ОМЛ мегакариобластный).** Очень редкая форма ОМЛ. Бластные клетки полиморфны с отросчатой базофильной цитоплазмой (рис. 1.31 и 1.32). Специфические морфоцитохимические признаки отсутствуют. При исследовании костного мозга бластные клетки часто расцениваются как лимфобласты типа L2.

Окончательный диагноз основывается на данных иммунофенотипирования и цитогенетического исследования бластных клеток [1, 3, 7, 8, 10, 11].

## 1.2. Хронический миелолейкоз

В течении ХМЛ выделяют три клинических стадии: хроническую; продвинутую (стадию акселерации); острую (терминальную). Изменения в периферической крови и костном мозге в различных стадиях ХМЛ имеют свои особенности.

**Хроническая стадия.** В начале заболевания в периферической крови отмечается лейкоцитоз со сдвигом формулы до миелоцитов. Увеличено количество эозинофилов и/или базофилов. Иногда могут обнаруживаться бластные клетки. Выраженные изменения со стороны красной крови, как правило, не наблюдаются. Увеличение количества лейкоцитов может быть расценено как показатель воспалительного процесса. Количество тромбоцитов — повышено.

В костном мозге большое число миелокариоцитов. Количество бластных клеток — до 5%. В этом случае проводится дифференциальная диагностика с лейкомоидными реакциями нейтрофильного типа. Отсутствие в клинике воспалительного процесса свидетельствует в пользу ХМЛ. Необходимо исследовать активность ЩФ в зрелых нейтрофилах периферической крови и костного мозга. Низкие показатели активности ЩФ или ее отсутствие — характерные признаки ХМЛ.

**Стадия акселерации.** В развернутом периоде нарастает лейкоцитоз в периферической крови.

значительно увеличивается количество миелоцитов и метамиелоцитов, эозинофилов и базофилов. Также может увеличиваться и количество бластных клеток (до 10%). В гранулоцитах уменьшается количество специфической зернистости. Цитоплазма клеток становится более базофильной, вакуолизированной, ядра приобретают уродливые очертания. Развивается анемия с анизоцитозом эритроцитов в виде их увеличения (макроцитоз), появляются нормобласты. Количество тромбоцитов снижается.

В костном мозге увеличивается количество миелокариоцитов с преобладанием миелоцитов и метамиелоцитов. До 10% увеличивается количество бластных клеток. Появляются признаки дисмиелопоэза. Значительно уменьшается количество элементов эритронормобластического ростка. Мегакариоцитарный росток чаще не изменен, но количество мегакариоцитов может снижаться.

При прогрессировании заболевания изменения со стороны периферической крови и костного мозга усиливаются, количество бластных клеток увеличивается до 15–30%.

**Острая, или терминальная, стадия.** Характеризуется развитием бластного криза с увеличением количества бластных клеток (до 95–98%). При этом наблюдается панцитопения (снижение количества элементов всех ростков кроветворения). Бластные клетки могут иметь различную дифференцировку (лимфоидную, миелоидную). Идентификацию бластных клеток проводят стандартными морфоцитохимическими и иммунологическими методами (как при острых лейкозах).

## Глава 2

### Иммунодиагностика острого лейкоза

*Тупицын Н.Н.*

**Д**иагностика острых лейкозов является морфологической и базируется на обнаружении бластных клеток в костномозговом пунктате ребенка. Установление вариантов лейкоза — ОЛЛ и ОМЛ в соответствии с критериями FAB-классификации проводится цитохимическими методами.

Изучение клеток острых лейкозов с помощью моноклональных антител позволяет получить точный антигенный портрет (иммунофенотип) бластной клетки.

Имунофенотипирование острых лейкозов у детей необходимо по ряду причин. Острый лимфобластный лейкоз является чрезвычайно гетерогенным заболеванием. Он может происходить из костномозговых предшественников Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллеров (NK-клеток), подвергшихся злокачественной трансформации и остановленных в своем развитии на разных стади-

ях дифференцировки. Установить линейную принадлежность (Т, В, НК) и стадию зрелости лейкозных лимфобластов морфоцитохимическими методами не представляется возможным, это можно сделать только с помощью иммунофенотипирования. Таким образом диагностируются иммунологические подварианты ОЛЛ, каждый из которых соответствует определенной стадии дифференцировки лимфобластов В- или Т-линии. С практической точки зрения установление иммуноподвариантов ОЛЛ у детей совершенно необходимо, так как уже на заре становления иммунодиагностики острых лейкозов, примерно 20 лет назад, было показано, что ОЛЛ в зависимости от линейной принадлежности и стадии дифференцировки бластных клеток характеризуется различным течением и прогнозом. В условиях современных программ полихимиотерапии ОЛЛ у детей многие из этих положений остаются в силе; более того, иммунофенотип учитывается как фактор риска при выборе тактики лечения.

При ОМЛ иммунофенотипирование играет двойную роль: позволяет подтвердить миелоидную природу лейкоза и установить вариант ОМЛ в сложных диагностических ситуациях. Иммунологические факторы неблагоприятного прогноза ОМЛ у детей учитываются при разработке программ высокодозной полихимиотерапии с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

## 2.1. Острые лимфобластные лейкозы

### 2.1.1. Основные принципы иммунодиагностики и иммуноклассификации острого лимфобластного лейкоза у детей

В основу иммунодиагностики ОЛЛ положен сравнительный принцип — сопоставление иммунофенотипа злокачественных лимфобластов с иммуно-

фенотипом лимфоидных клеток в ходе нормального лимфопоэза. Иммуноподварианты ОЛЛ у детей соответствуют стадиям костномозговой дифференцировки нормальных Т- и В-лимфоцитов.

Т- и В-клетки наиболее ранних стадий дифференцировки возникают у человека после рождения в костном мозге из общего предшественника. Созревание Т- и В-лимфоцитов как клеток иммунной системы направлено на последующую реализацию их функции, осуществление которой невозможно без специфических Т- и В-клеточных мембранных рецепторов для антигена (точнее — рецепторных комплексов — TCR и BCR соответственно). Последовательные стадии дифференцировки Т- и В-лимфоцитов характеризуются изменениями в экспрессии рецепторных комплексов. В составе этих комплексов есть собственно рецепторные структуры — иммуноглобулины (Ig) в составе BCR на В-лимфоцитах и Т-клеточный рецептор в составе TCR на Т-лимфоцитах — и белковые молекулы, не обеспечивающие распознавание антигенных детерминант, но проводящие сигнал с рецептора внутрь клетки. Эти сигналпередающие молекулы носят название трансдуцерных молекул; в составе TCR к ним относится CD3, в составе BCR — CD79. CD3 и CD79 столь же специфичны для Т- и В-клеток, как и соответствующие типы рецепторных структур (TCR, Ig). Схематически строение В-клеточного рецептора представлено на рис. 2.1.

В ходе нормальной дифференцировки лимфоцитов мембранные молекулы TCR и Ig появляются на поздних этапах созревания клетки, трансдуцерные молекулы CD3 и CD79 синтезируются значительно раньше и обнаруживаются сначала в цитоплазме, затем на мембране клетки. Самыми ранними индикаторами Т- и В-линейной принадлежности являются мембранные молекулы CD7 и CD19 соответственно. Эти белки играют важную роль в функционировании Т- и В-лимфоцитов, однако значение их появления на

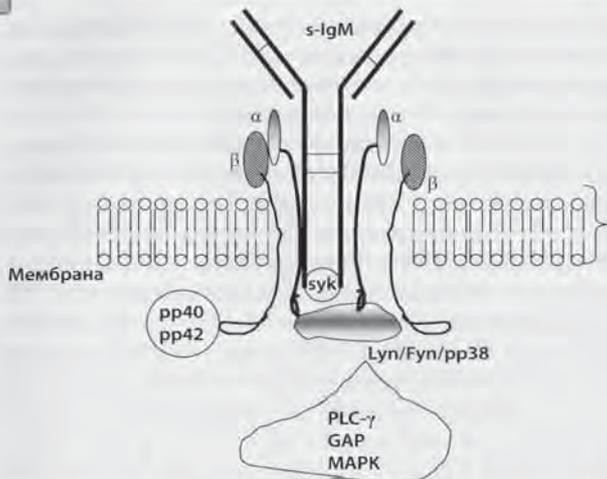


Рис. 2.1. Структура В-клеточного рецепторного комплекса. Syk, Lyn, Fyn, pp38, pp40, pp42, PLC- $\gamma$ , GAP, MAPK — молекулы, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала

самых ранних предшественниках лимфоцитов неизвестно.

Главные события начальных этапов дифференцировки Т- и В-клеток происходят в ядре и связаны со сборкой генов Ig и TCR из предсуществующих в составе ДНК фрагментов. Дело в том, что количество специфичностей рецепторов Т- и В-лимфоцитов столь велико (более  $10^{11}$ ), что кодировать каждый из них в геноме в виде отдельного гена для полной молекулы рецептора было бы для организма не просто расточительно, но практически невозможно. Реализован комбинаторный принцип — функционально активный ген собирается из трех-четырех фрагментов, разобщенных в геноме, при этом за счет комбинаций этих генов резко возрастает число специфичностей.

Для понимания этого принципа кратко напомним строение молекулы Ig и молекулы TCR.

Молекула Ig состоит из четырех полипептидных цепей — двух легких (L-цепи, от англ. *light*) и двух

тяжелых (H-цепи, от англ. *heavy*). Своё название эти белковые молекулы получили вследствие того, что различаются по молекулярной массе — у L-цепей она меньше, чем у H-цепей. Структурная организация L- и H-цепей имеет черты сходства — они состоят из вариабельной (V, от англ. *variable*) и константной (C, от англ. *constant*) областей. В составе константной области легких цепей Ig один домен, в составе тяжелых цепей Ig — обычно три домена. У человека 2 типа легких цепей ( $\kappa$  и  $\lambda$ ) и 5 классов (изотипов) тяжелых цепей ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). Константные области полипептидных цепей Ig кодируются одним геном, а вариабельные — несколькими генами, которые находятся на одной молекуле ДНК в одной и той же хромосоме, но пространственно разобщены. Вариабельные области легких цепей кодируются двумя генами — V (от англ. *variable* — вариабельный) и J (от англ. *joining* — соединяющий). V-области H-цепей Ig кодируются тремя генами — V, D (*diversity*, разнородности) и J. Схема объединения (реаранжировки) генов Ig на примере гена  $\mu$ -цепей Ig показана на рис. 2.2.

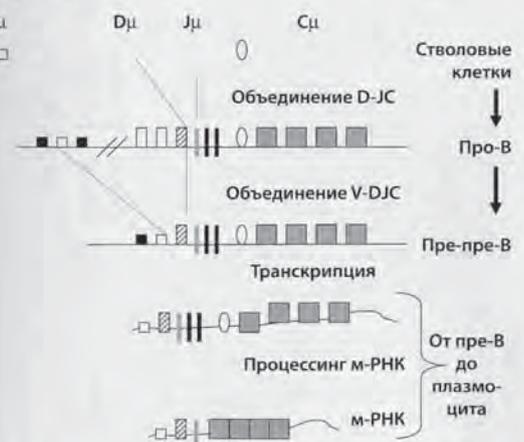


Рис. 2.2. Схема перестройки генов Ig и формирования мРНК для  $\mu$ -цепи IgM

Т-клеточный рецептор существует в виде двух гетеродимерных молекул — 95% Т-лимфоцитов экспрессируют  $\alpha/\beta$ -рецептор и примерно 5% —  $\gamma/\delta$ -рецептор.  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепи рецептора кодируются, как в случае L-цепей Ig, тремя генами — VJ $\alpha$ , в составе генов  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей присутствует D-сегмент. В онтогенезе происходит сборка генов TCR так же, как это происходит с генами Ig.

Последовательность смены дифференцировочных антигенов на мембране В-клеток по мере их дифференцировки представлена в табл. 2.1. Взаимоотношения молекул CD19, CD10, HLA-DR, характерных для В-клеточной линии, с другими ростками гемопоэза показаны на рис. 2.3–2.5.

Изменения в ходе дифференцировки Т-лимфоцитов представлены в табл. 2.2. Схематично экспрессия Т-клеточного антигена CD7 дана на рис. 2.6.

Таблица 2.1  
Фенотипические и генетические изменения в ходе дифференцировки В-клеток

Маркер	Костный мозг		Периферическая кровь, лимфоидные ткани	
	ЛСК	Про-В-клетки	Пре-В-клетки	Активированные В-клетки
CD34	+	+	+	+
TdT	+	+	+	+
HLA-DR	+	+	+	+
Ген H-цепей	+	+	+	+
CD79	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+
CD10	+	+	+	+
CD22	+	+	+	+
Ген kappa	+	+	+	+
Цитоплазматическая $\mu$ -цепь	+	+	+	+

Таблица 2.1 (продолжение)

Маркер	Костный мозг				Периферическая кровь, лимфоидные ткани		
	ЛСК	Про-В-клетки	пре-пре-В-клетки	пре-В-клетки	В-клетки	Активированные В-клетки	Плазмоциты
Ген лямбда					+	+	+
CD20				+	+	+	
CD21					+	+	
CD23						+	
CD5						±	
Мембранный Ig					+	+	
CD38	±	±	±				+++
PCA-1							+

Принятые сокращения: ЛСК — лимфоидная стволовая клетка; с — цитоплазматическая экспрессия.

Таблица 2.2

## Фенотипические и генетические изменения в ходе дифференцировки Т-клеток

Маркер	Костный мозг			Тимус		Периферическая кровь, лимфоидные ткани	
	ЛСК	Протимоциты	Незрелые тимоциты	Кортикальные тимоциты	Медуллярные тимоциты	Т-клетки	Активированные Т-клетки
CD34	+						
TdT	+	+	+	+		±	
HLA-DR	+	+					+
TCR-δ		±	+	+	+	+	+
TCR-γ		±	+	+	+	+	+
CD7		+	+	+	+	+	+
CD2		±	+	+	+	+	+
CD5			+	+	+	+	+
CD3			с	с	+	+	+
TRC-β				±	+	+	+
TCR-α				±	+	+	+

Таблица 2.2 (продолжение)

Маркер	Костный мозг			Тимус		Периферическая кровь, лимфоидные ткани	
	ЛСК	Протимоциты	Незрелые тимоциты	Кортикальные тимоциты	Медуллярные тимоциты	T-клетки	Активированные T-клетки
CD1a				+			
Thy-1		+	+				
CD4 <sup>+</sup> CD8				+			
CD4 или CD8						+	+
CD10	±	±					

Принятые сокращения: ЛСК — лимфоидная стволовая клетка; с — цитоплазматическая экспрессия.

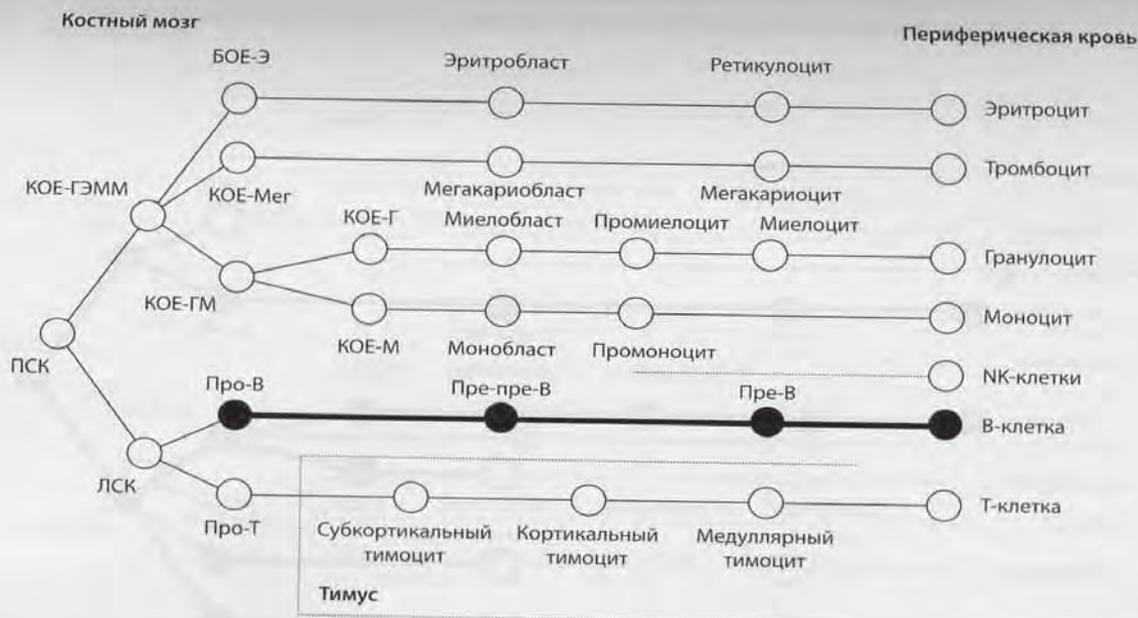


Рис. 2.3. Экспрессия антигена CD19 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

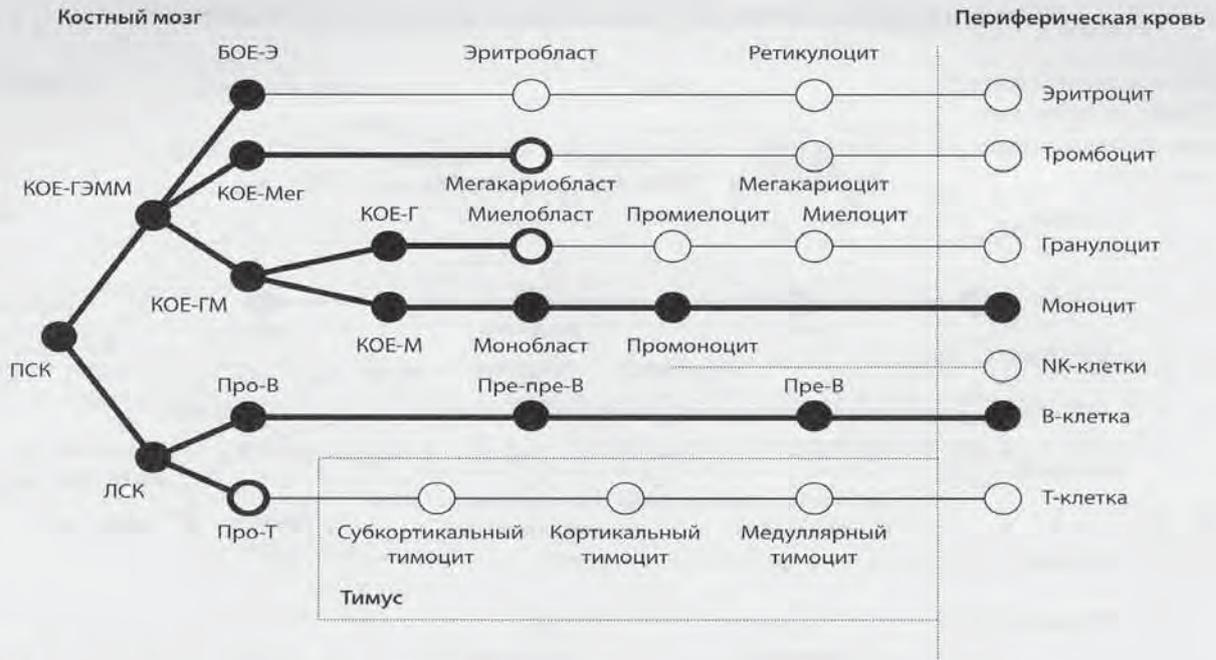


Рис. 2.4. Экспрессия антигена HLA-DR в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

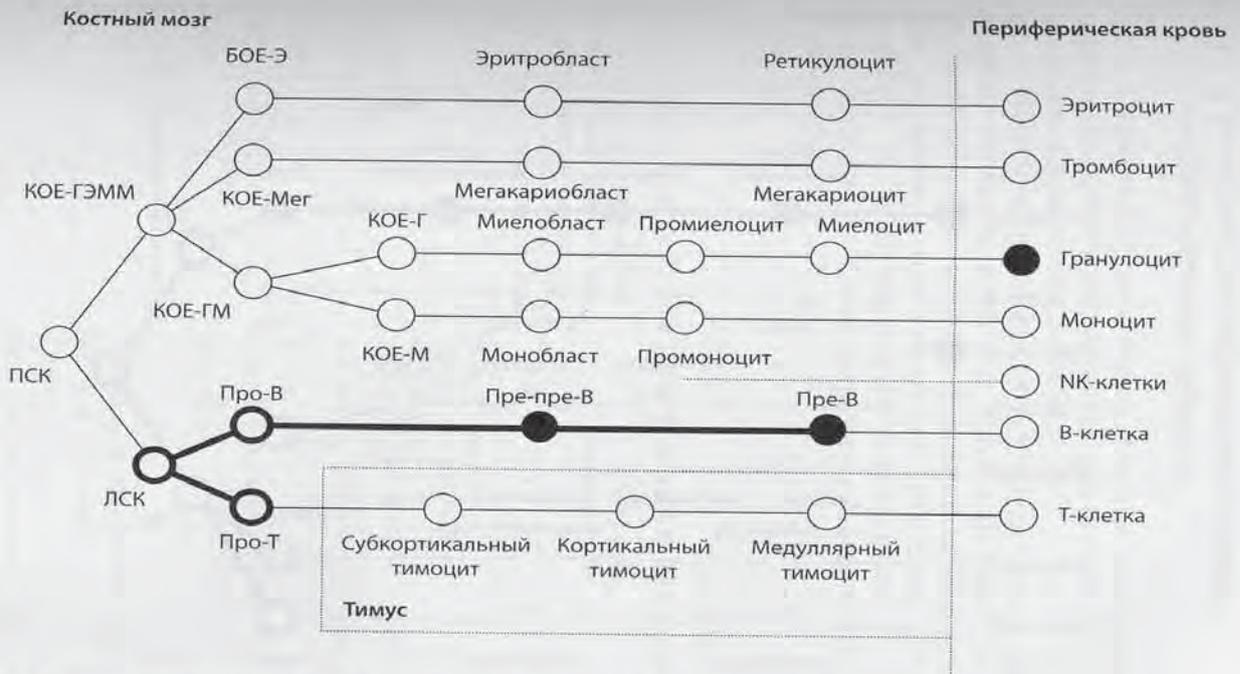


Рис. 2.5. Экспрессия антигена CD10 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

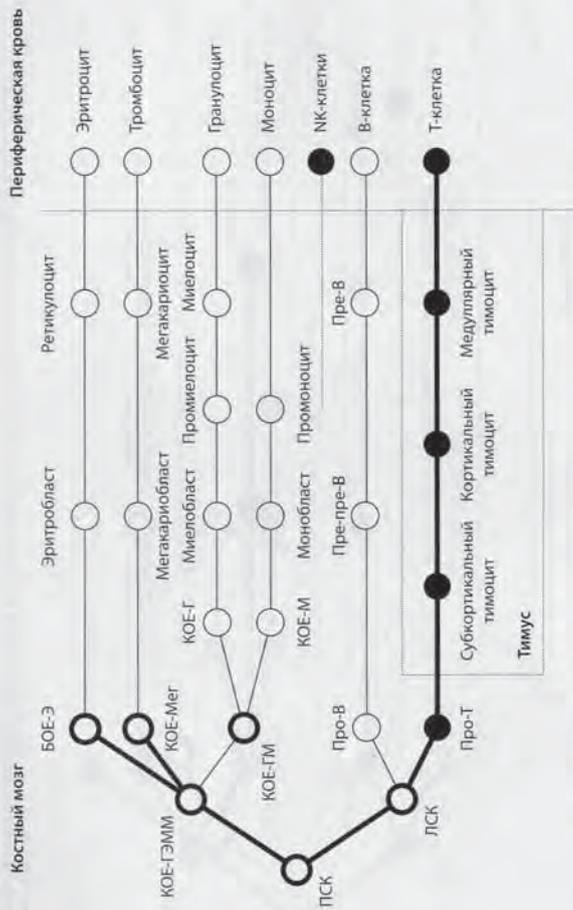


Рис. 2.6. Экспрессия антигена CD7 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

### 2.1.2. Иммунодиагностика и иммуноклассификация острого лимфобластного лейкоза

Существуют различные методы определения мембранных, цитоплазматических и ядерных антигенов клеток при острых лейкозах.

Набор антител для иммунофенотипирования острых лейкозов включает основные маркеры Т-, В-клеточной, миелоидной линейной принадлежности, моноклональные антитела к антигенам эритроидной и мегакариоцитарной направленности дифференцировки, а также линейно не ограниченным антигенам (табл. 2.3).

Таблица 2.3

#### Набор антител для диагностики лейкозов

Антиген (наименование молекулы, CD или моноклональные антитела)	Клеточная специфичность
<b>В-клеточные антигены:</b>	
CD19	В-клеточные предшественники и В-клетки
CD22	В-клетки
CD23	Активированные В-клетки
CD37	В-клетки
c-Ig (μ-цепь)	Пре-В клетки
s-Ig	В-клетки
<b>Т-клеточные антигены:</b>	
CD7	Т-клеточные предшественники и Т-клетки
CD5	Тимоциты и Т-клетки
CD1a	Кортикальные тимоциты
CD3	Зрелые Т-клетки

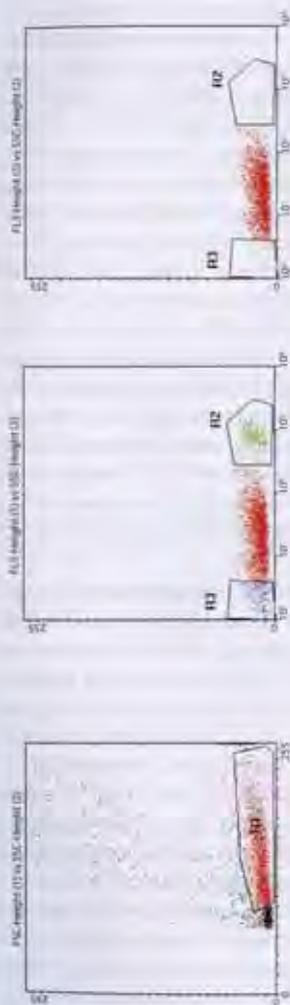
Таблица 2.3 (продолжение)

CD4, CD8	Тимоциты, Т-хелперы, Т-супрессоры
<b>Антиген (наименование молекулы, CD или моноклональные антитела)</b>	<b>Клеточная специфичность</b>
<b>Миеломоноцитарные антигены:</b>	
CD11b	Миелоидные и NK-клетки
CD13	Миелоидные клетки
CD15	Преимущественно нейтрофилы
CD33	Моноциты и миелоидные предшественники
D11	Макрофаги
<b>Эритроидные антигены:</b>	
Антиген эритробластов HAE-9	Ядросодержащие эритроидные клетки
Гликофорин А (моноклональные антитела HAE-3)	Эритроциты, эритроидные предшественники
<b>Мегакариоцитарные антигены:</b>	
CD41 или CD61	Тромбоциты, мегакариоциты
<b>Антигены различных линий:</b>	
HLA-DR	В-клетки, моноциты/макрофаги, миелоидные предшественники, активированные Т-клетки, стволовые клетки
CD38	Т-, В-клеточные и миелоидные предшественники; активированные клетки
CD10	Т- и В-клеточные предшественники
CD34	Стволовые клетки
CD71	Активированные клетки, предшественники
CD50	Лейкоциты
CD30	Активационный антиген

Принятые сокращения: Ig — иммуноглобулины (с — цитоплазматические; s — мембранные).

В зависимости от целей исследования панель моноклональных антител может видоизменяться. В последние годы широко применяется двух- и трехцветное флюоресцентное окрашивание лейкозных клеток, которое позволяет оценивать на мембране клетки одновременно два и три антигена. Этот метод высокоинформативен, в особенности при оценке полноты ремиссии и аберрантного иммунофенотипа лейкозных клеток. Одним из преимуществ трехцветного иммунофлюоресцентного окрашивания является возможность точной идентификации бластных клеток. Принцип метода состоит в том, что уровни экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 нарастают по мере дифференцировки гемопоэтических клеток от незрелых предшественников до зрелых периферических лимфоцитов. Бластные клетки ОЛЛ у детей экспрессируют низкие уровни CD45, что позволяет на основе всего лишь двух параметров (SSC — боковое рассеяние света лазерного луча, экспрессии CD45) отделить бластные клетки от лимфоцитов и проводить анализ в чистой популяции бластных клеток (рис. 2.7).

Возможности иммунофенотипирования ОЛЛ поистине велики и до конца не востребованы. Это обусловлено уникальностью метода, огромным объемом информации, которую он предоставляет, и в известной степени отсутствием прямого влияния иммунофенотипа бластных клеток ОЛЛ на выбор лечебных программ. Дело в том, что программы лечения ОЛЛ у детей (BFM или иные) являются очень консервативными (что обусловлено, конечно, в первую очередь, высокой эффективностью противолейкозной терапии при ОЛЛ у детей) и не подвержены модификациям. Вместе с тем *обязательным условием* участия в протоколах лечения ОЛЛ у детей является иммунофенотипирование лейкоза и иммунофенотипическая оценка минимальной остаточной болезни. Иммуноподвариант лейкоза (про-В, Т, в ряде случаев — экспрессия миелоидных антигенов) учитывается при назначении



**Рис. 2.7.** *А* — характеристики рассеяния света лазерного луча свидетельствуют о наличии мономорфной популяции бластных клеток (по данным морфологического анализа и костномозговом пункте 80% бластов). В этих координатах создается область R1 для иммунологического исследования бластных клеток, в которую не включены остаточные зрелые клетки гранулоцитарного ряда (имеют высокие уровни SSC — параметра, отражающего гранулярность); кроме того, из области анализа исключены клеточные обломки; *Б* — определенная область бластных клеток, тем не менее, содержат примесь лимфоцитов (R2) и облатки, не экспрессирующие CD45 (R3). Регионы R2 и R3 также исключены из анализа; *В* — итоговая область бластных клеток, подлежащих анализу. Эти клетки характеризуются отсутствием зернистости (низкие характеристики SSC), примесью лимфоцитов, эритроцитов, клеточных обломков

высокодозной терапии с ТГСК у детей, страдающих ОЛЛ.

При иммуноклассификации ОЛЛ учитывается экспрессия на лимфобластах как отдельных дифференцировочных антигенов, так и их комбинаций, соответствующих иммунологическим подвариантам заболевания (табл. 2.4). Существует определенная взаимосвязь между клиническими проявлениями заболевания (пол, возраст больного, уровень лейкоцитаза, вариант бластных клеток по морфологической или морфоцитологической FAB-классификации, степень выраженности анемии и тромбоцитопении, чувствительность клеток ОЛЛ к цитостатической терапии) и иммунофенотипом лейкоза.

Возможности иммуноклассификации ОЛЛ очень большие. С позиций клинической значимости обычно выделяют ограниченное число подвариантов. В международных протоколах и в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН принято выделять 4 подварианта В-линейных ОЛЛ и 2 подварианта — Т-линейных ОЛЛ (см. табл. 2.4). Подварианты ОЛЛ, выделяемые в различных классификациях, весьма однотипны, и трансляция между классификациями обычно не представляет труда (табл. 2.5).

В большинстве современных протоколов лечения ОЛЛ у детей предусмотрена индивидуализация интенсивной полихимиотерапии для трех основных групп заболевания: В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ (учитывается чаще как фактор риска) и ОЛЛ из В-линейных предшественников.

В-линейные ОЛЛ обычно подразделяют на 4 типа в соответствии со стадией зрелости лимфобластов. В литературе отсутствует единство терминологии для В-линейных лейкозов, сопоставление наиболее распространенных классификаций представлено в табл. 2.5.

Таблица 2.4

## Имуноклассификация острых лимфобластных лейкозов

Имуноподвариант ОЛЛ	Имунофенотипические маркеры бластных клеток										
	CD19	CD10	CD7	CD5	CD1a	CD3	HLA-DR	CD34	М.	Эр.	Ig
<b>В-линейные ОЛЛ:</b>											
про-В	+	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-
пре-пре-В	+	+	-	-	-	-	+	±	-	-	-
пре-В	+	±	-	-	-	-	+	-	-	-	с (μ-цепь)
В	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	s
<b>Т-линейные ОЛЛ:</b>											
пре-Т	-	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
пре-Т	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 2.4 (продолжение)

Имуноподвариант ОЛЛ	Имунофенотипические маркеры бластных клеток										
	CD19	CD10	CD7	CD5	CD1a	CD3	HLA-DR	CD34	М.	Эр.	Ig
Т	-	-	+	+	±	±	-	-	-	-	-
Стволовые	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-	-
Нелимфоидные	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-

Примечание. Указаны только наиболее типичные сочетания антигенов, имеющие значение для установления подварианта. Так, например, экспрессия нелимфоидных антигенов может наблюдаться практически при любом иммунофенотипе, но только при отсутствии признаков «лимфоидности» возможна диагностика вариантов М0, М6, М7 и т.д.

Принятые сокращения: М. — миелоидные антигены; Эр. — эритроидные антигены; Ig — иммуноглобулины (с — цитоплазматические; s — мембранные).

Таблица 2.5

## Современные иммуноклассификации В-линейных ОЛЛ

РОИЦ РАМН	ГНЦ РАМН	Pieters et al.	Ludwig et al.	POG	Foon & Todd	GEIL
Про-В	Ранний пре-В	Про-В	Пре-пре-В	Ранний пре-В CD10-негативный	Группа II	Пре-В1
Пре-пре-В или common/«общий»	«Общий»	«Общий»	«Общий»	Ранний пре-В CD10-позитивный	Группы III-IV	Пре-В2, пре-В3
Пре-В	Пре-В	Пре-В	Пре-В	Пре-В	Группа V	Пре-В4
В	В	В	В	В	Группа VI	В

В-клеточный ОЛЛ — это самый редкий (не более 2–3%) и самый агрессивный по клиническому течению иммунологический подвариант ОЛЛ. Он напоминает диссеминированную В-клеточную лимфому, однако проявления экстрамедуллярного опухолевого роста могут не являться доминирующими в клинической картине заболевания. Обычно бластные клетки имеют морфологию L3 и экспрессируют мембранные IgM,κ (редко встречаются другие изотипы). Все описанные прежде случаи В-ОЛЛ имели крайне плохой прогноз. Применение современных протоколов ВФМ (Берлин — Франкфурт — Мюнстер) позволило добиться хороших результатов в лечении В-ОЛЛ у детей — до 78% 5-летней безрецидивной выживаемости (БРВ). Подход к лечению точно такой же, как и при В-клеточных лимфомах у детей: короткие периоды фракционированной высокодозной терапии циклофосфаном, цитарабином и метотрексатом в сочетании с введением химиопрепаратов интратекально.

Т-клеточный иммуноподвариант встречается при ОЛЛ у детей примерно в 15% случаев и хуже поддается полихимиотерапии, чем ОЛЛ из В-линейных предшественников. Большую роль здесь, по видимому, играет тип терапии, так как при интенсификации лечения с включением L-аспарагиназы и препаратов антрациклинового ряда Т-клеточный иммунофенотип не имел прогностического значения.

Т-ОЛЛ имеет достаточно очерченные клинические проявления. Типичны высокий лейкоцитоз, наличие медиастинальных опухолевых масс и поражение центральной нервной системы (ЦНС). Возможно, именно ассоциация Т-клеточного иммунофенотипа с клиническими факторами риска обуславливает короткий безрецидивный период при Т-ОЛЛ.

Хорошо разработана субклассификация Т-клеточного ОЛЛ, что связано с возможностью идентификации по меньшей мере трех основных стадий дифференцировки Т-клеток. Ключевым маркером, который

используется для установления зрелости Т-клеток, является CD1a. Эта молекула экспрессирована на кортикальных тимоцитах и отсутствует на костномозговых предшественниках Т-лимфоцитов, а также на зрелых Т-клетках. Самым ранним мембранным антигеном в ряду Т-клеточной дифференцировки является молекула CD7. Несколько позже на мембране пре-Т-клеток появляется CD5, а в цитоплазме — CD3-антиген. На кортикотимоцитах, помимо CD1a, CD7, CD5, цитоплазматического CD3, обычно коэкспрессированы молекулы CD4 и CD8. Поздние этапы дифференцировки Т-клеток характеризуются мембранными CD3, CD5, CD7, CD4 или CD8. Первоначально использовавшаяся молекула Е-рецептора (CD2) отсутствует на самых ранних этапах дифференцировки Т-клеток. Выделение иммуноподвариантов Т-ОЛЛ не получило широкого распространения, так как не было установлено особенностей их клинического течения. Из числа иммунологических маркеров связь с прогнозом Т-ОЛЛ в многофакторном анализе имел только «общий» антиген (CD10): отсутствие CD10 на мембране Т-лимфобластов ассоциировалось с худшими результатами лечения больных. По этой причине, а также на основании собственного опыта относительно благоприятной роли «общего» антигена вне зависимости от подварианта ОЛЛ нами выделен CD10-положительный подвариант Т-ОЛЛ, который объединен с пред-Т-клеточным (CD7<sup>+</sup>CD5<sup>+/−</sup>) иммуноподвариантом (см. табл. 2.4). В условиях проведения одинаковой полихимиотерапии Т-клеточных лейкозов поиск взаимосвязи результатов лечения со стадией дифференцировки Т-лимфобластов и использование с этой целью CD10 можно считать вполне оправданными.

Наиболее многочисленная иммунологическая подгруппа ОЛЛ у детей (60–80%) представлена лейкозами из В-линейных предшественников. Выделяют по меньшей мере два иммуноподварианта в этой группе: пре-В-клеточный и ранний пре-В-клеточный (common, пре-пре-В) (см. табл. 2.5).

Пре-В клеточный иммуноподвариант ОЛЛ имеет четкие диагностические критерии и устанавливается по наличию в цитоплазме бластных клеток  $\mu$ -цепей иммуноглобулинов. Встречается эта форма у 16–25% детей, больных ОЛЛ. Обычно пре-В ОЛЛ по клиническому течению почти неотличим от раннего пре-В, или «общего» (common) подварианта. Вместе с тем, диагностика этого субтипа совершенно необходима, так как доказано, что он имеет менее благоприятный прогноз, чем «общий» субвариант: длительность безрецидивного периода при пре-В ОЛЛ у детей была достоверно короче, чем при «общем» субварианте.

Существует мнение, что неблагоприятные прогностические характеристики пре-В ОЛЛ обусловлены ассоциацией с транслокацией t(1;19), которая отмечена в 20–30% случаев при этом подварианте.

Ранний пре-В-клеточный ОЛЛ (синонимы: common, «общий», пре-пре-В) является самым распространенным и прогностически наиболее благоприятным иммунологическим подвариантом ОЛЛ в детском возрасте. Отмечается экспрессия CD10 или common-антигена. Редкие CD10-негативные случаи хуже поддаются терапии, чем основная группа ранних В-линейных лейкозов. Они выделены в отдельный субвариант, носящий название «ранний пре-В CD10-негативный» или про-В-клеточный ОЛЛ (см. табл. 2.4 и 2.5).

Про-В клеточный иммуноподвариант ОЛЛ взаимосвязан с возрастом больных и наличием транслокации t(4;11). Частота про-В ОЛЛ у новорожденных достигает 90% среди ранних В-клеточных лейкозов, в то время как у детей в возрасте от 1,5 до 10 лет этот показатель составляет лишь 6%. Несколько больше частота про-В-клеточного ОЛЛ (до 13% среди ранних В-линейных лейкозов) у детей старше 10 лет.

Ассоциация про-В-клеточного лейкоза с неблагоприятным прогнозом во многом объясняется тем, что ряд клинико-гематологических факторов высокого риска, наблюдаемых при данном подварианте (гиперлейкоцитоз, индекс ДНК < 1,16, псевдодиплоид-

ность), часто встречается у новорожденных или ассоциирован с t(4; 11). Показана утрата прогностического значения CD10-антигена при исключении из анализа детей самого раннего возраста. Наши данные также свидетельствуют об отсутствии прогностической роли антигена CD10 у детей раннего возраста.

Самая многочисленная группа ОЛЛ у детей представлена «ранним пре-В CD10-положительным» иммуноподвариантом (синонимы: «общий», common, пре-пре-В, см. табл. 2.5). Название «пре-пре-В», используемое нами и рядом других авторов, соответствует этапу дифференцировки В-лимфоцитов, при котором экспрессирован CD10, но отсутствует цитоплазматическая  $\mu$ -цепь. Этот тип лейкозных клеток наиболее чувствителен к химиотерапии и имеет связь с клинико-гематологическими и цитогенетическими признаками благоприятного прогноза.

Помимо основных иммуноподвариантов, при ОЛЛ встречаются и редкие формы заболевания. В отдельных случаях морфоцитохимические данные могут указывать на ОЛЛ, а при иммунофенотипическом исследовании какие бы то ни было маркеры лимфоидной линии отсутствуют. Напротив, бластные клетки экспрессируют миелоидные антигены (реже — эритроидные, крайне редко — мегакариоцитарные), что позволяет установить вариант M0 (реже — M6, крайне редко — M7). В этих случаях лечение проводится по программам лечения миелоидных лейкозов. Значительно сложнее решаются вопросы линейной принадлежности при так называемых неклассифицируемых острых лейкозах. По морфологическим и цитохимическим признакам бластные клетки соответствуют лимфобластам, однако не имеют иммунологических маркеров «лимфоидности». Частота подобных наблюдений составляет не более 1%. При неклассифицируемых острых лейкозах могут быть экспрессированы антигены стволовых (CD34<sup>+</sup>) клеток в сочетании с HLA-DR и CD38 («стволовоклеточный» подвариант, см. табл. 2.4).

В течение длительного времени ведутся дискуссии относительно природы бластных клеток ОЛЛ, имеющих одновременно лимфоидные и миелоидные маркеры. Их называют по-разному: бифенотипические, гибридные, смешанно-линейные, линейно-разномаркерные и т.п. Экспрессия одного или нескольких миелоидных антигенов встречается примерно в 15% ОЛЛ у детей. Наиболее распространены CD11b, CD15, CD33, CD13, CD14, CDw65. Некоторые из этих маркеров (CD11b, CD15) не являются строго специфичными для миелоидной линии и могут обнаруживаться на немногочисленных субпопуляциях лимфоидных или NK-клеток. Установлена неблагоприятная прогностическая роль экспрессии миелоантител CD14, CD13, CD33 при ОЛЛ у детей. Однако эта точка зрения не нашла подтверждения в ряде других исследований: ни отдельно взятые миелоидные антигены, ни их различные сочетания не влияли на длительность безрецидивного течения заболевания. По-видимому, для уточнения клинической значимости того или иного миелоидного антигена важно учитывать его диагностическую ценность. Подобная шкала и система счета в баллах предложены французскими гематологами (GEIL — Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies) — группа по изучению иммунологии лейкозов). В соответствии с этой системой счета наибольшую диагностическую ценность имеет миелопероксидаза, выявляемая по энзиматической активности или с помощью антител, меньшее значение придается экспрессии CD13, CD14, CD33, CD65 и, наконец, самый слабый вес в установлении «миелоидности» имеют CD11b, CD15, CD35, CD36. Случаи лейкоза, при которых сумма баллов по отдельным миелоантителам составляет не менее 2, авторы рекомендуют называть мультифенотипическими (лимфоидные антигены присутствуют) или M0 (лимфоидных антигенов нет). Роль этой классификации еще предстоит оценить.

Особую группу составляют ОЛЛ с экспрессией эритроидных антигенов. До настоящего времени в условиях проведения программ интенсивной полихимиотерапии ОЛЛ этот вопрос не анализировался. В самое последнее время описаны ранние пре-В-клеточные (про-В, пре-пре-В) ОЛЛ с коэкспрессией панмакрофагальных антигенов D11 (CD163), установлено неблагоприятное прогностическое значение данного признака при ОЛЛ в детском возрасте.

Наряду с маркерами линейной и стадийной принадлежности при ОЛЛ, изучаются антигены, представленные в норме на различных гемопоэтических линиях (см. табл. 2.3). Наиболее важными из них, помимо уже описанного CD10, являются HLA-DR, CD38 и CD34.

Молекула HLA-DR экспрессирована практически во всех случаях В-линейных ОЛЛ, а также у отдельных больных с Т-ОЛЛ.

Отмечена высокая корреляционная связь экспрессии HLA-DR и антигена CD10. Вместе с тем, HLA-DR (или Ia-подобный антиген) присутствует на «ранних CD10-негативных» (про-В) ОЛЛ, а кроме того, может отмечаться дискордантность в экспрессии CD10 и HLA-DR при Т-линейных ОЛЛ. Проведенные нами исследования прогностической роли HLA-DR у 196 детей с ОЛЛ показали, что значение HLA-DR и CD10 различно. Экспрессия HLA-DR (Ia-подобного антигена) не влияла на общую выживаемость больных, однако при отсутствии этой молекулы на мембране лимфоцитов отмечена более короткая продолжительность полной ремиссии ( $p = 0,03$ ). Менее благоприятный прогноз HLA-DR-негативного ОЛЛ в данном случае нельзя объяснить ассоциацией с Т-ОЛЛ, так как в анализируемой группе больных Т-клеточный иммунофенотип не имел связи с неблагоприятным прогнозом.

Одним из широко распространенных маркеров ОЛЛ является CD38 — трансмембранный гликопротеин с активностью фермента НАД-гидролазы. Этот ан-

тиген представлен широко на клетках самых ранних этапов гемопоэза, а также при многих Т- и В-линейных лейкозах (рис. 2.8). CD38 не имеет диагностического значения и используется в качестве дополнительного маркера. Молекула CD38 оказалась одним из наиболее информативных маркеров, способствующих адекватному выбору интенсивных режимов полихимиотерапии у детей с ОЛЛ в группе стандартного риска.

Современные методы оценки чувствительности опухолевых клеток к воздействию цитостатиков *in vitro* дают дополнительное обоснование необходимости учета иммунологического подварианта ОЛЛ при выборе адекватных схем полихимиотерапии у больных. Про-В-ОЛЛ более резистентен к L-аспарагиназе и тиогуанину, а Т-ОЛЛ менее чувствителен к преднизолону, дексаметазону, L-аспарагиназе, винкристину, даунорубину, доксорубину, тенипозиду и ифосфамиду в сравнении с «общим» и пре-В-ОЛЛ. Резистентность клеток ОЛЛ к химиопрепаратам *in vitro* хорошо коррелирует с результатами лечения различных иммуноподвариантов ОЛЛ и длительностью ремиссии. Это дает дополнительные основания для дифференцированных подходов к терапии Т-ОЛЛ, а также к дальнейшей индивидуализации лечения про-В-клеточного иммуноподварианта.

Перспективы иммунофенотипического изучения бластных клеток ОЛЛ поистине многообразны. Детальный многопараметровый иммунофлюоресцентный анализ лимфоцитов в периоде диагностики заболевания позволяет обнаружить aberrантные комбинации мембранных антигенов, не типичные для нормальных гемопоэтических предшественников. Эти данные полезны в ходе наблюдения за больными в ремиссии для обнаружения ранних рецидивов и минимальной остаточной болезни.

Важно отметить, что именно с внедрением иммунологических методов исследования клеток ОЛЛ открылись перспективы детальной характеристики структуры лейкозного клона. Стало понятным

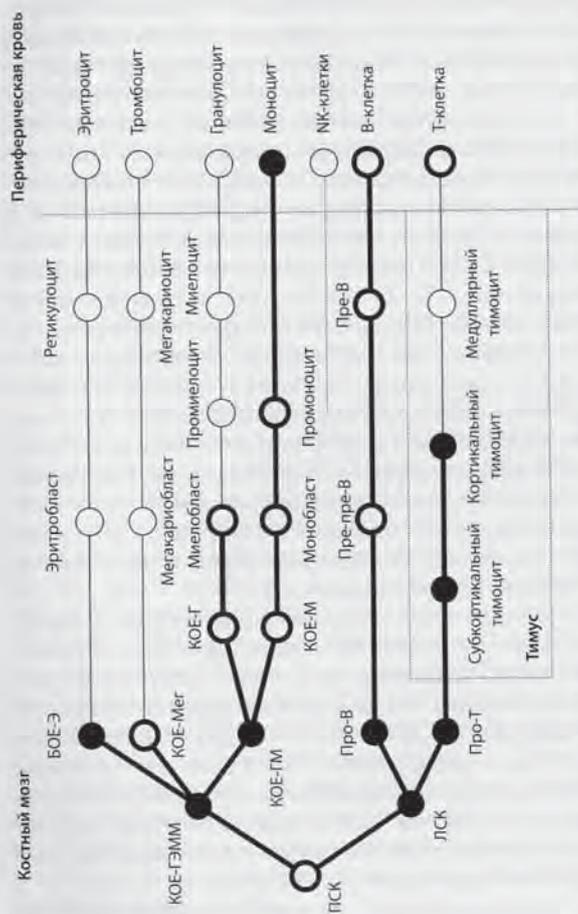


Рис. 2.8. Экспрессия антигена CD38 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

стволовоклеточное происхождение значительной части ОЛЛ. Установление экспрессии CD34 на лимфоцитах позволяет диагностировать подгруппу ОЛЛ, в которой злокачественная трансформация произошла на уровне самых ранних гемопоэтических предшественников (острые стволовоклеточные лейкозы). Эти лейкозы возникают из стволовых клеток различного уровня дифференцировки, в соответствии с которыми могут быть разделены на истинные стволовоклеточные (без линейной принадлежности), линейно-разномаркерные (коэкспрессируют наряду с лимфоидными миелоидными антигенами) и унилинейные (чаще — ранние пре-В-клеточные). При стволовоклеточных лейкозах отмечаются достоверно более высокие уровни CD10, CD38, а также миелоидных антигенов CD13 и CD33. Имеются убедительные данные об ассоциации экспрессии стволовоклеточного антигена CD34 с наиболее важными факторами неблагоприятного прогноза ОЛЛ взрослых: высоким уровнем лейкоцитов и blasts в периферической крови, наличием филадельфийской (Ph) хромосомы и blasts клеток в костном мозге на 15-й день, а также после одного курса индукционной терапии. Следовательно, выделение группы стволовоклеточных лейкозов оправдано с клинической точки зрения. Экспрессия CD34 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток представлена на рис. 2.9.

Иммунодиагностика и иммуноклассификация ОЛЛ хотя и имеют примерно 20-летнюю историю, но, по существу, сформировались лишь в последние 10 лет, благодаря пониманию линейной и стадийной рестрикции экспрессии дифференцировочных антигенов лейкоцитов. По меркам лейкологии это срок сравнительно небольшой. Однако уже в течение этого времени стало очевидным, что иммунофенотипическая характеристика лимфоцитов является необходимой как для установления диагноза, так и для применения адекватных современных химиотерапевтических протоколов. Помимо чисто клинических

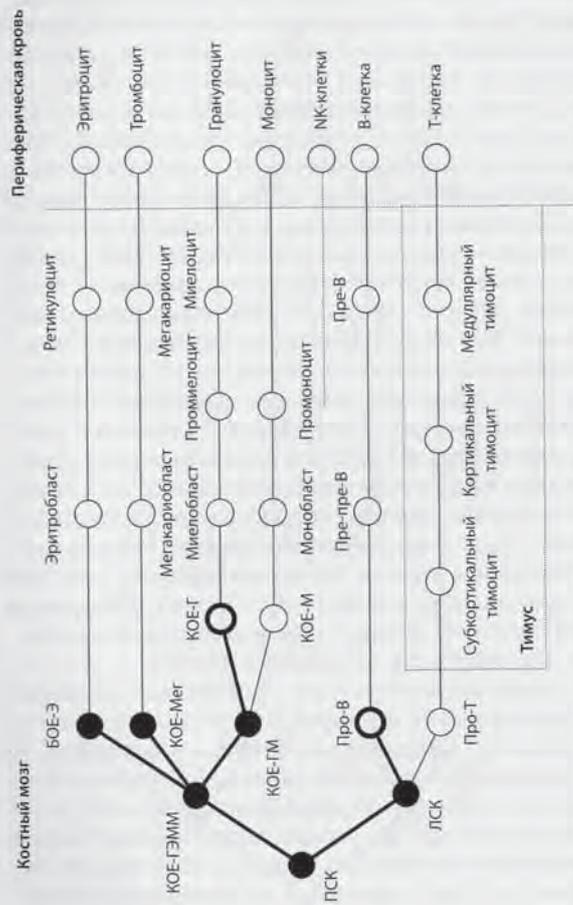


Рис. 2.9. Экспрессия антигена CD34 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

аспектов исследования бластных клеток иммунологическими методами позволяет глубже понять природу лейкоза, особенности его возникновения, развития и прогрессирования. Это может являться основой для разработки новых подходов к регуляции дифференцировки клеток ОЛЛ.

## 2.2. Острые миелоидные лейкозы

### 2.2.1. Иммунодиагностика острых миелоидных лейкозов

Острые миелоидные лейкозы у детей составляют менее многочисленную группу (около 20%) в сравнении с ОЛЛ (80%). Именно в группе больных ОМЛ результаты лечения до недавнего времени были неудовлетворительными.

Традиционно диагностика ОМЛ базируется на установлении вариантов лейкоза в соответствии с FAB-классификацией [3]. На основании морфохимических критериев выделены варианты M1–M6 ОМЛ, а несколько позже — варианты M0 и M7. Диагностическая роль иммунофенотипирования при этих вариантах неравнозначна. FAB-типы ОМЛ у детей встречаются с различной частотой. Некоторые из них (например, M0, M6 и M7) являются крайне малочисленными, что затрудняет оценку клинической значимости и возможностей индивидуализации терапии на основании морфохимических критериев. Принцип FAB-классификации заключается в установлении линейной принадлежности лейкоза (гранулоцитарные, монобластные, эритробластные, мегакариобластные) и уровня дифференцировки клеток в пределах гранулоцитарных лейкозов (M0–M3).

Альтернативным подходом, позволяющим устанавливать линейную принадлежность и стадию дифференцировки злокачественных клеток при миелоидных лейкозах, является иммунофенотипирование. Иммунологический метод диагностики ОМЛ име-

ет как преимущества, так и недостатки в сравнении с морфоцитохимическим исследованием. Преимущества связаны с возможностью более точного установления вариантов М0, М6 и М7 на основании экспрессии дифференцировочных антигенов бластными клетками. Недостатки метода связаны с тем, что он не позволяет с такой надежностью, как морфоцитохимия, разграничивать монобластные и гранулоцитарные лейкозы, а также устанавливать вариант лейкоза по FAB-классификации. По этим причинам на практике иммунофенотипическое исследование является методом, дополняющим стандартную морфоцитохимическую диагностику и позволяющим уточнять варианты ОМЛ.

Важное значение иммунологического изучения бластных клеток ОМЛ (помимо диагностики) заключается в том, что некоторые маркеры ассоциированы с агрессивностью течения и результатами лечения ОМЛ у детей. Это позволяет рассматривать их в качестве независимых прогностических признаков, которые могут быть перспективными для разработки иммуноклассификаций ОМЛ, ориентированных на последующую индивидуализацию химиотерапевтических режимов. Остановимся отдельно на каждом из основных приложений иммунофенотипирования ОМЛ у детей — диагностическом и прогностическом.

#### Маркеры, используемые для уточняющей иммунологической диагностики вариантов ОМЛ у детей

В настоящее время дифференцировка миелоидных клеток изучена достаточно детально. Палитра моноклональных антител, которая может быть применена для характеристики ОМЛ, поистине многообразна, однако лишь немногие типы моноклональных антител нашли широкое применение в практике иммунофенотипической диагностики ОМЛ. Мы используем единую панель моноклональных антител для иммунофенотипирования ОЛЛ и ОМЛ, так как исследова-

ние обычно проводится в период диагностики, когда вариант лейкоза еще неизвестен.

Иммунологические маркеры ОМЛ можно условно разделить на следующие группы: общемиелоидные, стадийспецифичные и линиеспецифичные. Последовательность изменения иммунофенотипа клеток в ходе миелоидной дифференцировки представлена в табл. 2.6 и 2.7.

Таблица 2.6

#### Иммунофенотип клеток гранулоцитарной линии

Маркер	КОЕ-ГЭММ	КОЕ-ГМ	Миело-бласт	Промие-лоцит	Мие-лоцит	Ней-трофил
CD34	+	+	±	-	-	-
HLA-DR	+	+	+	-	-	-
CD33	+	+	+	+	+	±
CDw65	±	±	+	+	+	+
CD13	-	+	+	+	+	+
CD15	-	-	-	+	+	+
CD11b	-	-	-	+	+	+

Таблица 2.7

#### Иммунофенотип клеток моноцитарной линии

Маркер	КОЕ-ГЭММ	КОЕ-ГМ	Моно-бласт	Промо-ноцит	Моно-цит	Гистиоцит/Макрофаг
CD34	+	+	-	-	-	-
HLA-DR	+	+	+	+	+	+
CD33	+	+	+	+	+	+
CDw65	±	±	±	±	±	±
CD13	-	+	+	+	+	+
CD15	-	-	+	+	-	-
CD11b	-	-	-	+	+	+
CD14	-	-	-	+	+	+
CD11c	-	-	-	-	+	+
CD68	-	-	-	+	+	+

Общими миелоидными называют антигены, присутствующие на всех стадиях дифференцировки клеток миелоидного ряда. В действительности это распространяется только на клетки гранулоцитарной и моноцитарной линий, да и то с некоторыми ограничениями. Панмиелоидных маркеров в истинном смысле этого понятия не существует. Наиболее распространенными и широко применяемыми для подтверждения миелоидной (гранулоцитарной и моноцитарной) природы лейкоза являются антигены кластеров CD13 и CD33, несколько реже используется CDw65. Оценка этих трех маркеров позволяет подтвердить миелоидную природу бластных клеток в 98% случаев ОМЛ у детей [5].

CD13. Согласно лейкоцитарным кластерам дифференцировки наименование CD13 соответствует аминокислоте N. Это мембраносвязанная металлопротеаза, участвующая в метаболизме пептидов различными типами клеток, включая макрофаги, гранулоциты и некоторые негемопоезические клетки. Антиген присутствует на всех стадиях дифференцировки гранулоцитарных и моноцитарных клеток, начиная с гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ), а также в 60% случаев ОМЛ. Молекула CD13 отсутствует на лимфоидных Т- и В-клетках. Существует связь между уровнями экспрессии CD13 и активностью миелопероксидазы. Экспрессия CD13 в ходе дифференцировки гемопоезических клеток схематично представлена на рис. 2.10.

Другим широко распространенным общемиелоидным маркером является молекула CD33 — мембранный гликопротеин с молекулярной массой 67 кДа. Экспрессия CD33 ограничена клетками миелоидного ряда. Антиген присутствует на мультипотентных предшественниках (КОЕ-ГЭММ) и ранних эритроидных предшественниках (БОЕ-Э), а также практически на всех КОЕ-ГМ, рис. 2.11. Молекула CD33 слабо экспрессируется на зрелых гранулоцитах. На клетках ОМЛ CD33 присутствует в 85% случаев.

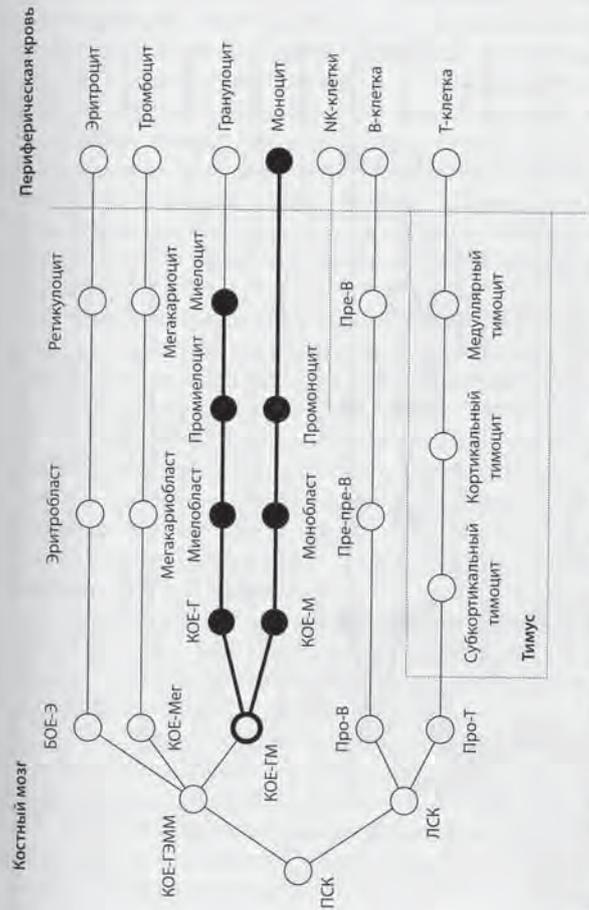


Рис. 2.10. Экспрессия антигена CD13 в ходе нормальной дифференцировки гемопоезических клеток

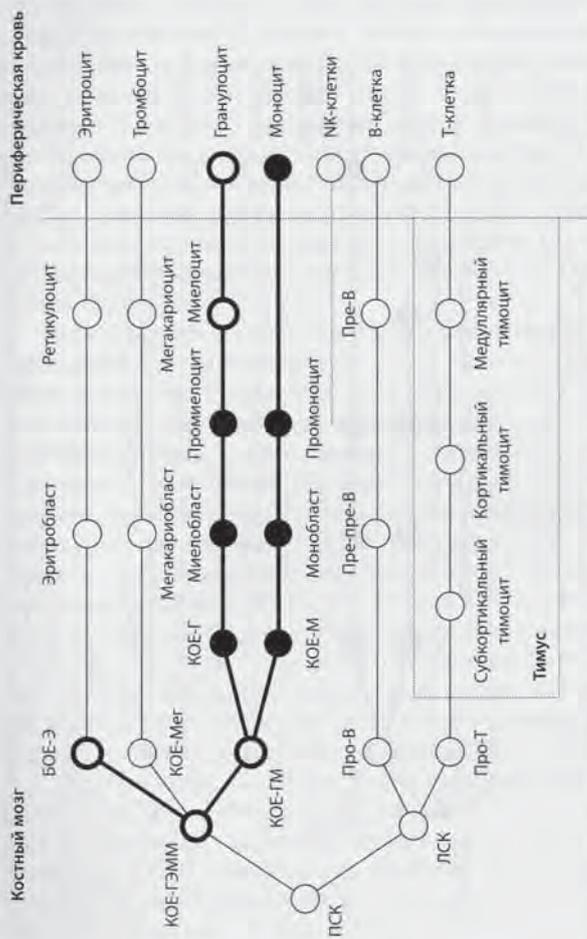


Рис. 2.11. Экспрессия антигена CD33 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

Моноклональные антитела к **CDw65** распознают фукоганглиозид (церамид-додекасахарид), который экспрессирован на колониеобразующих клетках, гранулоцитах; гетерогенно — на моноцитах, а также в большинстве случаев ОМЛ. Этот антиген характеризуется высокой специфичностью для клеток миелоидного ряда и рекомендован к использованию при диагностике острых лейкозов [7]. В исследовании, посвященном оценке клинического значения 15 иммунологических маркеров при ОМЛ у детей в условиях терапии по протоколу AML-BFM 87, CDw65 являлся единственным мембранным антигеном, экспрессия которого была связана с большей частотой полных ремиссий ( $p = 0,004$ ) [5].

Стадиеспецифичные маркеры ОМЛ — это антигены, которые появляются или исчезают по мере дифференцировки миелоидных клеток. Наиболее известными являются антигены CD34, CD11b, CD14, CD15.

Стволовклеточный антиген **CD34** экспрессирован только на незрелых гемопоэтических предшественниках и отсутствует на морфологически распознаваемых элементах миелоидного ряда. В нормальном костном мозге 1,5% мононуклеарных клеток имеют на мембране CD34. Практически все колониеобразующие клетки находятся в пределах CD34<sup>+</sup>-популяции: унипотентные (БОЕ-Э, КОЕ-ГМ, КОЕ-Мега, КОЕ-Эоз) и мультипотентные (КОЕ — смешанные или КОЕ-ГЭММ, пре-КОЕ, КОЕ-бластные).

При ОМЛ у детей экспрессия CD34 наблюдается в 45% случаев (Sperling et al., 1995). Наличие CD34 чаще отмечено при вариантах M1/M2 с коэкспрессией CD7 или TdT. Данные относительно неблагоприятной прогностической роли CD34 при ОМЛ у детей не подтверждены при лечении по протоколу AML-BFM 87 [5].

Антигены CD11b, CD14, CD15 в отличие от CD34 появляются, напротив, на более поздних этапах дифференцировки клеток миелоидного ряда.

**CD15** — это углеводный антиген лакто-N-фукопентаоза III. CD15 принято считать маркером преимущественно гранулоцитарного ряда. В норме антиген экспрессируется на промиелоцитах на более поздних этапах дифференцировки гранулоцитов (рис. 2.12). Клетки этой линии, находящиеся на ранних этапах созревания, характеризуются непостоянством экспрессии антигена (чаще отсутствует). Вместе с тем, при ОМЛ у детей CD15 выявляется с высокой частотой и служит дополнительным маркером при определении линейной принадлежности и степени зрелости миелобластов. CD15 отсутствует на моноцитах, но выявляется на монобластах, что не позволяет использовать его для дифференциальной диагностики гранулоцитарных и монобластных лейкозов.

**CD11b** является рецептором для C3b<sub>i</sub>-компонента комплемента. Так же как и CD15, он появляется довольно поздно в ряду миелоидной дифференцировки (рис. 2.13) и используется для уточнения стадии зрелости бластных клеток ОМЛ. Отличие от CD15 заключается в экспрессии антигена на моноцитах, макрофагах, NK-клетках.

Молекула **CD14** — это рецептор для липополисахарида — одноцепочечный мембранный гликопротеид, связанный с фосфоинозитолом, молекулярная масса 55 кДа. В нормальной дифференцировке CD14 является маркером, преимущественно ассоциированным с клеточными элементами моноцитарной линии на поздних этапах дифференцировки (промоноциты, моноциты, гистиоциты/макрофаги) (рис. 2.14). Это хороший дополнительный маркер монобластных лейкозов (M4, M5 по FAB). Однако при ОМЛ в ряде случаев имеет место экспрессия антигена при гранулоцитарных лейкозах, что несколько ограничивает дифференциально-диагностические возможности антигена и подтверждает целесообразность его использования лишь в сочетании с морфоцитохимическим исследованием.

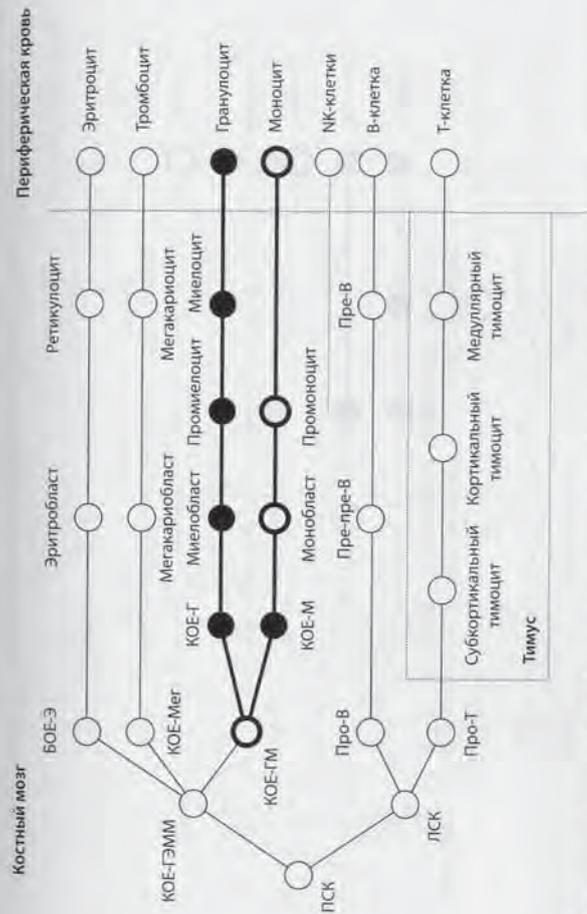


Рис. 2.12. Экспрессия антигена CD15 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

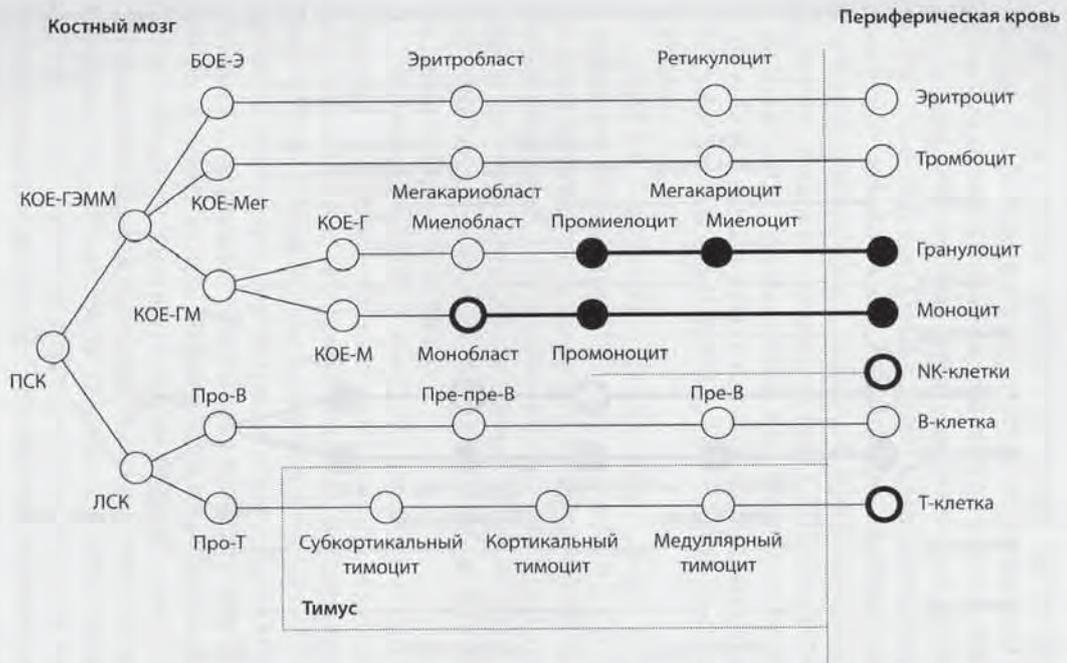


Рис. 2.13. Экспрессия антигена CD11b в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

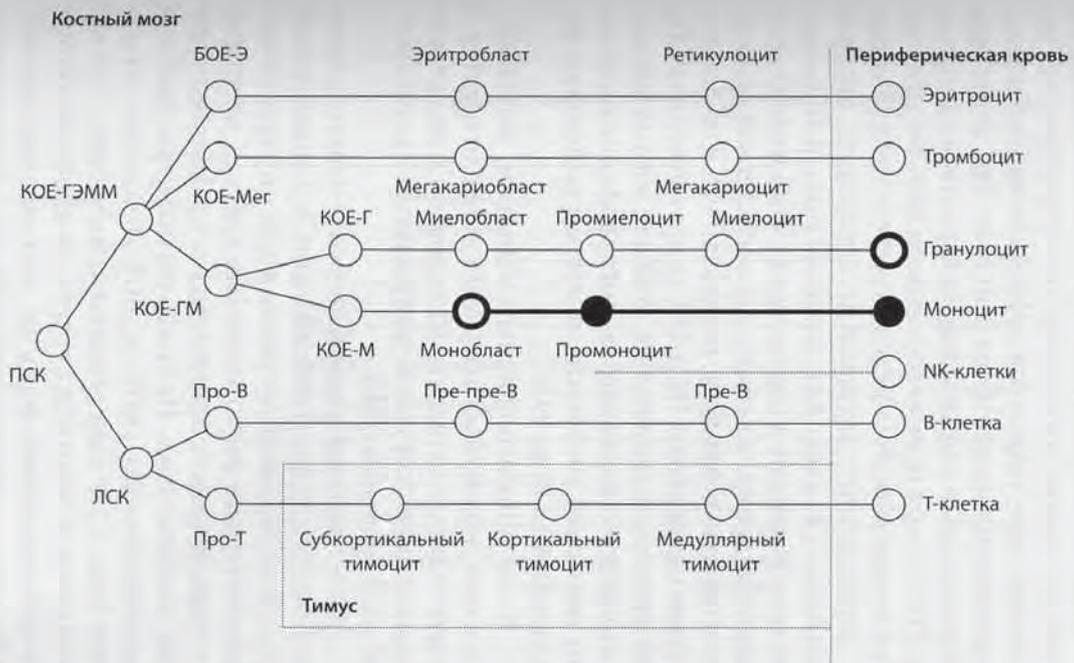


Рис. 2.14. Экспрессия антигена CD14 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

Согласно нашим данным и данным других исследователей, на основании иммунофенотипа бластных клеток невозможно установить варианты М1–М5 ОМЛ в соответствии с FAB-классификацией. Одной из причин этого является отсутствие точного соответствия процессов дифференцировки миелоидных клеток в норме и при лейкозах. Так, например, для нормальных промиелоцитов характерна экспрессия CD15, а при промиелоцитарном лейкозе этот антиген обнаруживается редко. Вместе с тем существуют определенные антигенные сочетания, которые достаточно типичны для монобластных и миеломонобластных лейкозов (экспрессия CD14) в отличие от гранулоцитарных, а кроме того, характерной особенностью варианта М3 является практически полное отсутствие мембранных HLA-DR на промиелоцитах. По этим причинам дополнение стандартного морфоцитохимического исследования иммунофенотипированием повышает воспроизводимость диагностики вариантов ОМЛ с 89 до 99%.

К линейноспецифичным маркерам, используемым в иммунодиагностике ОМЛ у детей, относятся, в первую очередь, антигены, на основании экспрессии которых диагностируются эритроидный и мегакариобластный варианты ОМЛ.

Единственный специфический маркер клеток эритроидного ряда — **гликофорин А**. Гликофорин А является сиалогликопротеином и присутствует на всех морфологически распознаваемых клетках эритроидного ряда, начиная с эритробластов и заканчивая зрелыми эритроцитами. На унипотентных эритроидных предшественниках (КОЕ-Э, БОЕ-Э) антиген отсутствует (рис. 2.15). При лейкозах гликофорин А может выявляться на бластных клетках, не имеющих типичной эритроидной морфологии, что позволяет устанавливать в этих случаях вариант М6. Экспрессия других дифференцировочных антигенов при эритробластном лейкозе может быть весьма вариабельной и не влияет на установление диагноза. Так, при эритробластном

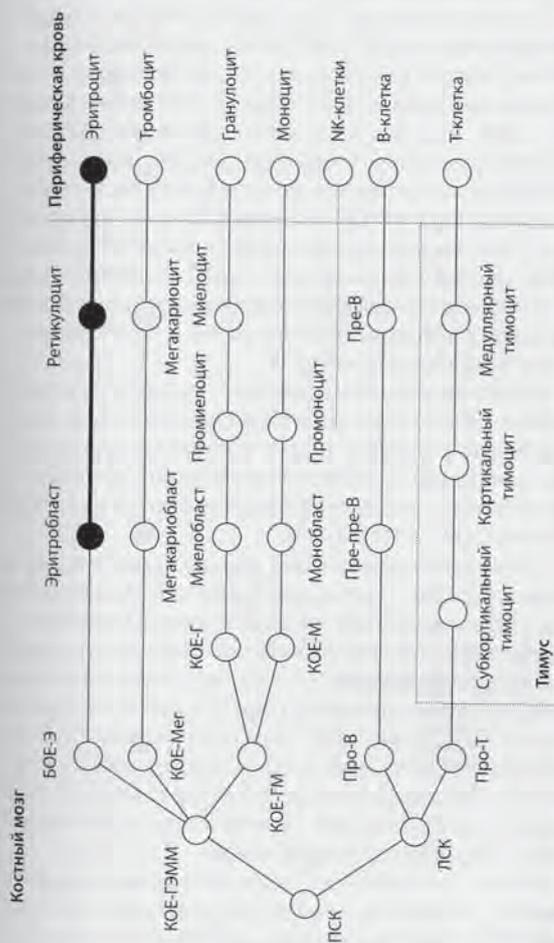


Рис. 2.15. Экспрессия антигена гликофорина А в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

лейкозе обнаруживаются антигены стволовых клеток и коммитированных предшественников (CD34, CD13, CD33, HLA-DR, CD38, CD71, CD7).

Следует отметить, что экспрессия гликофорина А при вариантах М1–М5 ОМЛ у детей представляет чрезвычайную редкость и в наших исследованиях при использовании отечественных моноклональных антител НАЕ-3 не наблюдалась. Гликофорин А является одним из немногих линейно-рестриктированных антигенов и представляет большую ценность в иммунодиагностике ОМЛ. Дополнительным маркером клеток эритроидного ряда является антиген эритробластов, который появляется раньше гликофорина А в ряду эритроидной дифференцировки, отсутствует на эритроцитах и может быть определен с помощью моноклональных антител НАЕ-9.

Мегакариобластные лейкозы, так же как и эритроидные, относятся к редким вариантам ОМЛ у детей и в большинстве случаев не могут быть установлены на основании морфоцитохимических критериев. Для подтверждения диагноза используются антитела кластеров CD41, CD42, CD61.

Наиболее специфичный маркер тромбоцитов и мегакариобластов — комплекс gpIIb/IIIa. Он является цитоадгезином, состоит из двух полипептидных цепей интегринового суперсемейства. Моноклональные антитела, распознающие  $\beta$ 3-цепь интегринов ( $\beta$ -цепь витронектинового рецептора, gpIIIa), сгруппированы в кластер CD61 (рис. 2.16). Моноклональные антитела, распознающие  $\alpha$ -цепь gpIIb, сгруппированы в кластер CD41. Моноклональные антитела кластера CD61 позволяют выявить самые ранние клетки, принадлежащие к мегакариоцитарной линии.

Одним из наиболее сложных диагностических вопросов, решаемых иммунологическими методами при ОМЛ у детей, является установление варианта М0 (минимально дифференцированный миелобластный лейкоз). Критерии диагностики этого подварианта были сформулированы FAB-группой [4]. Этот

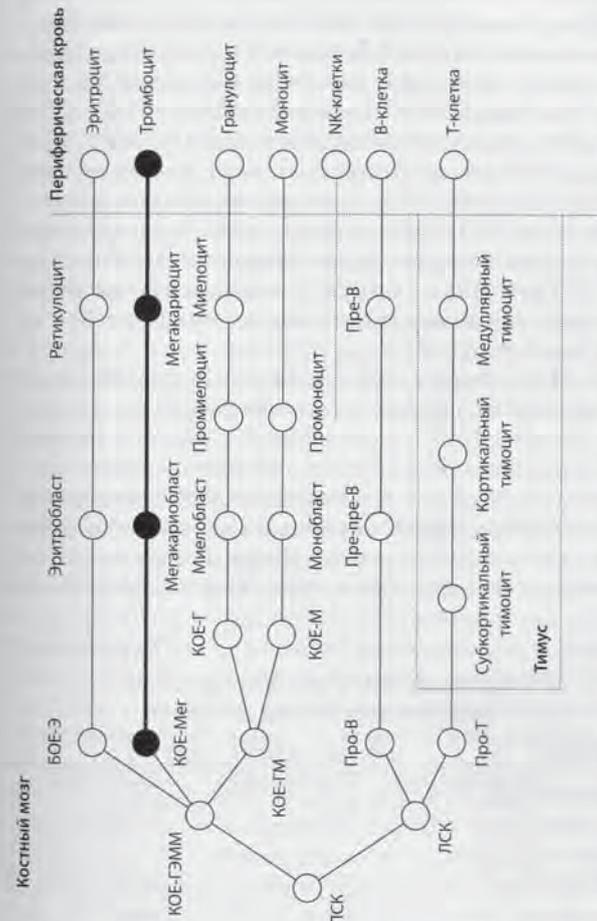


Рис. 2.16. Экспрессия антигенов CD61 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток

вариант устанавливается на основании трех основных признаков: 1) содержание бластов, выявляемых в реакции на миелопероксидазу, а также при окраске суданом черным Б невелико (менее 3%, а часто вообще отсутствует); 2) на клетках отсутствуют лимфоидные антигены (за исключением тех, которые в норме экспрессированы на миелоидных предшественниках, например CD7); 3) панмиелоидные (CD13, CD33, CDw65) или стадиеспецифичные (CD11b, CD15, CD14 и т.д.) маркеры подтверждают миелоидную природу бластных клеток. Важным диагностическим маркером для варианта M0 является миелопероксидаза, выявляемая с помощью моноклональных антител. При отсутствии данных иммунофенотипирования лейкозы этой группы могут быть ошибочно отнесены к вариантам L2, M6, M7.

При обнаружении на бластных клетках одновременной экспрессии антигенов различных гемопоэтических линий устанавливается диагноз бифенотипического или смешанно-линейного лейкоза [2]. В последние годы при установлении бифенотипических лейкозов (билинейных и редких тринейных) применяется система счета (табл. 2.8), основанная на диагностической ценности (в баллах) каждого маркера [6].

Таблица 2.8

**Система счета для диагностики бифенотипических лейкозов**

Баллы	Гемопоэтическая линия		
	В-лимфоидная	Т-лимфоидная	Миелоидная
2	CD79a (mb-1) CD22 су-IgM	CD3	MPO
1	CD19 CD10	CD2 CD5	CD13 CD33
0,5	TdT	TdT CD7	CD14, CD15 CD11b, CD11c

Принятые сокращения: су-IgM — цитоплазматический IgM; MPO — миелопероксидаза, выяв-

ляемая по энзиматической активности или с помощью моноклональных антител (Buccher et al., 1992); TdT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза.

Если сумма баллов для антигенов той или иной лимфоидной линии превышает 2 и сумма баллов для антигенов миелоидной линии превышает 2, то лейкоз считается бифенотипическим. Стандартных рекомендаций для лечения бифенотипических лейкозов не разработано.

Таким образом, в настоящее время иммунофенотипирование ОМЛ играет важную роль в уточнении диагноза, а также в установлении стадии зрелости лейкозных клеток.

Другим перспективным направлением иммунологических исследований при ОМЛ у детей является поиск маркеров и их комбинаций, которые имеют взаимосвязь с клиническим течением и прогнозом заболевания.

**Прогностическое значение иммунологических маркеров ОМЛ у детей**

Хотя единой, общепринятой иммуноклассификации ОМЛ не существует, многочисленные группы исследователей оценили значение мембранных антигенов миелобластов в прогнозе заболевания, и пришли к выводу о существовании связи экспрессии ряда маркеров с частотой достижения полных ремиссий, их продолжительностью, а также с общей продолжительностью заболевания (выживаемостью) у больных.

В клинике НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в середине 90-х годов прошлого века проведены исследования прогностической роли ряда антигенов, экспрессированных на клетках ОМЛ у детей [2]. Больные получали стандартное лечение цитарабином и рубомицином по схеме «7 + 3». Иммунофенотипическое исследование проведено у 72 детей. Использовали моноклональные антитела и антисыворотку к Т-клеточным марке-

рам (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), моноклональные антитела к  $\alpha$ -цепи LFA-1-антигена (ИКО-11), к  $\alpha$ -цепи CR3b1 (ИКО-ГМ1, CD11b), к CD15 (ИКО-Г2), к эритроидным антигенам (HAE-3 и HAE-9), к Thy-1-антигену (ИКО-10), к антигену недифференцированных бластов (ИКО-02), к HLA-DR-антигену (ИКО-1), а также к «общему» антигену (CD10).

Из числа перечисленных маркеров только  $\alpha$ -цепь LFA-1 имела связь с вариантом ОМЛ по FAB-классификации. При наличии антигена на бластах в 45,5% случаев установлены варианты М4 и М5, в то время как в антигеннегативной группе частота этих вариантов была в 10 раз ниже (4,8%;  $p = 0,038$ ).

При ОМЛ с экспрессией Т-клеточных антигенов отмечена достоверно большая частота полных ремиссий в сравнении с Т-негативными ОМЛ (86 и 44% соответственно;  $p = 0,01$ ) и большая продолжительность жизни больных (медианы выживаемости 21,6 и 11,5 мес.;  $p = 0,02$ ).

Противоположное влияние на прогноз оказывали миелоидные антигены. При наличии на мембране бластов CD11b и CD15 отмечена низкая частота полных ремиссий в сравнении с антиген-негативной группой ( $p = 0,0001$ ), аналогичное влияние миелоантигены оказывали и на выживаемость больных ( $p = 0,01$ ). При этом было установлено, что только маркер CD11b отрицательно влиял на прогноз, в то время как CD15 прогностического значения не имел.

За период 1991–1995 гг. лечение получили 32 ребенка. В клинике НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН лечение ОМЛ у детей осуществлялось по протоколу VFM 87 (в модификации). В целом результаты полихимиотерапии ОМЛ существенно улучшились: частота полных ремиссий возросла до 90,6%, 3-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) составила 54%. В условиях применения протокола mVFM 87 изменилось значение иммунологических факторов прогноза. Сохранилась благоприятная роль Т-клеточных антигенов и неблагоприятное

прогностическое значение экспрессии CD11b, однако различия с группами сравнения были менее выраженными. Определенную связь с результатами лечения имели В-клеточные и стволовые (CD34) антигены. Судить с полной достоверностью о значении экспрессии эритроидных маркеров на сегодняшний день сложно, так как эта группа больных (эритроидно-позитивных ОМЛ) немногочисленна. Однако создается впечатление, что при наличии эритроантигенов на бластных клетках прогноз несколько менее благоприятный.

В литературе нет единства мнений относительно роли иммунофенотипирования в оценке возможностей прогноза заболевания и индивидуализации полихимиотерапии. В одном из наиболее обширных и заслуживающих доверия исследований последнего времени роль большинства иммунологических маркеров в прогнозе ОМЛ у детей не была подтверждена [5]. Авторы установили достоверно более высокую частоту полных ремиссий при CDw65-позитивных ОМЛ, однако ни один из изученных маркеров не влиял на БСВ у больных. Заслуживает внимания установленная в многофакторном анализе близкая к достоверной ( $p = 0,06$ ) связь отсутствия CD14 с короткой БСВ детей с ОМЛ. Одним из важных выводов этой работы является обнаружение связи иммунофенотипа с кариотипом клеток ОМЛ и описание воспроизводимых иммуноцитогенетических характеристик для некоторых FAB-вариантов: М2 с палочками Ауэра, М3, М4 с эозинофилией. Наличие хромосомных aberrаций, типичных для этих вариантов —  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$ ,  $inv(16)$ , было связано с более длительной БСВ, что во многом определялось ответом на индукционную терапию. Для  $t(8;21)$  характерна экспрессия CD13 или CD34 при отсутствии маркеров моноцитарной линии (CD14 или CD4). Типичная для варианта М3 транслокация  $(15;17)$  связана с иммунофенотипом HLA-DR<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup> и CD13<sup>+</sup>. При М4 с эозинофилией/ $inv(16)$  отмечалась коэкспрессия моноцитарного маркера CD14 (или CD2) с антигенами CD34 или CD13.

Таким образом, общая тенденция в исследованиях ОМЛ детского возраста, наметившаяся в последние годы, заключается в комплексной, углубленной иммунофенотипической и цитогенетической характеристике бластных клеток во взаимосвязи с FAB-вариантом лейкоза. Применение подобного многофакторного подхода, учитывающего как биологические особенности миелобластов, так и клинические проявления заболевания, представляется наиболее перспективным для совершенствования терапии ОМЛ на основе индивидуальных факторов прогноза у больного ребенка.

#### Основная литература

1. *Тупицын Н.Н.* Иммунодиагностика гемобластозов. В кн.: «Клиническая онкогематология» / Под ред. М.А. Волковой. — М.: Медицина, 2001. — С. 124–145.
2. *Тупицын Н.Н.* Острые смешанно-линейные лейкозы человека // Гематол. и трансфузиол. — 1990. — №9. — С. 18–20.
3. *Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al.* // Brit. J. Haemat. — 1976. — Vol. 33. — P. 451–460.
4. *Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T.* // Brit. J. Haemat. — 1991. — Vol. 78. — P. 325–329.
5. *Creutzig U., Harbott J., Sperling C. et al.* // Blood. — 1995. — Vol. 86. — №8. — P. 3097–3108.
6. *Matutes E., Morilla R., Farahat N. et al.* // Haemat. — 1997. — Vol. 82. — P. 64–66.
7. *Rothe G., Schmitz G.* // Leukemia. — 1996. — Vol. 10. — P. 877–895.

## Глава 3

### Хромосомный анализ в диагностике и прогнозировании лейкозов у детей

*Е.В. Флейшман*

Для диагностики и прогнозирования лейкозов применяется комплекс клинических и лабораторных методов. Уже более 40 лет важную роль среди них играет хромосомный анализ. В клинике постоянно используются цитогенетические маркеры лейкозного клона, позволяя подтвердить или отвергнуть диагноз опухоли (лейкоза), когда это не удается сделать с помощью классических диагностических критериев. Обнаружение клона клеток с одинаковыми хромосомными или молекулярно-генетическими маркерами позволяет с уверенностью поставить диагноз опухоли и отвергнуть возможность другого патологического процесса, поскольку известно, что опухолевая популяция представляет собой потомство одной трансформированной клетки (клон) и характеризуется рядом общих хромосомных и, соответственно, молекулярных нарушений.

Необходимо подчеркнуть, что хромосомные изменения, характерные для опухоли, являются приобретенными, в отличие от врожденных изменений кариотипа — их можно обнаружить только в опухолевых клетках, а не во всех клетках организма. Следовательно, для выявления собственно опухолевых хромосомных изменений нужно исследовать именно ту ткань, в которой заподозрена малигнизация.

Таким образом, в клинике лейкозов основная работа цитогенетика сводится к обнаружению и характеристике опухолевого клона.

При дифференциальной диагностике гематологических новообразований используется следующий факт: гистогенетически близкие опухоли характеризуются сходными хромосомными аномалиями, а новообразования, происходящие из клеток разных тканей, отличаются друг от друга характером хромосомных нарушений.

Существует понятие *специфические изменения кариотипа*. К таковым относят хромосомные изменения, которые наблюдаются с высокой частотой (20–100%) при определенных морфологических формах новообразований; при других же типах опухоли такие аномалии вовсе не обнаруживаются или наблюдаются значительно реже. В настоящее время известно несколько сот специфических изменений кариотипа. Отметим, что при нескольких отдельных опухолях обнаружены специфические, характерные только для них хромосомные изменения, однако для большинства новообразований, в том числе лейкозов, специфические изменения кариотипа пока неизвестны, но имеются данные о спектре хромосомных аномалий, характерных для опухолей сходной морфологии. Например, спектр хромосомных нарушений при гемобластозах миелоидной природы отличается от такового при новообразованиях из лимфоидных клеток; для В-клеточных лимфом характерны иные хромосомные перестройки, чем для Т-клеточных. Подробнее о различных специфических хромосомных маркерах будет

рассказано в разделах, посвященных отдельным лейкозам.

Аномалии кариотипа принято подразделять на первичные и вторичные (дополнительные). Первичные — это те, которые обнаруживаются на ранних этапах развития опухоли и определяют ее становление. Специфические изменения кариотипа относятся к первичным. Вторичные нарушения возникают в ходе опухолевой прогрессии, позже первичных изменений. Они, как правило, тоже являются закономерными, повторяющимися (неслучайными). Их обнаружение может быть важно в прогностическом отношении. Усложнение кариотипа в ходе болезни (появление вторичных аномалий), так называемая клональная эволюция, свидетельствует о прогрессировании заболевания. Современная классификация ВОЗ рекомендует учитывать этот факт для прогнозирования лейкозов.

Необходимо отметить, что визуально (под микроскопом) первичные хромосомные аномалии, столь важные для уточнения диагноза, нередко могут быть гораздо менее заметны, чем вторичные изменения, особенно на поздних стадиях процесса. Выявлять эти скрытые или замаскированные специфические аномалии позволяют молекулярно-биологические методы исследования.

Каждый тип лейкозов, определяемый сегодня как нозологическая форма, при более подробном рассмотрении оказывается гетерогенной группой заболеваний, состоящей из более мелких подгрупп, различающихся по ряду признаков. Эти подгруппы, в свою очередь, неоднородны по биологическим особенностям лейкозных клеток. С клинической точки зрения особенно важна разная чувствительность к специфическим агентам, применяемым для лечения. В частности, каждая из морфологических групп (вариантов) острых лейкозов, выделяемых согласно современной классификации, распадается на подгруппы, различающиеся по особенностям кариотипа, и эти подгруппы

отличаются друг от друга по ответу на лечение — как по близким, так и по отдаленным результатам.

Подчеркнем, что данная глава является обзором литературы. Факты и выводы, важные для врачей, получены на протяжении последних лет огромной армией исследователей — экспериментаторов и клиницистов.

### 3.1. Цитогенетические термины

Каждая хромосома разделена центромерой (перетяжкой) на два плеча: короткое, которое по международной номенклатуре обозначают латинской буквой «р», и длинное — «q». Терминальные участки хромосомных плеч называют теломерными. При специальной окраске каждая хромосома приобретает свой индивидуальный рисунок, плечи хромосом выглядят поперечно исчерченными, в них видны светлые и темные полосы (bands) разной интенсивности. Эти полосы пронумерованы и объединены в районы (regions). Район может содержать несколько полос. При описании любого перестроенного участка используют четыре показателя: номер хромосомы, плечо, район, полоса. Например, 14q32 (область перестроек при В-клеточных ОЛЛ и лимфомах, место локализации гена тяжелых цепей иммуноглобулина) — длинное плечо хромосомы 14 и вторая полоса района 3.

Систематизация хромосом по парам и идентификация измененных хромосом в каждой отдельной клетке (метафазной пластинке) согласно общепринятой международной номенклатуре создает кариотип клетки. Нормальный мужской кариотип — 46,XY, нормальный женский — 46,XX.

Различают числовые и структурные изменения кариотипа.

**Числовые изменения:** увеличение числа или утрата целых хромосом. Среди числовых аномалий известны трисомии — появление целых добавоч-

ных хромосом, и моносомии — утрата целых хромосом.

Клетки с измененным числом хромосом называются анеуплоидными в отличие от диплоидных (нормальных клеток с 23 парами хромосом). Клетки с нормальным числом хромосом (46), но содержащие перестроенные хромосомы обозначаются как псевдодиплоидные. Клетки, число хромосом в которых увеличено, называют гипердиплоидными, уменьшено — гиподиплоидными. Увеличение числа хромосом в 1,5 раза и более приводит к образованию полиплоидных клеток: три-, тетра-, пентаплоидных и т.д.

**Структурные изменения:** транслокации (t) — перенос хромосомного участка, изменение его локализации; делеции (del) — утрата хромосомного материала или инверсии (inv) — поворот сегмента в пределах одной хромосомы на 180°. Транслокации могут быть сбалансированными и несбалансированными. При первых хромосомный материал не теряется; хромосомы обмениваются участками; при несбалансированных транслокациях происходит утрата части генетического материала. Делеции могут быть концевыми и интерстициальными. При первых происходит утрата терминальных районов хромосом, а при вторых выпадают (утрачиваются) участки хромосомного плеча между центромерой и теломерой. Перестроенные хромосомы называют маркерными.

### 3.2. Методики

При стандартном цитогенетическом анализе исследуются хромосомы, зафиксированные на стадии *метафазы* митоза. Обычно на цитогенетическом препарате видны отдельные интерфазные ядра и метафазные пластинки при полном отсутствии клеточных структур, позволяющих определить морфологию изучаемых клеток. Следовательно, проводя хромосомный анализ морфологически гетерогенной клеточной популяции, исследователь не может определить, из

какой именно клетки происходит каждая конкретная метафазная пластинка: например, из нормальной или из опухолевой, лимфоидной или миелоидной и т.д.

Методика приготовления препаратов включает в себя: 1) введение веществ (колхицин, колцемид, винбластин), останавливающих митозы на стадии метафазы; 2) гипотоническую обработку, после которой хромосомы лежат на стекле отдельно друг от друга; 3) фиксацию; 4) нанесение приготовленной суспензии на предметные стекла путем раскапывания. Затем проводят дифференциальное окрашивание, при котором каждая хромосома приобретает *индивидуальный рисунок*, позволяющий идентифицировать не только хромосомы, но и отдельные их участки.

В настоящее время наибольшее распространение приобрела так называемая методика G-banding (окраска на G-полосы, или G-окраска), при которой хромосомные препараты окрашивают по Гимзе (Giemsa) после предварительной обработки трипсином или другим веществом, позволяющим выявить поперечную исчерченность. Используются и другие методики.

В последние годы в клиническую практику все шире внедряются методы молекулярно-генетического исследования, главным образом, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Эти методы высокоспецифичны: они *не выявляют все изменения кариотипа*, а отвечают на конкретный вопрос об отсутствии или наличии аномалии, молекулярный зонд на которую применяется в каждом изучаемом случае. Полную характеристику кариотипа в пределах разрешающих возможностей светового микроскопа дает только стандартный хромосомный анализ.

**Полимеразная цепная реакция** основана на специфическом многократном копировании (амплификации) определенных участков ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Работа ведется не с цитогенетическими препаратами, а с ДНК или РНК, выделенными из клеток, которые необхо-

димо исследовать. Если в материале имеется участок ДНК, перестроенный в результате, например, хромосомной транслокации, это можно обнаружить, проведя ПЦР с использованием специальных молекулярных зондов — праймеров. Эти праймеры должны быть комплементарны ДНК, ограничивающей искомый участок с обеих сторон. Если клетки с искомой перестройкой присутствуют в материале, то проба, взятая для исследования, во время ПЦР обогащается *in vitro* именно той ДНК, праймеры к которой были использованы. Даже если клеток с искомой перестройкой очень мало, количество перестроенной ДНК в пробирке достигает определенной величины за счет многократного копирования (раундов полимеризации). Метод очень чувствителен: можно обнаружить клетки с аномалиями, даже если их количество не превышает 1 на  $10^4$ – $10^6$ .

**Флуоресцентная *in situ* гибридизация** позволяет метить и изучать конкретные участки ДНК (в том числе уникальные гены) и получать сведения о числовых и структурных перестройках кариотипа на хромосомных препаратах. В основе метода лежит способность однонитчатой ДНК связываться (гибридизоваться) с комплементарной ДНК. FISH может быть проведена только для тех участков ДНК, для которых уже разработаны молекулярные зонды. Методика имеет целый ряд преимуществ перед стандартным цитогенетическим анализом: результат получается быстрее, можно исследовать не только метафазные пластинки, но и интерфазные ядра (рис. 3.1). Однако метод требует гораздо более дорогого оборудования и реактивов, чем стандартный хромосомный анализ. Как было указано ранее, *FISH, в отличие от стандартного хромосомного анализа, не выявляет сразу все видимые изменения кариотипа, а отвечает на один конкретный вопрос*: имеется ли в исследуемом материале та или иная конкретная аномалия?

Интерфазный FISH-анализ позволяет за короткое время изучить сотни клеток. Метод быстро разви-

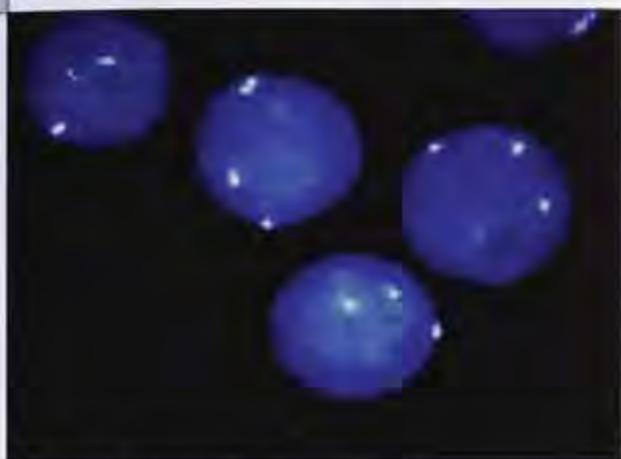


Рис. 3.1. FISH (интерфазный вариант). Обнаружение клонированных клеток с трисомией 8. Использован центромерный зонд хромосомы 8. В отличие от нормальных клеток, содержащих по два гомолога каждой пары, в клетках больного ОМЛ выявлено по три характерных сигнала

вается, совершенствуется, количество зондов растет. В настоящее время уже многие специфические хромосомные аномалии могут быть обнаружены с помощью FISH. Причем FISH можно проводить на клетках, окрашенных по Романовскому—Гимзе, или в сочетании с различными цитохимическими и иммунохимическими методиками. Это создает условия для изучения гистогенеза клеток, в которых произошли изменения кариотипа. В последние годы применяется многоцветная FISH, позволяющая увидеть большинство измененных хромосом в каждой клетке.

В хорошо оборудованных зарубежных лабораториях используется дорогостоящая установка для спектрального анализа хромосом — SKY (multicolor spectral karyotyping), в основе которой тоже лежит принцип FISH. Эта установка *позволяет увидеть весь кариотип*, причем *каждая хромосома окрашивается в свой цвет*. Использование SKY дает возможность

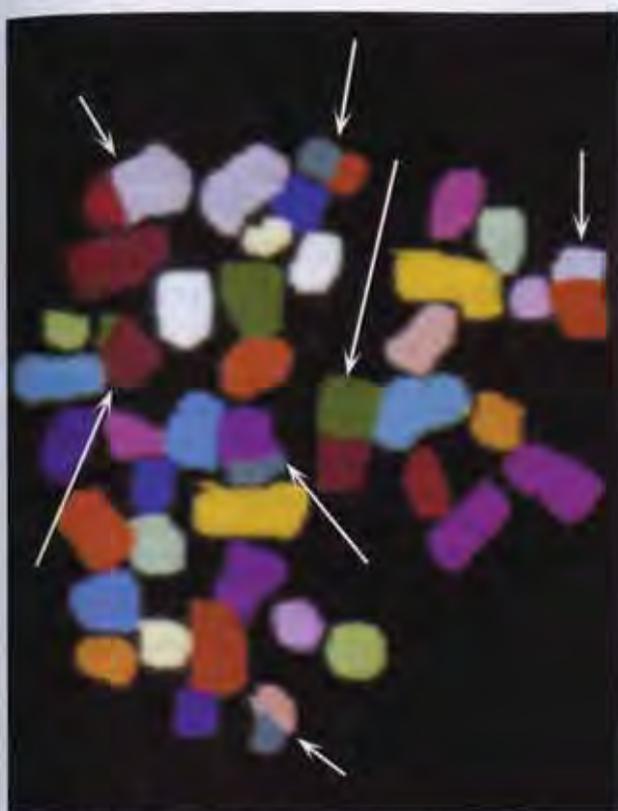


Рис. 3.2. Метод SKY. В метафазной пластинке из костного мозга больного ОМЛ каждая хромосома окрашена в свой цвет. Множественные маркеры, образовавшиеся в результате хромосомных транслокаций, выглядят двухцветными (указаны стрелками)

улавливать большинство транслокаций, поскольку маркеры, возникшие в результате обмена между хромосомами, окрашенными в разные цвета, состоят из разноцветных участков. Такие маркеры очень демонстративны, и при определенном опыте легко увидеть и понять, какие хромосомы приняли участие в их формировании (рис. 3.2). Существуют опухоли и лейкозы,

при которых происхождение маркерных хромосом невозможно установить без применения SKY или некоторых других модификаций FISH. Изредка возникают ситуации, когда надежную информацию о кариотипе можно получить лишь при сочетанном использовании перечисленных методических приемов.

### 3.3. Изменения кариотипа и малигнизация (краткие сведения)

Существуют неопровержимые доказательства ключевой роли приобретенных генетических изменений в малигнизации и прогрессии опухолей. Установлено, что решающую роль в возникновении и развитии новообразований играют *изменения генов*, продукты которых (белки) в норме осуществляют регулирование пролиферации и дифференцировки клеток. Условно выделяют две группы таких генов: *онкогены* и *гены-супрессоры злокачественности*. Первые — это структурно измененные гомологи нормальных клеточных генов (протоонкогенов). Измененные протоонкогены называют онкогенами.

При малигнизации происходит активация протоонкогенов — превращение их в онкогены. Это может быть следствием различных событий, в частности хромосомных перестроек. Онкогены участвуют в развитии опухолей по доминантному типу, т.е. изменение претерпевает один из двух аллелей. По другому принципу (рецессивному) участвуют в канцерогенезе гены-супрессоры злокачественности: для их инактивации необходимо выключение обоих аллелей. Как правило, один из аллелей утрачивается в результате делеции, а во втором наблюдается соматическая мутация.

В настоящее время хорошо известно, что в одних условиях ген может проявлять себя как онкоген, в другой ситуации этот же ген функционирует как опухоле-

вый супрессор, а следовательно, деление на онкогены и опухолевые супрессоры — условно.

Установлено, что продуктами большинства протоонкогенов являются так называемые транскрипционные факторы. Эти белки связывают специфические структуры ДНК, ответственные за регуляцию работы конкретных групп генов. Именно транскрипционные факторы определяют, какие белки продуцируются каждой клеткой, т.е. они контролируют все жизненно важные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку, старение и гибель клетки. В опухолевых клетках транскрипционные факторы изменены, в результате чего названные процессы нарушены. Роль различных генов при раке и лейкозах активно обсуждается.

Самыми частыми хромосомными аномалиями, характерными для лейкозов, являются **транслокации**. Различают два основных типа специфических хромосомных транслокаций. Первые приводят к активации протоонкогенов без изменения их структуры — при перемещении кодирующей области одного гена к регуляторному элементу другого гена. В результате транслокаций второго типа возникают совершенно новые, уникальные гены, образовавшиеся при слиянии фрагментов нормальных генов — это так называемые *химерные* или *слитные* гены (рис. 3.3 и 3.4). Нередко участниками специфических транслокаций являются протоонкогены или гены, кодирующие белки, важные для пролиферации и дифференцировки, в частности, транскрипционные факторы и протеинкиназы.

Примером аномалии первого типа является специфическая транслокация  $t(8;14)(q24;q32)$ , в результате которой происходит перемещение гена *MYC* из области 8q24, где он расположен в норме, в область гена тяжелых цепей иммуноглобулинов (14q32). Вследствие этого события нарушается регуляция продукции транскрипционного фактора, кодируемого геном *MYC*. При образовании второго типа химер-

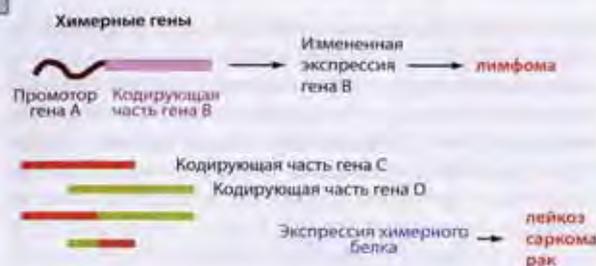


Рис. 3.3. Схематическое изображение двух типов химерных генов, образующихся в результате хромосомных транслокаций

ТРАНСЛОКАЦИИ	→	АКТИВАЦИЯ ПРОТООНКОГЕНОВ, ПРЕВРАЩЕНИЕ ИХ В ОНКОГЕНЫ
ДЕЛЕЦИИ	→	ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Рис. 3.4. Основные молекулярные последствия хромосомных перестроек

ных генов, как уже говорилось, наблюдается слияние кодирующих областей двух генов. Примером может служить, в частности, характерная для одного из вариантов острого лейкоза специфическая транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$ , при которой происходят разрывы в двух генах: *ETO* (хромосома 8) и *AML1* (хромосома 21). При слиянии образовавшихся фрагментов ДНК на хромосоме 8 образуется химерный ген, кодирующий новый химерный белок. Продукты этого гена — РНК и белок — можно обнаружить у всех больных с данной транслокацией. Аномалия характерна для

ОМЛ M2. *AML1* является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию целого ряда генов-мишеней, важных для пролиферации, дифференцировки и функционирования гемопоэтических клеток. В норме *AML1* экспрессируется в клетках всех линий кроветворения. Этот ген был изолирован из лейкозных клеток человека, несущих транслокацию  $t(8;21)(q22;q22)$ . В норме у человека транскрипционный фактор *AML1* образует комплекс с так называемым core binding factor  $\beta$  (CBF $\beta$ ). Последний вовлечен в одну из важных хромосомных перестроек, характерных для ОМЛ — инверсию хромосомы 16. Ген *AML1* участвует в трех повторяющихся транслокациях при лейкозах человека:  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(3;21)$ ,  $t(12;21)$ .

В настоящее время имеется описание нескольких родословных, в которых мутантный аллель гена *AML1* передается по аутосомно-доминантному типу. Причем, несмотря на разнообразие наблюдаемых мутаций, у пациентов отмечается ряд общих черт: это — тромбоцитопения с нарушениями функций тромбоцитов в сочетании с признаками миелодисплазии клеток костного мозга. В ряде случаев через несколько лет после обнаружения тромбоцитопении развивались ОМЛ. Синдром получил название FPD/AML (familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia). Интересно, что хромосомный анализ не обнаруживал перестроек хромосомы 21 при ОМЛ у носителей мутантного гена *AML1*. Обычно в таких случаях регистрировали утраты и делеции хромосом 5 или 7.

На основании многочисленных экспериментов был сделан вывод, что лейкемогенное действие химерных белков, включающих *Aml1*, прежде всего обусловлено блоком нормального *AML1*. Кроме известных транслокаций, вовлекающих ген *AML1*, при ОМЛ описаны субмикроскопические мутации в этом гене, причем последние наблюдаются не так уж и редко: их частота составляет 5–7% от всех ОМЛ с нормальным кариотипом.

Попытки инициировать в эксперименте лейкоэмическую трансформацию с помощью химерного гена *AML1-ETO* оказались безуспешными. На основании этих и других опытов был сделан вывод о том, что *онкогенный потенциал белка Aml1-Eto может быть проявлен только в кооперации с другими дополнительными мутациями.*

В многочисленных публикациях последних лет отражен большой опыт по индукции различных новообразований, в частности экспериментальных лейкозов и лимфом с помощью химерных белков, продуцируемых химерными генами. Эти эксперименты позволили прийти к заключению, что для злокачественной трансформации клеток только воздействия химерных белков *недостаточно.*

Следующая группа фактов, возможно, также свидетельствует в пользу этого заключения: в клетках крови здоровых людей нередко обнаруживают слитные (химерные) гены, про которые известно, что они ассоциированы с конкретными злокачественными новообразованиями: *BCR-ABL* (ХМЛ и один из вариантов ОМЛ), *MYC-IgH* (лимфома Беркитта и отдельные другие варианты лимфом), некоторые перестройки гена *MLL* (острые лейкозы, чаще — монобластные) и др. Причем высокочувствительная гнездная РТ-ПЦР выявляет слитный ген *BCR-ABL* у 30–50% здоровых взрослых людей. Однако уровень экспрессии названных химерных генов у здоровых людей обычно весьма низок и не нарастает. Пока нет систематизированных результатов длительного наблюдения за такими людьми. Принято считать, что для эффективной продукции опухолевого фенотипа слитный ген, возникший в результате фундаментальных ошибок репликации и репарации ДНК, должен обладать способностью продуцировать полноценный белок с онкогенным потенциалом и он должен сформироваться в ранних клетках-предшественницах, способных к самоподдержанию. Иными словами, возникновение специфического слитного гена в молодой клетке-

предшественнице может дать этой клетке селективные преимущества, в результате которых и происходит экспансия нового опухолевого клона. Возникновение слитного гена в относительно зрелых клетках очевидно является безвредным.

Здесь же следует коснуться еще одной группы фактов, свидетельствующих о роли различных генетических факторов в развитии лейкозов. Известно, что в ряде стран хранятся отпечатки пуповинной крови каждого жителя этой страны. Была предложена очень остроумная идея — посмотреть с помощью ПЦР, не было ли в пуповинной крови детей, заболевших лейкозами в возрасте от 2 до 12 лет, тех самых химерных генов, которые обнаружены у них при постановке диагноза? И действительно, в большинстве случаев это предположение подтвердилось: развитие лейкоза было ассоциировано именно с теми химерными генами, которые обнаружены в крови этих детей еще за несколько лет до диагноза лейкоза. Возникают вопросы: во-первых, почему лейкоз проявился не сразу, а лишь через несколько лет? Во-вторых, частота обнаружения лейкоз-специфических химерных генов в пуповинной крови и частота лейкозов у детей совпадают? Ответ на первый вопрос содержит предположение, что несколько лет понадобилось для того, чтобы клетки с химерными генами приобрели дополнительные мутации и стали родоначальниками лейкозного клона. Сбор информации для ответа на второй вопрос показал, что людей-носителей лейкоз-специфических химерных генов рождается во много раз больше, чем потом развивается лейкозов. Вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

*Клонирование точек разрыва и слияния хромосом при специфических хромосомных транслокациях — один из важных путей идентификации генов, вовлеченных в канцерогенез.* Сейчас идентифицировано нескольких десятков генов — продуктов различных транслокаций, наблюдаемых в злокачественных клетках при лейкозах, злокачественных лимфомах или со-

лидных опухолях. Однако механизмы возникновения транслокаций пока плохо изучены.

Активация протоонкогенов (продукция активных онкопротеинов) может осуществляться не только за счет хромосомных транслокаций, но и другими путями.

В настоящее время не вызывает сомнения постулат: *опухоль возникает в результате многоступенчатого процесса накопления генетических изменений*. К последним относится не только активация проонкогенов, но и инактивация генов-супрессоров злокачественности.

Вторым по частоте видом типичных хромосомных перестроек при лейкозах после транслокаций являются **делеции**. Как уже говорилось выше, опыт показывает, что за неслучайными хромосомными делециями стоит, как правило, *инактивация генов-супрессоров злокачественности*. К настоящему времени идентифицировано около 20 таких генов. Многие из них кодируют транскрипционные факторы. Многолетнее изучение характерных для лейкозов делеций длинного плеча хромосом 5 и 7 пока не привело к идентификации новых генов-супрессоров.

### 3.4. Острые лимфобластные лейкозы

Этот тип лейкоза гораздо чаще встречается у детей, чем у взрослых. Среди взрослых пациентов большинство составляют лица молодого возраста. У детей преобладают именно ОЛЛ, в то время как для взрослых более характерны ОМЛ. Мальчики болеют чаще девочек.

Цитогенетические изменения регистрируются примерно в 80% случаев и могут быть полезными для уточнения диагноза и для прогнозирования ответа на проводимую терапию.

С помощью современных программ лечения ОЛЛ полные ремиссии удается получить у 95–98%

больных, 5-летняя БРВ наблюдается более чем в 80% случаев. Одной из причин повышения эффективности терапии явилось усовершенствование лечебных схем в соответствии с разделением больных на так называемые группы риска, при формировании которых нередко используются и результаты хромосомного анализа.

Остановимся на основных хромосомных нарушениях при ОЛЛ. Опубликованы данные о нескольких тысячах случаев с измененным кариотипом, примерно в половине этих случаев обнаружены гипердиплоидные клоны.

*Гипердиплоидные лейкозы*, в свою очередь, подразделяются на следующие подгруппы: с высокой гипердиплоидией — 51–67 хромосом, низкой гипердиплоидией — 47–50 хромосом, и значительно реже — с околотри- или околотетраплоидией.

Частота случаев с высокой гипердиплоидией составляет примерно 30% от всех ОЛЛ.

Для этого варианта характерен хороший ответ на лечение: 5-летняя БРВ превышает 80%. Однако прогноз хуже, если в клетках лейкозного клона содержится по 51–55 хромосом, чем если это число составляет 56–67 (5-летняя БСВ — 72 и 86% соответственно).

Клоны клеток с высокой гипердиплоидией характеризуются трисомиями в определенных хромосомных парах: 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 и X.

Хороший прогноз ассоциирован с определенными трисомиями: 4, 10, 17 и 18. Есть наблюдения, что трисомия 5 в гипердиплоидном кариотипе свидетельствует о менее благоприятном прогнозе.

В 2003 г. опубликованы результаты сопоставления ответа на лечение с особенностями кариотипа у 700 детей с ОЛЛ с высокогипердиплоидными клонами. Многофакторный анализ этого огромного материала позволил прийти к выводу, что независимыми индикаторами прогноза являются трисомии 4 и 18, а также пол и возраст пациентов: девочки в возрасте от 1 года до 9 лет с трисомиями 4 и 18 имели 5-летнюю

выживаемость 96%; подгруппу наиболее высокого риска с 5-летней выживаемостью 50% составили мальчики старше 9 лет (независимо от конкретных трисомий) и мальчики в возрасте от 1 года до 9 лет без трисомии 18.

Высокая гипердиплоидия, как правило, ассоциирована с другими благоприятными факторами прогноза: возраст от старше 1 года до младше 10 лет, невысокий уровень лейкоцитов в крови, пре-В иммунофенотип.

Результаты, полученные некоторыми исследователями, свидетельствуют о том, что благоприятное прогностическое значение высокой гипердиплоидии утрачивается, если в клетках лейкозного клона обнаруживаются структурные перестройки, например, 6q-, i(17q), 9p-, 12p-, маркеры, приводящие к трисомии района 1q25-q31. Не все авторы подтверждают это наблюдение. В частности, в упоминаемой выше работе 2003 г. не подтверждено ухудшение эффекта лечения у больных с маркером i(17q) в клонах с высокой гипердиплоидией. Случаи с транслокациями эти авторы из анализа исключили, поэтому они не считают возможным делать вывод о том, влияют ли определенные транслокации (столь редкие в высокогипердиплоидных клонах) на прогноз при сочетании их с высокой гипердиплоидией. Этот вопрос может быть решен только после проведения больших многоцентровых исследований.

Отсутствует единое мнение о прогностическом значении обнаружения околотетраплоидных клонов клеток, которые сравнительно редко наблюдаются при ОЛЛ.

Обнаружение клеток с высокой гипердиплоидией позволяет надеяться на хороший эффект лечения и, соответственно, на длительное безрецидивное течение заболевания и даже полное излечение практически всех больных этой группы.

Обнаружение *гиподиплоидных* клонов определяет плохой прогноз: только 30% больных остается в жи-

вых по истечении двух лет от момента постановки диагноза.

Примерно в 2–3% случаев ОЛЛ обнаружены так называемые *окологаплоидные* клоны, в которых утрачены многие хромосомы и осталось лишь по 33–29 хромосом на клетку, т.е. вместо большинства хромосомных пар остается по одному гомологу; по два гомолога сохранено только в 10, 14, 18 и 21-й парах. Лейкозы с окологаплоидным кариотипом прогностически крайне неблагоприятны: медиана выживаемости составляет около 11 мес. Такие лейкозы относят в группу высокого риска.

В ряде случаев лейкозная популяция замещается гипердиплоидными клетками за счет удвоения числа хромосом окологаплоидного набора (*полиплоидизации*). Вопрос о прогнозе у таких пациентов остается спорным. Однако есть клинические данные, позволяющие относить эти случаи в группу более благоприятного прогноза, чем окологаплоидные лейкозы.

Учитывая большие различия в прогностическом значении гаплоидных и высокогипердиплоидных клонов, каждый случай ОЛЛ, в котором обнаружен клон клеток с числом хромосом близким к 50, необходимо тщательно исследовать для ответа на вопрос, является ли выявленный клон высокогипердиплоидным или в клеточной популяции присутствуют два клона — гаплоидный и гипердиплоидный, возникший при его полиплоидизации. Первый вариант — прогностически благоприятен, второй — имеет гораздо худший прогноз.

Нередко клетки гиподиплоидных клонов при ОЛЛ содержат по 45 хромосом; прогноз обычно оценивают как «промежуточный», но он зависит от характера структурных и/или числовых изменений в лейкозных клетках. Например, моносомия 7 прогностически неблагоприятна.

Вместо определения плоидности лейкозных клеток, в клинической практике используют так называ-

емый ДНК-индекс, т.е. соотношение количества ДНК в лейкозных и нормальных клетках, определяемое методом проточной флуориметрии. Цифры более 1,16 соответствуют содержанию более 50 хромосом на одну лейкемическую клетку. Такие величины имеют весьма благоприятное прогностическое значение, независимо от возраста и инициального лейкоцитоза: 4-летняя БРВ составляет 90%. Существует точка зрения, что определение ДНК-индекса технически выполнить гораздо легче, чем хромосомный анализ, а прогностическое значение этих тестов сопоставимо.

Самые известные специфические аномалии при ОЛЛ представлены в табл. 3.1. Их частота вычислена S. Heim, F. Mitelman на большом сводном материале, почерпнутом из публикаций разных авторов.

В табл. 3.1 приведены усредненные данные, без учета возрастных и географических различий. Видно, что большинство повторяющихся (неслучайных) аномалий наблюдаются редко, а также показана значительная цитогенетическая гетерогенность ОЛЛ.

Более новые данные, полученные британскими исследователями при изучении частоты структурных хромосомных изменений при ОЛЛ у детей (1366 случаев с измененным кариотипом), представлены в табл. 3.2.

Остановимся на отдельных хромосомных аномалиях, характерных для ОЛЛ.

**Транслокация t(9;22)(q34;q11)** известна как хромосомная перестройка, специфичная для ХМЛ. Эта аномалия называется Ph-транслокацией, поскольку маркер, характерный для ХМЛ — укороченная хромосома группы G, был открыт американскими исследователями P.C. Nowell и D.A. Hungerford в городе Филадельфии в 1960 г. и в честь этого города назван филадельфийской хромосомой. После того как в 1973 г. выдающаяся американская исследовательница Janet Rowley установила, что происходит не делеция хромосомы 22, а транслокация между хромосомами 9 и 22, транслокацию тоже называют фила-

Таблица 3.1  
Основные повторяющиеся хромосомные перестройки, характерные для ОЛЛ

Аномалии	Частота, %	Аномалии	Частота, %
(1;11)(p32;q23)	<1	t(8;14)(q24;q11)	1-2
(1;14)(p32-34;q11)	<1	(8;22)(q24;q11)	1-2
dup(1)(q12-21q31-32)	<1	+8	1-2
t(2;8)(p12;q24)	<1	i(9q)	1-2
i(6p)	<1	t/dic(9;12)(p11-12;p11-12)	1-2
dic(7;9)(p11-13;p11)	<1	t(11;14)(p13;q11)	1-2
t(7;14)(p15;q32)	<1	t(11;19)(q23;p13)	1-2
t(10;14)(q24;q11)	<1	del(12)(p11-12)	1-2
t(12;17)(p12-13;q12)	<1	del(9)(p21-22)	4
(14;22)(q32;q11)	<1	t(1;19)(q23;p13)	6
-20	<1	t(8;14)(q24;q32)	6
+21	<1	del(6q)	9
-Y	<1	t(4;11)(q21;q23)	10
i(7q)	1-2	t(9;22)(q34;q11)	18
t(17q)	1-2		

дельфийской, хотя она была открыта в городе Чикаго. Эта хромосомная аномалия характерна не только для ХМЛ, но выявляется и при отдельном субварианте ОЛЛ и чрезвычайно важна в прогностическом отношении.

Таблица 3.2

**Структурные аномалии кариотипа,  
характерные для ОЛЛ  
(по данным UKALL XI 1990–1997)**

Структурные изменения	Количество наблюдений, абс. (%)
t(4;11)(q21;q23)	15 (1)
t(9;22)(q34;q11)	25 (2)
t(1;19)(q23;p13)	47 (3)
Район 8q24	5 (<1)
Район 14q32	15 (1)
TCR ген	57 (3)
Разные изменения района 11q23	34 (2)
Аномалии 9(p)	97 (6)
Аномалии 6(q)	112 (7)
Другие перестройки	683 (41)
Без структурных аномалий	276 (17)

Частота транслокации t(9;22) экспоненциально нарастает с возрастом, она наблюдается у 20–40% взрослых и у 3–5% детей с ОЛЛ.

Лейкозный клон при Ph-положительном ОЛЛ представлен потомками В-клеточных коммитированных предшественников, в то время как при ХМЛ лейкозный клон представляет собой потомство стволовых кроветворных клеток.

При исследовании до начала специфической терапии Ph-положительного ОЛЛ в большинстве случаев имеется ряд характерных признаков, неблагоприятных в прогностическом отношении: возраст старше 10 лет, высокий лейкоцитоз (>50 тыс.), L2-

вариант по FAB, нередко спленомегалия. У подавляющего большинства пациентов бласты имеют фенотип В-клеточных предшественников (CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>).

В отличие от ХМЛ, при котором в любой фазе болезни практически все клетки костного мозга содержат Ph-транслокацию, костный мозг при Ph-положительном остром лейкозе даже до начала лечения обычно содержит какое-то количество клеток без Ph-хромосомы (с нормальным кариотипом), а наступление ремиссии сопровождается уменьшением или полным исчезновением Ph-клона. Этот признак используется для дифференциальной диагностики между Ph-положительным ОЛЛ и бластным кризом ХМЛ.

В результате транслокации t(9;22)(q34;q11) происходит слияние фрагментов двух генов — протоонкогена ABL, расположенного на хромосоме 9, и гена BCR, локализованного на хромосоме 22, образуется химерный (гибридный) ген BCR-ABL. При Ph-положительном ОЛЛ примерно у 50% взрослых и у 20% детей разрывы в гене BCR такие же, как при ХМЛ. У остальных пациентов, т.е. у подавляющего большинства детей с Ph-положительным ОЛЛ, разрыв в хромосоме 22 (ген BCR) расположен ближе к центромере. Образующийся химерный белок — P190<sup>BCR/ABL</sup> обладает более высокой протеинкиназной активностью, чем характерный для ХМЛ белок P210<sup>BCR/ABL</sup>.

В 2006 г. получены данные о некоторых клинико-морфологических отличиях Ph-положительного ОЛЛ с продукцией белка P210<sup>BCR/ABL</sup> от ОЛЛ с химерным белком P190<sup>BCR/ABL</sup>. Для первого типа характерен более высокий лейкоцитоз и более частая экспрессия антигенов CD33 и CD34. Кроме того, лейкоз с химерным белком P190<sup>BCR/ABL</sup> прогностически более благоприятен, он характеризуется меньшей склонностью к рецидивам и лучшей выживаемостью больных после интенсивной химиотерапии с последующей ТГСК.

Сочетание различных молекулярно-генетических методик (FISH и ПЦР) позволяет выявить комплекс *BCR-ABL* чаще, чем хромосомный анализ, поскольку транслокация  $t(9;22)(q34;q11)$  не всегда видна при стандартном хромосомном анализе. В частности, транслокация может быть субмикроскопической, т.е. происходит обмен очень маленьких, не видимых под микроскопом фрагментов хромосом 9 и 22. У других пациентов наблюдается так называемая «замаскированная» транслокация  $t(9;22)(q34;q11)$ , т.е. происходят сложные структурные изменения кариотипа, скрывающие Ph-транслокацию.

Транслокация  $t(9;22)(q34;q11)$  — крайне неблагоприятный прогностический маркер: несмотря на то, что современные программы лечения позволяют получить ремиссии более чем у 90% детей при этой форме ОЛЛ, продолжительность их жизни очень короткая — медиана выживаемости не превышает 12 мес., 5-летняя БСВ еще недавно составляла 15–20%. Включение в терапевтический комплекс специфических ингибиторов тирозинкиназ и ТГСК существенно повысило этот показатель.

Этот вариант ОЛЛ относят в группу высокого риска, независимо от других клинико-гематологических особенностей или наличия дополнительных хромосомных изменений. Выявление таких больных имеет *жизненные показания*, поскольку у подавляющего большинства их есть шанс длительного безрецидивного выживания только после трансплантации костного мозга, проведенной во время первой ремиссии.

Ph-положительный ОЛЛ может иметь более благоприятный прогноз, если еще до лечения содержание лейкоцитов не повышено: у этих пациентов могут быть достигнуты стойкие длительные ремиссии без пересадки костного мозга, а с помощью интенсивной химиотерапии. Так, у пациентов этой группы, по данным Pui et al., еще в 1997 г. удалось благодаря интенсивной химиотерапии достигнуть более чем 70% БСВ.

Позже эти авторы пришли к выводу, что возможно, а, следовательно, и необходимо использовать ТГСК и у этой группы больных.

На протяжении нескольких последних лет ведется напряженная работа по повышению эффективности лечения Ph-положительного ОЛЛ. Эта работа уже принесла большие успехи. Так, с помощью новых протоколов интенсивной химиотерапии 5-летняя БРВ у детей с этим вариантом лейкоза увеличилась более чем в 2 раза по сравнению с историческим контролем. Существенную роль сыграли ингибиторы тирозинкиназ, из которых иматиниба мезилат (Гливек) начал применяться в клинике раньше других препаратов этой группы и позволил добиться полных ремиссий почти у всех больных, а за счет комбинирования разных доз иматиниба мезилата с химиопрепаратами удалось увеличить продолжительность ремиссии, что дало возможность проводить ТГСК у большего числа пациентов. Все эти шаги значительно повысили частоту длительных ремиссий при Ph-положительном ОЛЛ, однако лечение этой формы лейкоза все еще нуждается в усовершенствовании. Большую роль в контроле эффективности лечения играют молекулярные методы мониторинга минимальной остаточной болезни, поскольку имеется строгая корреляция между динамикой минимальной остаточной болезни и эффективностью лечения (см. ниже).

В заключение следует подчеркнуть, что ответ Ph-положительного ОЛЛ детей на современное химиотерапевтическое лечение сильно варьирует. Изредка бывает быстрый ответ, и именно у этих пациентов наблюдаются длительные стойкие ремиссии. У большинства пациентов ответ замедлен. У некоторых больных ремиссию получить не удастся. Если не произведена аллоТГСК, у подавляющего большинства пациентов развиваются рецидивы.

**Перестройки хромосомного района 11q23**, обычно затрагивающие ген *MLL*, значитель-

но чаще наблюдаются у детей, чем у взрослых, причем самая высокая частота зарегистрирована у детей в возрасте до 1 года: от 43 до 60%; на молекулярном уровне частота перестроек гена *MLL* у младенцев с ОЛЛ достигает 70–80%.

Название гена *MLL* связано с тем, что его изменения находят при гемобластозах как лимфоидного, так и миелоидного генеза — mixed lineage leukemia, myeloid-lymphoid leukemia. Изменения этого гена наблюдаются при самых разнообразных хромосомных перестройках — транслокациях, дупликациях, инверсиях, а также при разных лейкозах и миелодиспластическом синдроме.

Характерен высокий лейкоцитоз, часто про-В иммунофенотип, органомегалия и плохой прогноз. Одной из самых частых хромосомных транслокаций с вовлечением района 11q23 является транслокация t(4;11)(q21;q23).

**Транслокация t(4;11)(q21;q23)** обнаруживается при различных морфологических вариантах острого лейкоза. Чаще всего эта аномалия встречается при ОЛЛ и бифенотипических острых лейкозах, но наблюдается и при ОМЛ — преимущественно монобластных и миеломонобластных.

Транслокация приводит к образованию на хромосоме 4 химерного гена *MLL-AF4*, который выявляется с помощью методов ПЦР и FISH. Эта аномалия наиболее характерна для детей младше 1 года (более 50% от общего количества острых лейкозов), при лейкозах у младенцев до полугода она обнаруживается еще чаще, а у детей старше 1 года и у взрослых людей с ОЛЛ ее частота составляет 10–15%.

Прогноз — неблагоприятный. Наихудший прогноз отмечен у младенцев до полугода, позже — в возрасте от 1 года до 10 лет — прогноз значительно лучше, а после 10 лет он опять ухудшается, т.е. эффективность лечения ОЛЛ с транслокацией t(4;11) у детей в возрасте от 1 года до 9 лет значительно выше, чем у взрослых людей.

Известны транслокации района 11q23 более чем с 70 различными участками хромосом. Они встречаются с разной частотой. Например, транслокации t(4;11), t(9;11) и t(11;19) наблюдаются чаще, чем транслокации t(6;11), t(10;11).

Необходимо учитывать следующие важные моменты, касающиеся ОЛЛ с изменениями района 11q23:

1. Перестройки хромосомного района 11q23 в большинстве своем прогностически неблагоприятны; они обычно обнаруживаются в сочетании с другими показателями плохого прогноза: высоким лейкоцитозом, CD10-негативностью — и чаще наблюдаются у младенцев, чем у более старших детей. Причем при современном интенсивном лечении 5-летнего БСВ у младенцев с перестройками гена *MLL* составляет 33,6%, а без этих перестроек — 60,3%.

2. В ряде случаев эти перестройки являются субмикроскопическими, и их не удастся обнаружить при стандартном хромосомном анализе. Поскольку присутствие этих перестроек имеет неблагоприятное прогностическое значение, их выявление очень важно и требует применения молекулярно-генетических методов исследования. Кроме того, при отдельных транслокациях — t(9;11), t(6;11) и t(11;19) — происходит обмен небольшими фрагментами хромосом, и стандартный цитогенетический анализ позволяет обнаружить их только на препаратах высокого качества. Молекулярно-генетические методы (FISH и ПЦР) в этих случаях более информативны.

3. Цитогенетические изменения, выглядящие при световой микроскопии абсолютно идентичными, оказываются различными при использовании молекулярно-генетических методик. Установлено, в частности, что транслокации t(10;11)(p13;q23) и t(11;19)(q23;p13) могут затрагивать разные гены и обуславливать различия в чувствительности к химиопрепаратам.

Поскольку изменения гена *MLL*, как правило, имеют неблагоприятное прогностическое значение,

их выявление с помощью FISH и ПЦР настоятельно рекомендуется при ОЛЛ с нормальным кариотипом или при сложных структурных перестройках хромосом. В этих ситуациях можно обнаружить субмикроскопические транслокации, инсерции, дупликацию или амплификации гена *MLL*.

Стандартный цитогенетический анализ может оказаться неинформативным (не выявляющим клетки с хромосомными аномалиями) из-за низкого митотического потенциала лейкозных клеток. В таких случаях делаются главным образом нелейкозные (нормальные) клетки, и именно они «падают на глаза» цитогенетику и подвергаются хромосомному анализу. В гематологических клиниках, где методы FISH и ПЦР входят в рутинный диагностический набор, изменения гена *MLL* выявляются значительно чаще, чем там, где эти методики не используются.

**Транслокация  $t(12;21)(p13;q22)$**  — важная хромосомная перестройка, которая *не видна при обычном цитогенетическом исследовании*. Она характерна для В-клеточного лейкоза детей (25% случаев). Большинство больных этой группы составляют пациенты в возрасте 3–6 лет с CD10-позитивным пре-В-ОЛЛ и экспрессией миелоидных антигенов. Прогноз хороший: доля полных ремиссий приближается к 100%, 3-летняя выживаемость составляет 100%, однако изредка наблюдаются рецидивы.

При транслокации  $t(12;21)$  образуется химерный ген *TEL-AML1*, легко обнаруживаемый с помощью методов FISH и/или ПЦР (рис. 3.5).

Интересно, что нередко в лейкозных клетках с транслокацией  $t(12;21)$  наблюдается делеция гена *TEL* во втором гомологе хромосомы 12, не вовлеченном в транслокацию. Этот факт считают дополнительным свидетельством важного вклада гена *TEL* в лейкомогенез.

В 2006 г. опубликованы результаты большого проспективного исследования, проводившегося в Калифорнийском университете (США) для оценки ча-

стоты и прогностического значения транслокации  $t(12;21)$ . Эта работа подтвердила высокую эффективность современного лечения у изучавшейся группы детей с ОЛЛ. Так, общая 5-летняя выживаемость у *TEL/AML1*-позитивных пациентов составила 97%, а у негативных — 89%. В то же время авторы подчеркивают, что результаты многофакторного анализа не позволяют исключить влияния возраста и инициального лейкоцитоза на прогноз у этой подгруппы пациентов с ОЛЛ.

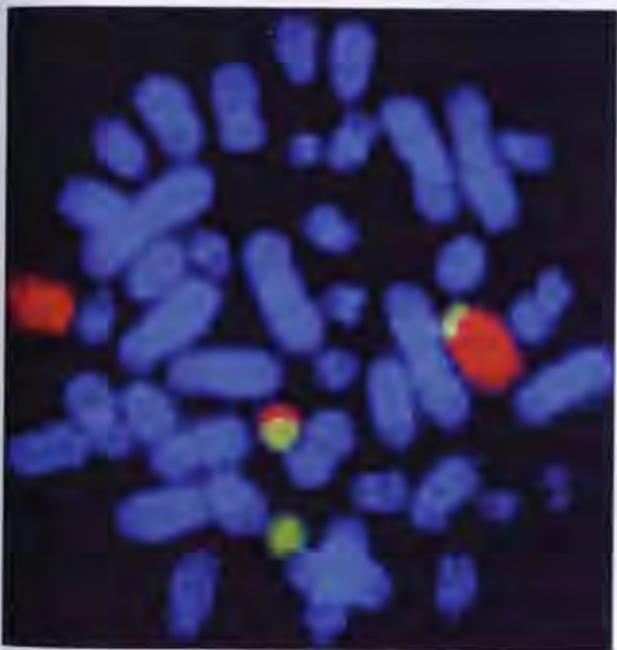


Рис. 3.5. Двухцветная FISH. Метафазная пластинка больного ОЛЛ с транслокацией  $t(12;21)$ , которую не удастся обнаружить с помощью стандартного хромосомного анализа. Хромосома 12 окрашена в красный цвет, хромосома 21 — в зеленый; видны двухцветные маркеры, возникшие в результате транслокации (Greaves, 2002)

**Транслокация t(1;19)(q23;p13)** ассоциирована с пре-В иммунофенотипом — blasts содержат внутриклеточный иммуноглобулин. Частота этой хромосомной аномалии составляет 2–5% от всех В-клеточных ОЛЛ у детей.

При транслокации образуется характерный слитный ген *E2A-PBX1* за счет соединения фрагментов двух генов — *E2A*, локализованного на хромосоме 1, и *PBX1*, локализованного на хромосоме 19. Продукт гена — химерный белок ответствен за арест дифференцировки лимфоидных клеток.

Наблюдаются два типа транслокации t(1;19)(q23;p13): сбалансированный и несбалансированный. При несбалансированном типе имеется только один маркер — дериват хромосомы 19, а дериват хромосомы 1 утрачивается.

Эта аномалия нередко ассоциирована с такими прогностически неблагоприятными симптомами, как значительный лейкоцитоз и отсутствие высокой гипердиплоидии.

Еще недавно сообщалось о неблагоприятном прогностическом значении транслокации t(1;19), однако применение новых программ лечения принесло существенные успехи не только в лечении ОЛЛ в целом, но и варианта, ассоциированного с данной транслокацией: БСВ составила 75–85%, без отличий между двумя цитогенетическими типами — сбалансированным и несбалансированным. Отчасти такой хороший эффект терапии объясняют высокой чувствительностью лейкозных клеток с транслокацией t(1;19) к большинству химиопрепаратов, применяемых для лечения ОЛЛ.

**Транслокация t(8;14)(q24;q32)**, а также варианты транслокации t(2;8)(p13;q24) и t(8;22)(q24;q11) характерны для лимфомы Беркитта (98–100% случаев) и ОЛЛ-L3.

При транслокации t(8;14)(q24;q32) происходит перемещение гена *MYC* из области 8q24 в область гена тяжелых цепей иммуноглобулинов (14q32). Вследствие

этого события нарушается регуляция продукции белка (транскрипционного фактора), кодируемого геном *MYC*. Хромосомная транслокация в данном случае приводит к дерегуляции функционирования генов, т.е. к нарушению нормальной связи между фазами клеточного цикла и продукцией белка *Myc*, что, в конечном счете, усиливает пролиферацию клеток и приводит к их малигнизации.

Ранее транслокацию (8;14) относили к прогностически неблагоприятным хромосомным аномалиям. Сейчас, с использованием новых протоколов терапии полные ремиссии получают у подавляющего большинства больных, а 3-летняя выживаемость составляет 74%.

**Делеции длинного плеча хромосомы 6 — del(6q)** обнаруживаются в 5–10% случаев ОЛЛ с нарушениями кариотипа. Локализация точки разрыва варьирует от случая к случаю. Отметим, что эти перестройки характерны для самых различных лимфо-пролиферативных заболеваний, а не только для ОЛЛ. Поскольку в большинстве случаев делеции перекрывают участок 6q21, высказано предположение, что в этой области локализован некий ген-супрессор злокачественности.

Делеции 6q обычно сочетаются с другими аномалиями хромосом, поэтому их расценивают как вторичные изменения, т.е. нарушения, ассоциированные с прогрессивной опухолью.

Перестройки короткого плеча хромосомы 9 при ОЛЛ у детей обнаруживают в 10% случаев; их частота несколько выше при Т-клеточном варианте.

При В-клеточных лейкозах эта аномалия прогностически неблагоприятна, т.е. она позволяет выделить подгруппу с повышенным риском неудачи лечения в группе стандартного риска.

Большая часть перестроек короткого плеча хромосомы 9 представлена делециями (9p-). Обычно утрачивается область, где локализованы гены *p16INK4A*, *p15INK4B*, *p14ARF*. Все эти три

гена участвуют в регуляции клеточного цикла. Изменения гена *p16INK4A* считают характерными для ОЛЛ: их находят в 80% Т-клеточных ОЛЛ и в 20% — В-клеточных. Гомозиготная делеция этого гена ассоциирована со значительным снижением БСВ при Т-ОЛЛ.

В-клеточные ОЛЛ отличаются от Т-клеточных по спектру хромосомных изменений. Так, для В-клеточных лейкозов характерны перестройки, затрагивающие локусы иммуноглобулиновых генов: гена тяжелых цепей иммуноглобулинов (14q32), легких цепей каппа (2p12) и лямбда (2q11).

В новообразованиях из Т-клеток нередко наблюдаются перестройки, затрагивающие гены Т-клеточных рецепторов (14q11, 7p15, 7q34), их находят при Т-ОЛЛ в 20% случаев.

Хромосомные изменения при Т-клеточных лейкозах обнаруживаются реже, чем при В-клеточных, а кроме того, они не имеют прогностического значения. В результате специфических транслокаций онкогены попадают в зону влияния регуляторных элементов генов Т-клеточных рецепторов, и повышается экспрессия продуктов этих генов, подобно тому, что происходит при В-лейкозах, когда онкогены попадают под влияние генов иммуноглобулинов.

**Транслокация t(1;14)(p33;q11)** встречается приблизительно в 3% случаев ОЛЛ и приводит к активации гена *TAL1*. Этот ген является транскрипционным фактором, без которого невозможен гемопоэз. В результате слияния с геном *TCRAD* при транслокации t(1;14)(p33;q11) этот ген активируется в химерном гене. Кроме того, активация гена *TAL1* происходит за счет скрытой интерстициальной делеции — *TALd*, приводящей к соединению гена *TAL1* с другим геном — *SI*. Такая активация гена *TAL1* обнаружена в 30% случаев ОЛЛ, а в целом частота активации гена *TAL1* при ОЛЛ выше — до 60%. Данные о прогностическом значении изменений гена *TAL1* противоречивы.

Известно также, что гены *TAL2*, *BHLHB1* и *LYL1* являются транскрипционными факторами. В результате транслокаций они формируют химерные гены с геном *TCR*.

Хромосомный анализ при ОЛЛ зарекомендовал себя как один из значимых объективных критериев, который вместе с другими клиническими и лабораторными показателями позволяет отнести каждого пациента в ту или иную прогностическую группу (табл. 3.3, рис. 3.6).

Таблица 3.3

**Пятилетняя БРВ при ОЛЛ у детей с различными хромосомными аномалиями (усредненные сводные данные)**

Аномалии	Доля больных с длительным безрецидивным течением, (%)
t(12;21)(p13;q22)	85–90
t(9;22)(q34;q11)	20–25
t(1;19)(q23;p13)	80
t(4;11)(q21;q23)	10
t(8;14)(q24;q32)	70
t(2;8)(q12;q24)	70
t(8;22)(q24;q11)	70
t(1;14)(p34;q11)	60

Отметим, что не все клиницисты используют одни и те же цитогенетические характеристики опухолевого клона для прогнозирования ОЛЛ. Многие авторы рекомендуют учитывать только плоидность, поскольку высокая гипердиплоидия ассоциирована с хорошим ответом на лечение, а гиподиплоидные клоны прогностически неблагоприятны; есть терапевтические программы, в которых критерием плохого прогноза служит только наличие или отсутствие

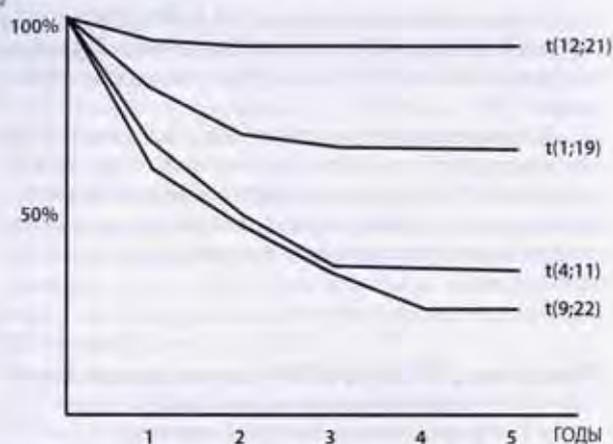


Рис. 3.6. Кривые выживаемости по Каллану—Майеру при ОЛЛ у детей с различными специфическими хромосомными транслокациями. Транслокация  $t(12;21)$  прогностически является более благоприятной, чем транслокация  $t(1;19)$ ,  $t(4;11)$ ,  $t(9;22)$  (F. Mitelman, 2003, личное сообщение)

хромосомных транслокаций  $t(4;11)$  и  $t(9;22)$ , а другие изменения кариотипа не принимаются во внимание. Данный вопрос все еще находится в стадии изучения (рис. 3.7).

Как уже говорилось ранее, прогнозирование лейкозов — нелегкая задача, решаемая путем комплексного исследования пациента, причем отдельные прогностические признаки нередко сочетаются у конкретных больных. Например, возраст пациентов с Т-клеточным ОЛЛ обычно выше, чем у пациентов с лейкозами из В-клеточных предшественников, и, возможно, этим объясняется, хотя бы отчасти, худший прогноз у старших больных. Другие примеры: 1) Rh-положительный ОЛЛ характерен для старших детей с исходно высоким лейкоцитозом, т.е. у этих больных сочетаются три прогностически неблагоприятных симптома; 2) лейкозы младенцев часто ха-

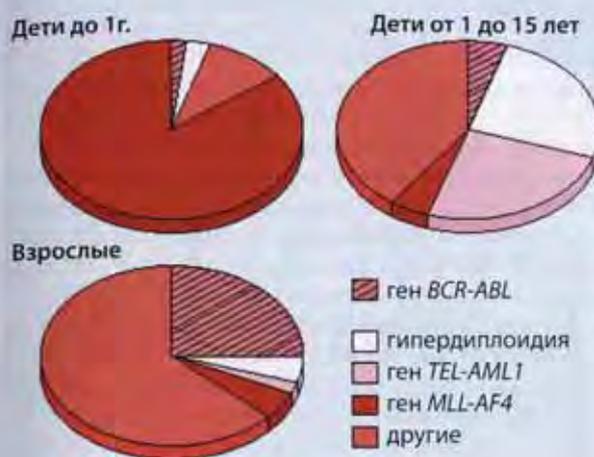


Рис. 3.7. Диаграммы, демонстрирующие возрастные различия в частоте специфических химерных генов при ОЛЛ (M. Greaves, 2002)

рактеризуются высоким лейкоцитозом и перестройками гена *MLL* — все показатели неблагоприятные. В табл. 3.4 приведены прогностически значимые факторы ОЛЛ у детей.

Факторы прогноза при ОМЛ у детей (Freidmann, 2000)

Фактор риска	Благоприятные	Неблагоприятные
Возраст	≥ 1 и ≤ 9 лет	< 1 или > 9 лет
Пол	Женский	Мужской
Раса	Кавказская, азиатская	Афроамериканская
Исходный лейкоцитоз	< 50 тыс. в 1 мм	> 50 тыс. в 1 мм
ДНК-индекс	> 1,6	≤ 1,6
Число хромосом	> 50	< 45, особенно 24–28
Ответ на преднизолон на 8-й день рической крови	Исчезновение бластов из периферической крови	Бласты в крови остаются
Цитогенетика	Трисомии 4 и 10	Транслокации t(4;11), (9;22)
Молекулярная генетика	TEL-AMLI	Перестройки гена MLL
Имунофенотип	Пре-B	T-клеточный, зрелый B-клеточный

## 3.5. Острые миелоидные лейкозы

Хромосомный анализ занимает прочное место в комплексе методов диагностики и прогнозирования ответа на терапию при ОМЛ.

Эта группа лейкозов морфологически гетерогенна. Кроме того, каждая из входящих в нее подгрупп неоднородна по ряду признаков, в частности по кариотипу. Клоны клеток с изменениями кариотипа при ОМЛ находят у 40–50% взрослых и у 70–80% детей.

В 2002 г. группой известного шведского цитогенетика Ф. Мительмана была проведена компьютерная обработка практически всех имевшихся на тот момент публикаций, посвященных хромосомным нарушениям при ОМЛ. В результате было выявлено 128 (!) неслучайных (повторяющихся) транслокаций. Кроме того, для этой группы заболеваний характерны и другие нарушения кариотипа, как числовые, так и структурные.

Частота основных неслучайных аномалий кариотипа при ОМЛ представлена в табл. 3.5 (значения даны в убывающем порядке).

Таблица 3.5

## Основные хромосомные аномалии, характерные для ОМЛ

Аномалии	Частота, %	Аномалии	Частота, %
t(8;21)(q22;q22)	12	del(20)(q11)	1–2
t(15;17)(q22;q21)	12	i(17q)	1–2
inv(16)	8	del/t(11q13–14)	1–2
del/t(11q23)	5–6	t(9;22)(q34;q11)	1–2
+8	5–6	t(6;9)(q23;q34)	1–2
del(5q)	5–6	+4	1–2
del/t(12p)	3–4	+13	< 1

Таблица 3.5 (продолжение)

Аномалии	Частота, %	Аномалии	Частота, %
del(9q)	3–4	t(8;16)(p11;p13)	< 1
-7	3–4	t(3;5)(q21;q31)	< 1
del(7q)	3–4	inv(3)(q21q26)	< 1
-Y	1–2	t(1;7)(p11;p11)	< 1
+21	1–2	t(1;3)(p36;q21)	< 1

Данные табл. 3.5 демонстрируют выраженную цитогенетическую гетерогенность ОМЛ; видно также, что многие характерные хромосомные аномалии встречаются редко: их частота составляет менее 1%. Клиническое значение отдельных редких хромосомных аномалий остается пока не вполне ясным.

Приведенные в табл. 3.5 данные опубликованы С. Хеймом и Ф. Мительманом в 1992 г. Авторы суммировали огромный материал — данные около 6 тыс. пациентов с ОМЛ, которым проведено цитогенетическое обследование в разных странах мира. Показатели частоты получены за счет усреднения результатов многих исследователей, а поэтому нивелируют важные возрастные, географические и некоторые другие различия в частоте специфических хромосомных аномалий. Например, t(8;21) чаще наблюдается у детей и молодых взрослых, чем у пациентов старше 35 лет; транслокации с участием района 11q23 составляют большинство изменений кариотипа, наблюдаемых у детей в возрасте до 1 года, затем частота этих перестроек уменьшается; данные аномалии являются характерными и для ОМЛ у взрослых людей, однако частота их прогрессивно снижается с возрастом, они редко встречаются у пожилых лиц. С другой стороны, известны неслучайные изменения кариотипа, характерные для лейкозов у пожилых людей — моносомии и делеции хромосом 5 и 7.

Установлено также, что основные специфические хромосомные аномалии неравномерно распределены в разных регионах мира и, возможно, обусловлены средовыми и/или расовыми (национальными) особенностями.

Географические различия в частоте неслучайных хромосомных аномалий характерны для всех типов новообразований, как для солидных опухолей, так и для гемобластозов. Наиболее яркими примерами при ОМЛ являются сравнительно высокая частота t(15;17) среди латиноамериканцев и t(8;21) в Японии.

Важно также, что каждая группа ОМЛ с одной и той же специфической аномалией кариотипа состоит из более мелких подгрупп, отличающихся по ряду признаков, в частности, по присутствию тех или иных генных мутаций (*FLT3/ITD*, *KIT*) и/или по различным дополнительным (вторичным) цитогенетическим аномалиям. Эти подгруппы неоднородны по морфологическим характеристикам и по другим биологическим особенностям лейкозных клеток (см. ниже).

Существует определенный параллелизм между морфологическими вариантами ОМЛ и типом обнаруженных специфических хромосомных изменений. Примеров четкого параллелизма немного: специфическая транслокация t(15;17) и ОМЛ-М3; транслокация t(8;21) и ОМЛ-М2; инверсия хромосомы 16 и ОМЛ-М4 с эозинофилией, перестройки длинного плеча хромосомы 11(q23) и ОМЛ-М5.

**Транслокация t(15;17)** характерна для острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ, ОМЛ-М3), при котором она обнаружена почти у всех больных — более 90% взрослых и детей, как при типичной (гипергранулярной) форме, так и при микрогранулярном варианте — М3var (вариант М3) (рис. 3.8).

Эта аномалия была открыта в 1977 г. Дженет Роули (США) и с тех пор считается абсолютным диагностическим маркером ОПЛ. Она выявляется также у всех пациентов с промиелоцитарным бластным кризом ХМЛ. Данная аномалия не наблюдается ни при

одном другом гемобластозе, что учитывается при проведении дифференциального диагноза между ОПЛ и другими вариантами ОМЛ.

При транслокации t(15;17) происходит слияние фрагмента гена *PML* из хромосомы 15 с фрагментом гена, кодирующего рецептор  $\alpha$ -ретиноевой кислоты (*RAR $\alpha$* ), из хромосомы 17. В результате слияния образуются и экспрессируются два химерных гена: *PML-RAR $\alpha$*  и *RAR $\alpha$ -PML*.

Разрывы гена *RAR $\alpha$*  во всех случаях ОПЛ локализируются в одном месте (второй интрон), в то время как разрывы гена *PML* у разных пациентов могут локализоваться в трех разных участках этого гена (интрон 3, интрон 6, экзон 6). Как следствие возможно формирование трех типов транскриптов химерного гена: *Vcr-3* (короткий), *Vcr-1* (длинный), *Vcr-2* (вариабельный). Частота выявления первого и третьего типов транскрипта сходна: 55 и 40% соответственно; второй тип транскрипта (вариабельный) выявляется редко — 5–8%. Не всегда удается четко отличить вариабельный тип от длинного, поскольку разрывы в этих случаях близки: интрон 6 и экзон 6. При исследовании клинического значения типа транскрипта это следует иметь в виду. Тип транскрипта определяется с помощью ПЦР.

В настоящее время большинство исследователей отрицает связь между типом транскрипта и клинико-морфологическими особенностями ОПЛ, в частности, ответом на лечение ретиноидами. Тип транскрипта важен при проведении мониторинга минимальной остаточной болезни.

Существует точка зрения о неблагоприятном прогностическом значении короткого типа транскрипта. Следует отметить, что короткий и вариабельный типы транскрипта нередко ассоциированы с высоким лейкоцитозом, что само по себе имеет неблагоприятное прогностическое значение. Кроме того, при ОПЛ имеются иммунофенотипические различия между бластными клетками пациентов с длин-

ным типом транскрипта и пациентов с другими типами транскрипта. В настоящее время не рекомендуется изменять стандартную терапию индукции при ОПЛ в зависимости от типа транскрипта.

Молекулярно-генетические методы позволяют обнаружить химерные гены и их продукты не только у больных со стандартной транслокацией t(15;17), но и в случаях субмикроскопических слияний *PML-RAR $\alpha$* , когда обычный цитогенетический анализ не обнаруживает эту перестройку.

Изредка (менее 5% случаев) лейкозные клетки с транслокацией t(15;17) имеют низкий митотический индекс, вследствие чего их не удается обнаружить, — на хромосомных препаратах видны лишь клетки с нормальным кариотипом. В таких ситуациях применение дополнительных молекулярно-генетических методов — FISH или ПЦР — позволяет выявить характерные химерные гены *PML-RAR $\alpha$*  и /или *RAR $\alpha$ -PML* и верифицировать диагноз.

При использовании стандартного хромосомного анализа транслокация t(15;17) определяется примерно в 90% случаев ОПЛ, еще у 5–7% больных характерный слитный ген *PML-RAR $\alpha$*  может быть выявлен только с помощью дополнительного использования молекулярно-генетических методик. Отдельные авторы, приводя результаты мультицентровых исследований, указывают более высокий показатель (15%) скрытого химерного гена *PML-RAR $\alpha$* , не выявленного при стандартном цитогенетическом анализе. Это может быть связано с техническими погрешностями при выполнении хромосомного анализа, например, изучение клеток только на одном сроке культивирования или только «прямых» препаратов (без культивирования). Поскольку пик деления лейкозных клеток в культуре различается у разных пациентов, то чем больше «точек» изучено, тем больше вероятность обнаружения аномальных клеток.

В литературе имеются сообщения о редчайших случаях обнаружения транслокации t(15;17) не при

ОПЛ, а при других морфологических вариантах ОМЛ. Однако, как правило, углубленный ретроспективный анализ и применение тонких молекулярных и других лабораторных тестов приводили к замене первоначального диагноза на диагноз ОПЛ.

Менее чем в 5% случаев у больных ОПЛ при цитогенетическом исследовании обнаруживают не  $t(15;17)$ , а другие транслокации с участием хромосом 15 или 17. Лучше всего изучены  $t(11;17)(q23;q21)$ ,  $t(5;17)(q35;q12-21)$  и  $t(11;17)(q13;q21)$ . В результате этих транслокаций образуются химерные гены: *PLZF-RAR $\alpha$* , *NPM-RAR $\alpha$*  и *NUMA-RAR $\alpha$* , обязательно включающие фрагмент гена *RAR $\alpha$* . Описаны единичные пациенты с ОПЛ, у которых химерный ген возникал в результате слияния фрагментов двух генов из хромосомы 17: *STAT5b* и *RAR $\alpha$* , а на цитогенетических препаратах был виден маркер — дериват хромосомы 17-der(17). Некоторые сведения о так называемых атипичных транслокациях при ОПЛ представлены в табл. 3.6.

Таблица 3.6

#### Атипичные хромосомные транслокации с участием гена RAR при ОПЛ

Транслокация	Ген-партнер	Продукт	Число случаев*
$t(11;17)(q23;q21)$	<i>PLZF</i>	1) <i>PLZF-RAR<math>\alpha</math></i> 2) <i>RAR<math>\alpha</math>-PLZF</i>	16
$t(5;17)(q31;q21)$	<i>NPM</i>	1) <i>NPM-RAR<math>\alpha</math></i> 2) <i>RAR<math>\alpha</math>-NPM</i>	4
$t(11;17)(q13;q21)$	<i>NUMA</i>	<i>NUMA-RAR<math>\alpha</math></i>	1
der(17)	<i>STAT5b</i>	<i>STAT5b-RAR<math>\alpha</math></i>	1

\*Общее число случаев, данные о которых опубликованы.

Атипичные хромосомные перестройки при ОПЛ, так же как и стандартная транслокация  $t(15;17)$ , могут быть скрытыми, не видимыми при обычном хромосомном анализе, их можно обнаружить только

при использовании молекулярно-генетических методов. Это следует иметь в виду также при подозрении на ОПЛ. Кроме того, известны редкие транслокации  $t(3;15)(q21;q22)$ ,  $t(X;15)(p11;q22)$ , когда хромосома 17 выглядит неизменной, однако при молекулярном исследовании обнаруживается участие в транслокации гена *RAR $\alpha$* .

Подчеркнем, что атипичные хромосомные перестройки при ОПЛ обнаруживаются редко: в литературе описано лишь нескольких случаев каждого варианта таких перестроек, поэтому пока еще нет убедительных данных об их прогностическом значении.

У 10–30% пациентов с транслокацией  $t(15;17)$  наблюдаются дополнительные хромосомные аномалии, чаще всего — трисомия 8, реже — делеции длинного плеча хромосомы 9, длинного плеча хромосомы 7, трисомии 16 или 21. Их влияние на прогноз в настоящее время отрицается большинством исследователей.

Возможности современной цитогенетической и молекулярной диагностики ОПЛ хорошо иллюстрируют материалы Европейской конференции 2000 года (Италия), на которой было представлено 611 случаев ОПЛ. Типичная транслокация  $t(15;17)$  и/или ее молекулярные эквиваленты — химерные гены *PML-RAR $\alpha$*  и/или *RAR $\alpha$ -PML* были обнаружены у 559 человек (91,5%). Образование химерного гена *PML-RAR $\alpha$*  в результате субмикроскопической вставки хромосомного материала (инсерции) было обнаружено методом FISH у 3,6% пациентов. С помощью FISH и ПЦР было установлено, что инсерции гена *RAR $\alpha$*  с хромосомы 17 в область гена *PML* на хромосоме 15 представляют самый частый тип субмикроскопических инсерций. При этом экспрессируется не два химерных гена, как в типичных случаях ОПЛ, а только один, а именно *PML-RAR $\alpha$* . Изредка наблюдаются и инсерции субмикроскопического фрагмента гена в область гена *PML*; в таких случаях экспрессируется только ген *RAR $\alpha$ -PML*. Кариотип при этом выглядит, как правило, неизменным — нормальным.

Атипичные транслокации, характерные для ОПЛ, согласно данным, представленным на конференции, были выявлены в единичных случаях: так,  $t(11;17)$  и/или слитный ген *PLZF-RARα* обнаружен меньше чем у 1% больных (0,8%), а другие атипичные слитные гены — еще реже: 0,4–0,2%.

На этой же конференции было отмечено, что изредка встречаются случаи типичного по морфологии ОПЛ, когда применение всего современного арсенала молекулярно-генетических методик не выявляет перестройки гена *RARα*. Этот факт позволил выдвинуть предположение о том, что возможны альтернативные пути возникновения ОПЛ без участия гена *RARα* (рис. 3.9).

Острый промиелоцитарный лейкоз является практически единственной формой острого лейкоза, при котором хромосомный и/или молекулярно-генетический анализы имеют решающее значение для постановки диагноза и выбора терапии. Это связано, во-первых, с тем, что специфическая транслокация  $t(15;17)$  обнаруживается почти у каждого больного, а во-вторых, с тем, что лейкозы с этой транслокацией обладают уникальной чувствительностью к дифференцирующим агентам — препаратам ретиноевой кислоты. При ОПЛ введением производных ретиноевой кислоты полная ремиссия может быть достигнута в подавляющем большинстве случаев (90–98%). Препараты снимают блок дифференцировки лейкозных клеток, вызванный действием химерного белка — продукта гена *PML-RARα*. Ретиноиды могут вызывать очень серьезные осложнения, поэтому их применение должно быть тщательно продумано с учетом результатов цитогенетического исследования. Лейкозы, протекающие без химерного гена *PML-RARα*, могут быть резистентными к препаратам ретиноевой кислоты, или ремиссии удастся достигнуть добавлением колониестимулирующих факторов (КСФ) к стандартным протоколам лечения ОПЛ.

Важно также подчеркнуть, что одним из грозных проявлений ОПЛ является геморрагический син-

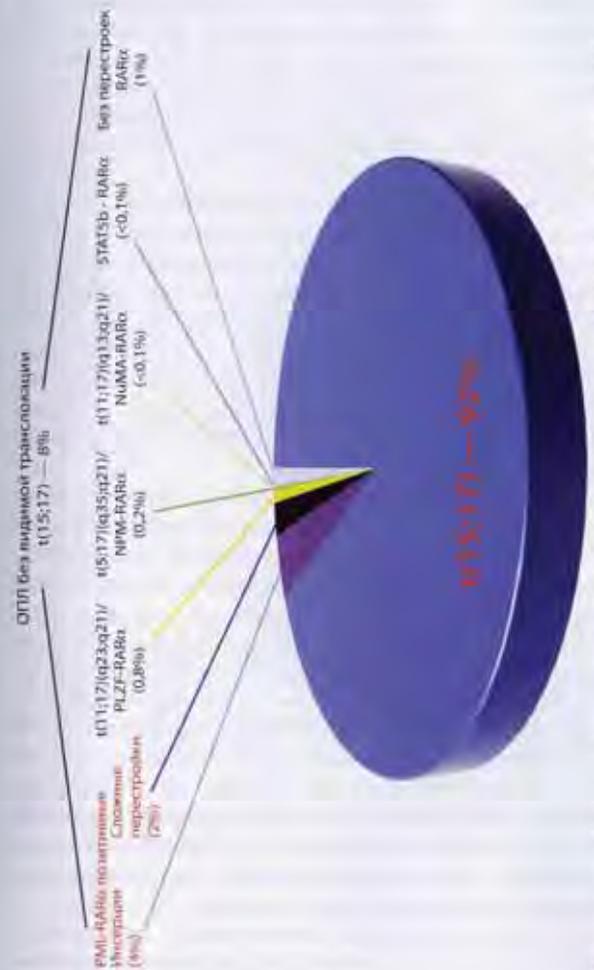


Рис. 3.9. Частота специфических хромосомных и молекулярных маркеров при ОПЛ (Grimwade, LeCocq, 2002).

дром, который нередко купируется введением специфических препаратов, в частности ретиноевой кислоты, поэтому в последних публикациях, посвященных лечению ОПЛ, рекомендуется начинать специфическое лечение как можно раньше, до того, как будет получено генетическое подтверждение диагноза. Такой подход должен предотвратить гибель пациентов от геморрагических осложнений, наблюдаемых до лечения или на его первых этапах.

Своевременная диагностика ОПЛ иногда представляет большие трудности. В основном, это обусловлено двумя причинами: морфологическим атипизмом и «замаскированностью» как типичных, так и атипичных транслокаций, вовлекающих ген *RARα*. Для полной уверенности в правильности диагноза необходим комплекс морфологических, цитогенетических, молекулярно-генетических методик, а также иммунофенотипирование, выявляющее характерную для ОПЛ картину.

В последние годы все большее распространение приобретает специфическая окраска после обработки препаратов крови и/или костного мозга антителами к белку Pml. При этом выявляются так называемые Pml-тельца. Это ядерные структуры, которые имеют различный вид в зависимости от того, какой белок продуцируется — нормальный белок Pml или химерный белок Pml/Rarα. В первом случае Pml-тельца значительно крупнее. Реакция дает быстрый ответ (через несколько часов). Она необходима, когда другие диагностические методики не помогают получить однозначный ответ. Атипичные транслокации, например, в случаях с образованием гена *PLZF-RARα* тоже можно выявить иммуноокрашиванием, но с использованием других специфических антител.

Основные методы генетической диагностики ОПЛ, применяемые в хорошо оснащенных зарубежных клиниках, отражены в табл. 3.7.

Мониторинг минимальной остаточной болезни имеет огромное значение в выявлении пациентов

Таблица 3.7

## Основные методы генетической диагностики ОПЛ

Объект	Аномалия	Методики	Необходимое время, ч	Преимущества	Недостатки
Хромосомы		Стандартная цитогенетика	48–72	Высокая специфичность	Культивирование 24–48 ч; не видны скрытые транслокации; нужны препараты очень высокого качества
		FISH	6–24	Не нужны митозы, смотрят интерфазные ядра	Нет информации о типе трансрипта
ДНК	Химерный ген <i>PML-RARα</i>	Southern blotting	96–168	Высокая специфичность	Трудоёмко, требует много времени
РНК	Слияние <i>PML/RARα</i>	ПЦР с обратной транскрипцией	4–6	Быстрота, высокая чувствительность, определяется микральная остаточная болезнь	Не всегда хорошее качество РНК, возможна контаминация
Ядро	Микрогранулярное распределение ядерных тельц белка Pml	Имунофлюоресценция или иммуноцитохимия	2–3	Быстрота, простота, дешево	Артефакты из-за деградации клеток; нет информации о типе трансрипта

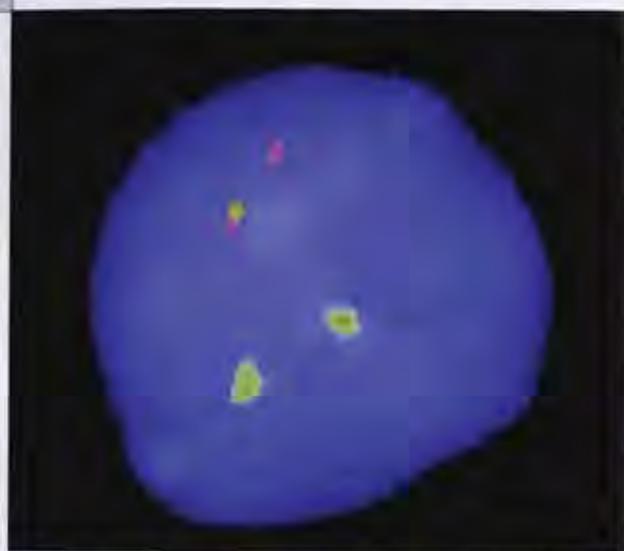


Рис. 3.10. Интерфазная двухцветная FISH, демонстрирующая инсерцию хромосомы 17 (красная) в хромосому 15 (зеленая) у больного ОМЛ-М3, при стандартном цитогенетическом исследовании которого аномалии кариотипа выявить не удалось. (Schoch et al., 2002)

с ОПЛ с высоким риском рецидива (см. раздел, посвященный мониторингу минимальной остаточной болезни).

Еще раз подчеркнем, что цитогенетическая и молекулярная диагностика ОПЛ — дело сложное и требует опыта и соблюдения целого ряда предосторожностей, чтобы избежать ложноположительных или ложноотрицательных результатов (рис. 3.10). Рекомендуется сочетать разные методы генетической диагностики и проводить ее в специализированных центрах.

**Транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$**  — одна из самых частых специфических аномалий кариотипа при ОМЛ, ассоциирована с морфологическим вариантом ОМЛ-М2. Эта аномалия более характерна для детей

и молодых взрослых, чем для лиц пожилого возраста, и наблюдается у 20% взрослых и у 40% детей с М2-вариантом, т.е. здесь морфоцитогенетическая корреляция не такая строгая, как при ОПЛ, где транслокация  $t(15;17)$  присутствует практически во всех случаях ОМЛ-М3. Среди лейкозов, маркированных транслокацией  $t(8;21)$ , иногда обнаруживается не М2, а другие морфологические типы ОМЛ — М1, М4, М5.

В результате транслокации  $t(8;21)(q22;q22)$  образуется химерный ген *AML1-ETO* — продукт слияния фрагментов двух генов — *AML1* и *ETO*. Химерный ген или синтезируемая им РНК («транскрипт») могут быть обнаружены с помощью молекулярно-генетических методов (ПЦР или FISH) у всех больных с этой транслокацией.

В отдельных случаях транслокация  $t(8;21)$  является скрытой: ее не удается обнаружить при стандартном цитогенетическом анализе. Можно говорить о двух основных типах скрытой транслокации: первый тип — субмикроскопические транслокации (инсерции), второй — сложные и атипичные перестройки, включающие не только участки хромосом 8 и 21 (фрагменты генов *AML1* и *ETO*), но и фрагменты других хромосом; при этом образуются атипичные маркеры, маскирующие транслокацию  $t(8;21)$ . При субмикроскопических инсерциях кариотип выглядит нормальным, при втором типе перестроек транслокация, приводящая к образованию химерного гена *AML1-ETO*, скрыта за счет других изменений кариотипа, причем обычно на цитогенетических препаратах видно, что один из гомологов 8-й или 21-й пар вовлечен в изменения. Применение FISH и/или ПЦР для обнаружения химерного гена *AML1-ETO* позволяет прояснить ситуацию.

В 50–80% случаев наблюдается сочетание транслокации  $t(8;21)$  с дополнительными хромосомными aberrациями, наиболее часто встречаются утраты одной из половых хромосом (X — у женщин и Y — у мужчин) и делеция длинного плеча хромосомы 9.

Транслокацию  $t(8;21)$  относят к относительно благоприятным хромосомным аномалиям, ремиссии удается достигнуть более чем в 60–70% случаев. Установлено, что наличие дополнительных хромосомных aberrаций не ухудшает прогноз при транслокации  $t(8;21)$ .

О некоторой прогностической гетерогенности каждой группы больных ОМЛ с однотипными хромосомными аномалиями, включая транслокацию  $t(8;21)$ , сказано ниже.

**Инверсия хромосомы 16(p13;q22) или транслокация  $t(16;16)(p13;q22)$**  обнаруживаются с частотой 4% при первичных ОМЛ и несколько чаще при вторичных (11%). Эти перестройки выявляются во всех случаях М4 с эозинофилией и в 40% случаев миелобластного лейкоза (М4), значительно реже они наблюдаются при других вариантах ОМЛ (М1, М2 с повышением содержания эозинофилов или без такового).

Идентификация этих аномалий трудна, она удается при большом практическом опыте и только на цитогенетических препаратах высокого качества. Такие высококачественные препараты редко получают из костного мозга больных ОМЛ. Поскольку лейкозы, ассоциированные с  $inv(16)$  или  $t(16;16)$ , нередко сопровождаются специфическим поражением ЦНС, терапевтическими программами предусмотрен ряд мероприятий по профилактике такого поражения. Очевидно, что своевременное выявление названных аномалий или их молекулярного маркера — химерного гена *СВФВ-МУН11* — крайне важно.

Эти хромосомные перестройки практически все авторы единодушно относят в группу благоприятного прогноза: ремиссии удается получить почти у всех больных, 5-летнее безрецидивное течение заболевания достигается более чем в 70% случаев [8].

**Перестройки длинного плеча хромосомы 11 (района 11q23)** характерны для острых лейкозов как лимфоидного, так и миелоидного генеза (см. раздел 3.5). Известна тесная ассоциация перестроек рай-

она 11q23 с монобластным вариантом (М5), несколько реже они наблюдаются при миеломонобластном варианте (М4); их частота значительно ниже при других морфологических типах ОМЛ (М0, М1, М2, М6).

Транслокации с вовлечением хромосомного района 11q23 весьма многообразны: к настоящему времени известно около 70 различных хромосомных участков — партнеров 11q23 (рис. 3.11). Самыми частыми являются транслокации  $t(4;11)(q21;q23)$ ,  $t(6;11)(q27;q23)$ ,  $t(9;11)(p21-p22;q23)$ ,  $t(11;19)(p13;q23)$ . Несколько реже наблюдаются транслокации с определенными районами хромосом 1, 3, 10, 15 и 17. Молекулярно-генетические методики обычно позволяют обнаружить в этих транслокациях изменения гена *MLL* (он же называется *HRX*, *XTRX*, *ALL-1*). Имеются сообщения о неслучайном вовлечении и других генов. Известны субмикроскопические изменения этого гена, не видимые при обычном цитогенетическом исследовании, но распознаваемые при использовании молекулярно-генетических методов, в частности FISH и ПЦР. Это наблюдение имеет очень большое клиническое значе-

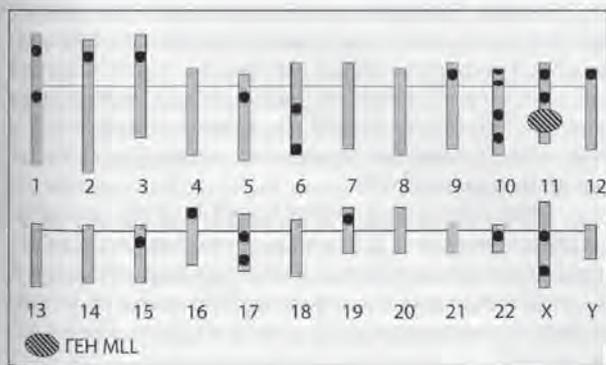


Рис. 3.11. Схематическое изображение выявленных участков хромосом (черные кружки), вовлеченных в транслокации с районом 11q23 (ген *MLL*, заштрихованный овал). В литературе упоминается уже более 70 таких участков

ние, поскольку ОМЛ с субмикроскопическими перестройками гена *MLL*, как правило, менее благоприятны прогностически, чем лейкозы, при которых такие перестройки выявить не удается.

Перестройки гена *MLL* чаще наблюдаются у молодых людей и детей, особенно у младенцев в возрасте до 1 года. Они обладают рядом общих особенностей: высокий лейкоцитоз, наличие признаков моноцитозности у бластных элементов, как правило, плохой отдаленный прогноз.

**Транслокация t(9;11)** характерна для варианта М5, реже наблюдается у пациентов с другими морфологическими типами острых лейкозов. В последние годы опубликовано несколько сообщений о том, что транслокация t(9;11) в отличие от других хромосомных перестроек с участием района 11q23 ассоциирована с хорошим ответом на лечение. В частности, группой американских авторов показано, что у младенцев с транслокацией t(9;11) 5-летняя БРВ при ОМЛ составила 70%. В 2002 г. после проведения клинико-цитогенетических сопоставлений у 298 пациентов с ОМЛ группой ССГ сделан вывод, что транслокация t(9;11) имеет благоприятное прогностическое значение. Частота полных ремиссий у больных с этой транслокацией составила 66%, в то время как у пациентов с другими перестройками района 11q23 она не превышала 27%; 5-летняя БРВ была соответственно 65 и 24%. У пациентов без изменений района 11q23 5-летняя БРВ составила 26%.

**Транслокация t(6;11)(q27;q23)** относится к редким неслучайным аномалиям кариотипа. Она приводит к образованию слитного (химерного) гена — *MLL-AF6*, состоящего из фрагментов гена *AF6*, в норме локализованного в 6q27, и гена *MLL*, локализованного в 11q23.

Описано всего несколько десятков случаев острого лейкоза с транслокацией t(6;11)(q27;q32); большинство из них представлено вариантами М4 и М5 по FAB-классификации (рис. 3.12).



Рис. 3.12. Редкая специфическая хромосомная транслокация t(6;11) при ОМЛ. Представлены нормальные хромосомы 6 и 11, а также маркеры, возникшие в результате транслокации: обмен небольшими и близкими по интенсивности окрашивания участками хромосом

Эта перестройка — пример специфической аномалии кариотипа, трудно диагностируемой при стандартном цитогенетическом анализе: ее нередко принимают за делецию длинного плеча хромосомы 11. Идентифицировать данную транслокацию можно с помощью FISH и/или ПЦР.

Острый лейкоз с транслокацией t(6;11)(q27;q32) отличается от других аномалий района 11q23 невысоким лейкоцитозом. Наблюдается низкая эффективность терапии и, соответственно, короткая продолжительность жизни больных.

В 1998 г. на собрании Европейской рабочей группы цитогенетиков, посвященном перестройкам хромосомного района 11q23, были проанализированы результаты обследования 30 больных с t(6;11). Только у 3 больных заболевание можно было отнести к лимфобластному варианту, а у остальных 27 был нелимфобластный лейкоз. Последний в подавляющем большинстве случаев был определен как М4 или М5 (22 из 27). Больные получали лечение в нескольких гематологических центрах Европы. В четырех случаях ремиссии не были достигнуты, а в остальных они были сравнительно непродолжительными: от 5,8 до 30,3 мес. Медиана выживаемости составила 12 мес.

**Транслокация t(10;11)(p13;q23)** является одной из редких неслучайных аномалий кариоти-па. Описано лишь несколько десятков острых лей-козов с этой аномалией, причем как лимфобластных (чаще Т-клеточных), так и миелоидных (преимуще-ственно М4 и М5), а также бифенотипических, имею-щих одновременно признаки Т-клеток и монобластов; есть сообщения о единичных случаях эозинофиль-ных и мегакариобластных лейкозов с транслокацией t(10;11).

По вопросу о прогностическом значении этой транслокации литературные данные противоречивы. Сравним выводы из последних сообщений. В 1998 г. на основании анализа 16 случаев ОМЛ с транслока-цией t(10;11) Европейская рабочая группа цитогенети-ков приходит к заключению, что транслокация t(10;11) имеет более благоприятное прогностическое значе-ние, чем другие транслокации с участием хромосом-ного района 11q23: у большинства пациентов достиг-нуты ремиссии, средняя длительность БСВ составила 12,2 мес. Большинство пациентов остается под наблю-дением, причем два из них — более 5 лет. С другой сто-роны, в том же году другим исследователям (MRC) удалось сравнить две подгруппы одинаково лечен-ных больных с разными транслокациями хромосом-ного участка 11q23: t(9;11)(p22;q23) и t(10;11)(p12;q23). В первой подгруппе было 18 пациентов, во второй — 12. Оказалось, что количество больных, переживших 3-летний рубеж, было в 3 раза больше среди пациентов с транслокацией t(9;11), чем среди пациентов с транс-локацией t(10;11) — 50 и 17% соответственно. Суще-ствуют и другие публикации, свидетельствующие в пользу прогностически неблагоприятного значения транслокации t(10;11). Нельзя исключить, что ответ на терапию обусловлен генами-партнерами. Идентифи-цировано уже несколько генов, претерпевающих из-менения при транслокации t(10;11): в хромосоме 10 это ген *AF10*, изредка ген *ABI-1*, а в хромосоме 11 — гены *MLL*, *CALM*, *HAEB*. Лишь в исключительно редких

случаях при транслокации t(10;11) не удается выявить нарушения хотя бы одного из названных генов.

Необходимо отметить, что химерные гены *MLL-AF10* и *CALM-AF10*, как правило, возникают в ре-зультате сложных перестроек, где транслокации со-четаются с инверсиями, инсерциями или делециями длинного плеча хромосомы 11. Нередко в этих перестройках участвуют фрагменты и других хромосом. Иногда транслокация t(10;11) с образованием химер-ного гена *MLL-AF10* трудно распознается при стан-дартном цитогенетическом анализе и выявляется только молекулярными методами.

Данные о транслокации t(10;11) накапливают-ся очень медленно из-за редкой встречаемости этой аномалии и в связи с трудностями ее расшифров-ки на хромосомных препаратах. Идентификация ге-нов, вовлеченных в транслокацию, проводилась ме-нее чем в половине изученных к настоящему време-ни случаев. Из нескольких десятков описанных в ли-тературе случаев практически невозможно сформи-ровать группы, однородные по точкам разрыва хро-мосом или генов, участвующих в транслокации, а также по протоколам лечения. Необходимо дальней-шее накопление информации для создания больших групп генетически однородных и одинаково лечен-ных больных.

**Транслокация t(6;9)** — редкая (1–2%) неслу-чайная хромосомная аномалия, четко ассоциирован-ная с неблагоприятным прогнозом. Эта перестройка чаще наблюдается у детей и молодых взрослых, чем у лиц пожилого возраста.

В 2006 г. группа известных американских ис-следователей опубликовала работу, посвященную ха-рактеристике лейкозов с этой хромосомной аномали-ей. Авторам удалось выбрать из мировой литературы 7 690 случаев ОМЛ и миелодиспластического синдро-ма, при которых лечение проводилось по 20 известным программам; в этой группе было 69 случаев с трансло-кацией t(6;9). Возраст больных колебался от 2 до 66 лет,

медиана — 23 года. Не отмечено преобладания какого-либо одного морфологического варианта ОМЛ, однако варианты М2 и М4 наблюдались чаще (32–35%), чем М1, М5 и М6 (3–19%). Для ОМЛ с этой хромосомной перестройкой считается характерной базофилия (у детей и взрослых) и у взрослых — признаки диспластических изменений костномозговых предшественников одного или более ростка кроветворения.

Как было сказано в самом начале этого раздела, прогноз — крайне неблагоприятный, у детей чуть лучше, чем у взрослых: полные ремиссии были достигнуты у 71% детей и у 58% взрослых; 5-летняя БСВ — 11,2% у детей, 9,9% у взрослых; общая выживаемость составила соответственно 12,5 и 14,4%. Эти показатели свидетельствуют о справедливом включении транслокации t(6;9) в группу неблагоприятного прогноза. АллоТГСК пока проведена лишь немногим пациентам, но создается впечатление, что она увеличила выживаемость в этой группе ОМЛ.

Мутации гена *FLT3* у пациентов с транслокацией t(6;9) встречаются значительно чаще (70%), чем по всей группе ОМЛ.

**Транслокация t(3;3)(q21;q26), инверсия inv(3)(q21q26) и инсерция ins(3;3)(q26;q21q26)** могут встречаться при различных морфологических вариантах ОМЛ. Характерной особенностью является дисплазия мегакариоцитарного ростка с появлением микромегакариоцитов, может наблюдаться двух- и трехростковая миелодисплазия. В отличие от других ОМЛ, уровень тромбоцитов в дебюте заболевания повышен или нормальный. Характерен молодой возраст больных. Прогноз — крайне неблагоприятный.

**Транслокация t(1;22)(p13;q13)** специфична для варианта М7. Она наблюдается исключительно у детей, особенно в возрасте до 1 года. Ее частота при ОМЛ составляет от 0 до 3%. Молекулярным эквивалентом транслокации является химерный ген *OTT-MAL*. Описаны случаи, в которых при М7 наблюдался нормальный кариотип, но с помощью FISH или ПЦР

был выявлен химерный ген *OTT-MAL*. Необходимо отметить, что ОМЛ-М7 является цитогенетически неоднородной группой, в которую входят как лейкозы с нормальным кариотипом, так и случаи с характерными для ОМЛ числовыми и/или структурными аномалиями. У больных с транслокацией t(1;22), как правило, обнаруживают гепато- и спленомегалию, миелофиброз, тромбоцитопению, изредка — гипертромбоцитоз. В подавляющем большинстве случаев наблюдается резистентность к проводимой терапии: полные ремиссии достигаются в 60–80% случаев, они, как правило, короткие — медиана выживаемости составляет 5–9 мес. Трансплантация костного мозга считается показанной при всех ОМЛ-М7, включая лейкозы с транслокацией t(1;22)(p13;q13). В единичных случаях интенсивное лечение позволяет добиться длительных ремиссий — до нескольких лет.

**Моносомия 7 или делеция короткого плеча хромосомы 7 — del(7q).** Моносомия 7 — нередкое нарушение при ОМЛ, выявляемое в изолированном виде примерно у 3% пациентов. В сочетании с другими аномалиями моносомия 7 обнаруживается в 12% случаев и встречается при всех вариантах ОМЛ.

Делеции длинного плеча хромосомы 7 обнаруживаются примерно в 4 раза реже, чем потери всей хромосомы. Размер делеции от случая к случаю может варьировать. Предполагается, что в результате делеции происходит утрата антионкогенной активности, возможно, в связи с потерей единственного имеющегося аллеля опухолевого гена-супрессора.

В последнее время установлено, что возможность достижения полной ремиссии при del(7q) зависит от степени интенсивности терапии. Если в более ранних работах указывалось на однозначно малое число полных ремиссий и короткую продолжительность жизни, то теперь ситуация изменилась: *на основании результатов недавних исследований рекомендуется оставить ОМЛ с моносомией 7 в группе плохого прогноза, а случаи с делециями длинного плеча хромосомы 7 не-*

ривести в группу «промежуточного» прогноза. Однако подавляющее большинство исследователей считают крайне прогностически неблагоприятными как моносомию 7, так и все делеции длинного плеча этой хромосомы, и включают всех больных, даже с изолированными делециями длинного плеча хромосомы 7(7q-), в группу неблагоприятного прогноза.

Прогностически крайне неблагоприятно сочетание моносомии 7 с нарушениями хромосомы 5. Моносомия 7 нередко выявляется как вторичное нарушение при ОМЛ. Ее почти не бывает при транслокации t(8;21), а при t(9;22) она обнаруживается в 20% случаев. Нередко сочетание моносомии 7 с inv(3). Делеция del(7q) может сочетаться с inv(16). Прогностическое значение этого сочетания пока еще не выяснено.

Моносомия 7 может быть обнаружена методом FISH, что особенно важно в случаях с низким митотическим индексом, например, при так называемой маскированной моносомии 7, когда хромосомное нарушение регистрируется только в интерфазных, но не в делящихся клетках.

**Трисомия 8 (+8)** — самая распространенная трисомия, наблюдаемая при лейкозах: частота изолированной трисомии 8 составляет 5% от всех случаев ОМЛ с измененным кариотипом, в сочетании с другими изменениями — 15%. В литературе не отмечены возрастные различия в частоте этой аномалии. Наши наблюдения свидетельствуют о более частом обнаружении этой аномалии у детей.

Результаты изучения прогностического значения трисомии 8 противоречивы: одни авторы относят ее к «промежуточным» признакам, другие — к неблагоприятным.

Это хромосомное нарушение нередко выявляется как вторичное в процессе клональной эволюции ОМЛ. Наиболее часто оно регистрируется при t(15;17) — 30% от всех случаев с вторичными нарушениями при этой транслокации.

Для определения трисомии 8 в митозах и интерфазных ядрах разработан высокоэффективный метод FISH. Особенно ценно его использование, когда у больных при стандартном цитогенетическом исследовании обнаруживается только одна метафаза с трисомией 8, что, исходя из существующих критериев, не позволяет отнести это нарушение к клональному. Анализ большого числа интерфазных ядер и/или метафаз с помощью FISH позволяет решить эту проблему.

Выше уже подчеркивалась цитогенетическая гетерогенность ОМЛ. К настоящему времени известны десятки характерных изменений кариотипа, идентифицировано множество молекулярно-генетических маркеров, но параллелизм между характером генетических изменений и морфологическими типами (FAB-вариантами) миелоидных лейкозов ограничивается приведенными выше примерами. Отдельные FAB-варианты ОМЛ (кроме M3 и M4Eo) не имеют хромосомных маркеров, характерных только для этих вариантов лейкоза. Так, при ОМЛ-M2 может быть обнаружена транслокация t(8;21), но наблюдаются и другие характерные транслокации — t(9;22), t(6;9) или различные другие изменения кариотипа; при M4 нередко кариотип не изменен, но в ряде случаев наблюдаются перестройки 11q23, inv(16) или другие аномалии. Сравнительно редкие морфологические варианты M0 или M7 также неоднородны в цитогенетическом отношении. Например, M7 может протекать без изменений кариотипа, но при этой форме ОМЛ выделяют не менее девяти подгрупп с разными хромосомными перестройками. Причем, кроме транслокации t(1;22), ни одна из перестроек не специфична именно для M7. Важно, что морфологически однородные группы могут включать лейкозы с хромосомными аномалиями, значительно различающимися в прогностическом отношении.

### 3.5.1. Прогностическое значение изменений кариотипа при острых миелоидных лейкозах

В настоящее время кариотип считается одним из важнейших независимых прогностических критериев при ОМЛ (рис. 3.13). Принято выделять три-четыре группы в зависимости от прогностического значения характерных хромосомных аномалий. Первая группа включает аномалии, предвещающие хороший ответ на лечение; доля больных, у которых удается получить полные ремиссии, превышает 90%, а количество пациентов с 5-летней БРВ составляет 60–70%. В группе с плохим прогнозом эти показатели значительно хуже: соответственно 30–50% и 10–15%. Третья группа характеризуется «промежуточным» ответом на лечение. Иногда последнюю группу подразделяют на две: с «промежуточным» прогнозом и с аномалиями, прогностическое значение которых пока не установле-

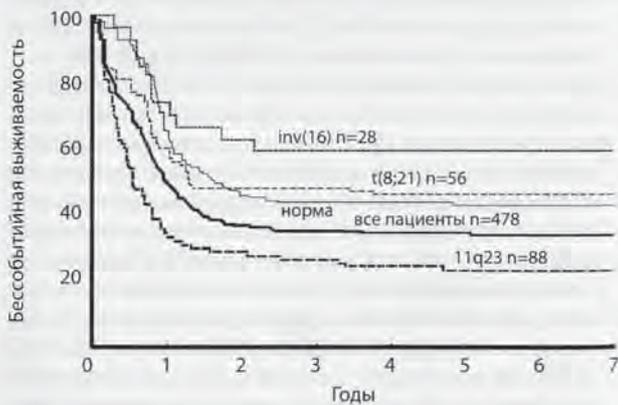


Рис. 3.13. Кривые выживаемости по Каплану—Майеру при ОМЛ у детей с различными специфическими хромосомными транслокациями. Наиболее благоприятной в прогностическом отношении является *inv(16)* (Raimondi et al., 1996)

но. Включение той или иной хромосомной аномалии в одну из этих групп может изменяться по мере накопления новых фактов.

Одна из важнейших проблем цитогенетического прогнозирования ОМЛ состоит в том, что около 20–30% случаев заболевания протекает с редкими разнообразными клоновыми хромосомными изменениями, прогностическое значение которых пока неясно. Кроме того, отдельные уже известные аномалии кариотипа с трудом идентифицируются даже опытными цитогенетиками.

В настоящее время к изменениям кариотипа, имеющим благоприятное прогностическое значение, относят хромосомные транслокации *t(8;21)(q22;q22)*, *t(15;17)(q22;q21)* и *inv(16)/t(16;16)*. В группу аномалий кариотипа, имеющих неблагоприятное прогностическое значение, включают изменения длинного плеча хромосомы 3, утраты хромосом 5-й и 7-й пар, делеции длинного плеча хромосомы 5, транслокации *t(6;9)(p23;q34)* и *t(9;22)(q34;q13)*, различные перестройки короткого плеча хромосомы 17 и сложные изменения кариотипа (три или более хромосомных нарушений). Остальные случаи попадают в группу «промежуточного» прогноза.

До сих пор нет единой точки зрения относительно того, где проходят границы между прогностическими группами. Например, некоторые авторы утверждают, что пациенты с тремя-четырьмя изменениями кариотипа относятся к группе «промежуточного» прогноза, а прогностически неблагоприятными являются случаи с пятью и более хромосомными нарушениями.

В большинстве зарубежных работ все нарушения хромосомного района 11q23 относят в группу плохого прогноза. Однако уже с середины 90-х годов прошлого века публикуются серии наблюдений, свидетельствующие о хорошем эффекте лечения лейкозов с транслокацией *t(9;11)* (см. выше). Пятилетняя выживаемость у больных с этой аномалией достигает 60–70%, т.е. является такой же, как в группе с прогно-

стически благоприятными изменениями кариотипа. Недавние международные многоцентровые исследования позволили прийти к выводу, что прогноз при ОМЛ с перестройками 11q23 может зависеть от второго участника транслокации. Например, ответ на терапию у больных с транслокацией t(9;11) значительно лучше, чем у пациентов с транслокацией t(10;11). Некоторые другие противоречия в оценке прогностического значения хромосомных аномалий при ОМЛ иллюстрирует табл. 3.8.

Жирным шрифтом в табл. 3.8 мы выделили именно те аномалии кариотипа, по которым нет единой точки зрения. Так, европейские авторы (MRC) считают, что присутствие транслокации t(8;21), независимо от дополнительных аномалий кариотипа, безусловно и однозначно предсказывает хороший ответ на лечение. Американские авторы (SWOG) относят к группе хорошего прогноза только те случаи с транслокацией t(8;21), где присутствует не более одной вторичной хромосомной перестройки и она не является делецией длинного плеча хромосомы 9-del(9q). Европейские исследователи относят транслокации с участием 11q23, del(7q) и del(9q) к группе «промежуточного» прогноза, американские — к прогностически плохим.

В 2002 г. американская группа CCG опубликовала свои данные по оценке прогностического значения особенностей кариотипа детей с ОМЛ (исключая М3). Клинико-цитогенетические сопоставления проведены у 269 пациентов. Результаты этого исследования, представленные в табл. 3.9, не полностью совпадают с выводами других авторов, приведенными выше.

Из данных, представленных в табл. 3.9, можно сделать ряд выводов: 1) самые хорошие результаты получены группой CCG при лечении ОМЛ с инверсией хромосомы 16, что совпадает с уже установившимся представлением о благоприятном прогностическом значении этой аномалии; 2) эффективность лечения

Таблица 3.8

## Противоречия в оценке прогностического значения некоторых хромосомных аномалий

Прогноз	Хромосомные аномалии	
	по данным SWOG	по данным MRC
Хороший	inv, t, del(16q), t(15;17), t(8;21) + 1 аномалия (не 9q-)	inv, t, del(16q), t(15;17), t(8;21)
Промежуточный	Нормальный, +8, +6, -Y, del(12p)	Нормальный, +8, аномалии 11q23, del(9q), del(7q), +21, +22
Плохой	del(5q), -5, -7 del(7q), аномалии 3q, t(6;9), t(9;22), аномалии 9q, 11q23, 20q, 21q, 17p, сложный кариотип (> 3 аномалий)	del(5q), -5, -7, аномалии 3q, t(6;9), t(9;22), сложный кариотип (> 5 аномалий)
Неясный	Остальные	Не вошедшие в другие группы

Таблица 3.9

**Особенности кариотипа и прогноз при ОМЛ у детей (по данным CCG 213, 2002)**

Группы больных	Количество больных	Полные ремиссии, %	7-летняя выживаемость, %
Всего	269 (100%)	76	35 ± 6
Нормальный кариотип	77 (29,0%)	72	37 ± 11
t(8;21)	35 (13,0%)	80	29 ± 15
inv(16)	17 (6,0%)	100	76 ± 20
Аномалии 11q23	38 (14,0%)	86	37 ± 16
-7, 7q-	11 (4,0%)	73	18 ± 23
+8	18 (7,0%)	56	22 ± 19

больных с транслокацией t(8;21) оказалась значительно хуже и не отличается по показателям от данных, полученных при лечении ОМЛ с перестройками 11q23; эти данные противоречат выводам других исследователей; 3) самые плохие результаты получены при лечении ОМЛ с трисомией 8 и изменениями хромосомы 7, что не вполне совпадает с опубликованными данными, поскольку трисомию 8 большинство исследователей относит в группу «промежуточного» прогноза, а после проведения многоцентровых исследований последних лет стало ясно, что прогноз у больных с моносомией 7 отличается от прогноза ОМЛ с делецией длинного плеча хромосомы 7: в первом случае он значительно хуже.

Приведенные данные и ряд других публикаций свидетельствуют о необходимости продолжения исследований, направленных на выяснение прогностического значения отдельных первичных и вторичных хромосомных аномалий. Необходимо иметь в виду, что включение специфических аномалий кариотипа в

группу хорошего или плохого прогноза, во-первых, не всегда совпадает у разных авторов, а во-вторых, периодически меняется.

Необходимо еще раз подчеркнуть, что каждая прогностическая группа и даже группа, в которую включены только случаи с идентичной хромосомной перестройкой, не являются однородными по ответу на терапию.

Обнаружение у пациента определенной хромосомной аномалии позволяет только оценить возможность (шанс) больного ответить на лечение. До начала лечения или в ходе клинико-гематологической ремиссии невозможно предсказать, кто именно из больных с конкретной хромосомной аномалией переживет 5-летний рубеж, а у кого разовьется ранний рецидив. Мы знаем только, что у пациентов, у которых до лечения обнаружены хромосомные аномалии, обозначаемые как прогностически благоприятные, значительно больше шансов ответить на лечение длительными полными ремиссиями, чем в группе плохого прогноза.

В последние годы появились факты, свидетельствующие о том, что ряд показателей может быть полезным для уточнения прогноза ОМЛ в группах с характерными хромосомными аномалиями. У больных с прогностически благоприятными транслокациями t(8;21) или t(15;17) вероятность хорошего ответа на терапию снижается, в частности, при высоком исходном лейкоцитозе, экспрессии антигена CD56 на бластных клетках, недостаточном снижении количества бластных элементов в костном мозге на 14–21-й день лечения, экспрессии маркера FLT3/ITD.

Имеются сообщения о том, что наличие признаков дисплазии клеток остаточного (нелейкозного) эритроидного и мегакариоцитарного ростка костного мозга до лечения предвещает невысокую эффективность терапии при ОМЛ.

Существуют противоречия и в оценке прогноза при ОМЛ с нормальным кариотипом (20–30% от всех

ОМЛ). Некоторые авторы считают, что нормальный кариотип предвещает хороший ответ на лечение, однако в большинстве публикаций лейкозы без хромосомных изменений относятся в группу «промежуточного» прогноза. С помощью различных молекулярных методик показано, что эта группа генетически гетерогенна, однако прогностическое значение отдельных конкретных мутаций еще недостаточно изучено. Некоторые характерные субмикроскопические перестройки обсуждались выше, в частности инсерции при ОПЛ (5–10% случаев от всех ОМЛ с нормальным кариотипом). Несколько реже наблюдаются субмикроскопические перестройки гена *MLL*. Присутствие последних прогностически неблагоприятно. Обнаружены и другие повторяющиеся субмикроскопические изменения при ОМЛ, прогностическое значение которых еще предстоит установить.

Итак, в каждом конкретном случае предсказание ответа на лечение является весьма трудной задачей. Только комплекс клинико-лабораторных показателей позволяет с некоторой долей вероятности сделать предположение о возможности получения ремиссии. Выполненные до начала лечения хромосомный и молекулярно-генетический анализы, выявление антигена CD56 на поверхности бластных клеток, определение мутации гена *FLT3*, обнаружение признаков миелодисплазии в остаточном ростке кроветворения и некоторые другие тесты представляют собой наиболее информативный в настоящее время комплекс исследований для прогнозирования при ОМЛ.

### 3.6. Вторичные острые миелоидные лейкозы

Этот термин объединяет лейкозы, которые возникают после лечения — лучевого и/или химиопрепаратами — самых разнообразных новообразований. Некоторые авторы включают в эту группу также острые

лейкозы, развившиеся в результате трансформации миелодиспластического синдрома. У детей эти тяжелые и резистентные к лечению заболевания наблюдаются реже, чем у взрослых.

Вторичные лейкозы составляют 10–20% от общего числа ОМЛ. При них наблюдаются те же неслучайные изменения хромосом, что и при первичных лейкозах, но известны некоторые различия в частоте отдельных характерных цитогенетических аномалий. Так, по сравнению с лейкозами *de novo*, вторичные лейкозы характеризуются большей частотой и сложностью хромосомных перестроек. Варианты, возникшие после лечения алкилирующими препаратами или облучения, характеризуются более высокой частотой перестроек хромосом 5 и/или 7 — моносомий или делеций. Те же самые нарушения выявляются и при лейкозах, возникших после высокодозной терапии по поводу лимфомы Ходжкина или неходжкинских лимфом, например после аутоТГСК.

Перестройки районов 11q23 и 21q22 обнаруживаются при ОМЛ, развившихся после терапии препаратами из группы эпидофиллотоксинов (ингибиторы топоизомеразы II), например этопозидом. Описаны случаи вторичных лейкозов, возникших после терапии псориаза препаратами из группы диоксипиперазинов (разоксан, бимолан), которые также являются ингибиторами топоизомеразы II. Цитогенетически чаще всего они характеризовались транслокациями t(8;21) и t(15;17). Большинство перестроек при вторичных ОМЛ относится к прогностически неблагоприятным.

### 3.7. Хронический миелолейкоз

Хронический миелолейкоз — клональное миелопролиферативное заболевание из стволовых кроветворных клеток, при котором происходит массивная пролиферация и накопление созревающих и зрелых миелоидных клеток.

Этот лейкоз значительно реже наблюдается у детей, чем у взрослых.

Для ХМЛ характерен специфический хромосомный маркер — так называемая филадельфийская хромосома. Филадельфийская хромосома — первый из маркеров, характерных для конкретной опухоли человека. Именно эта находка положила начало клинической цитогенетике в онкологии.

Эта аномалия — укороченная малая акроцентрическая хромосома — выявляется при рутинной окраске (без G-бендинга) практически у всех больных ХМЛ (95–98%).

Примерно у 90% больных Ph-хромосома выявляется во всех анализируемых метафазах, у остальных пациентов обнаруживают как нормальные клетки, так и клетки с Ph-хромосомой, причем в отдельных случаях этот маркер регистрируется в меньшинстве клеток костного мозга.

С помощью дифференциальной окраски хромосом установлено, что укорочена одна из хромосом 22-й пары. Позже было выяснено, что Ph-хромосома образуется не вследствие делеции хромосомы 22, как предполагали ранее, а в результате сбалансированной транслокации между хромосомами 9 и 22, участками 9q34 и 22q11 (Rowley, 1973). При этом образуются две маркерные хромосомы, обозначаемые как 9q+ и 22q- (Ph). Изредка наблюдаются перестройки, скрывающие укороченную хромосому 22 — так называемая замаскированная Ph-хромосома, т.е. маленький фрагмент, оторвавшийся от любой другой хромосомы, может «прилепиться» к обломанной хромосоме 22 и замаскировать Ph-хромосому. Эта картина в большинстве случаев может быть расшифрована при дифференциальной окраске, но иногда требуется применение молекулярно-биологических методов.

Примерно в 10% случаев наблюдаются так называемые атипичные транслокации, при которых видно, что фрагмент хромосомы 22 переносится не на 9-ю, а

на какую-либо другую хромосому. Кроме того, иногда при ХМЛ обнаруживают сложные Ph-транслокации с участием не двух (9-й и 22-й), а трех или более хромосом. Установлено, что на молекулярном уровне при всех Ph-транслокациях участвуют хромосомы 9 и 22, однако это не всегда видно при стандартном цитогенетическом исследовании. Тип Ph-транслокации (стандартная, атипичная или сложная) не имеет клинического значения.

В клиническом течении ХМЛ обычно наблюдаются две стадии: хроническая и терминальная. Некоторые авторы выделяют между этими фазами еще третью стадию — переходную (фазу акселерации). Терминальная стадия у большинства пациентов представлена бластным кризом. Можно сказать, что ХМЛ — пример новообразования, где фазы развития опухоли наглядно разделены во времени.

В терминальной фазе цитогенетический анализ выявляет у большинства пациентов не только хромосомные маркеры, характерные для предыдущей стадии — 22q- и 9q+, но и новые (дополнительные) характерные перестройки. У многих пациентов появление дополнительных хромосомных аномалий можно наблюдать уже в фазе акселерации (подробнее см. ниже).

В развитии ХМЛ ключевую роль играет химерный ген *BCR-ABL*, образующийся в результате транслокации между хромосомами 9 и 22 (рис. 3.14). В хромосоме 9 разрыв проходит через ген *ABL*, идентифицированный ранее в одном из вирусов лейкоза у мышей. В хромосоме 22 наблюдается разрыв гена *BCR*. В результате слияния фрагментов *ABL* и *BCR* образуется химерный ген *BCR-ABL*, расположенный, как правило, на делетированной хромосоме 22 (Ph-хромосоме). Этот ген кодирует белок с молекулярной массой 210 кДа, обладающий более высокой протеинкиназной активностью, чем продукт нормального протоонкогена *ABL* (P145). При лейкозе, вызванном у мышей вирусом Абельсона, онкогенной активностью обла-

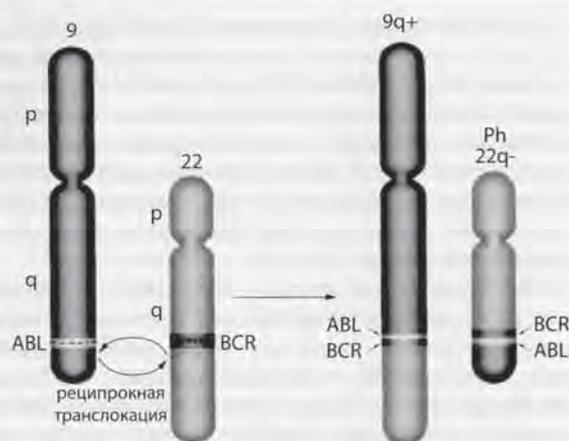


Рис. 3.14. Образование химерного гена *BCR-ABL* при ХМЛ

дает белок — продукт гибридного гена *gag/abl* с высокой протеинкиназной активностью. Для выяснения роли гибридного гена в развитии лейкоза в эксперименте проводилось вырезание гена *gag/abl*. После этого вирус терял способность вызывать лейкоз у мышей, что доказывает ключевую роль гена *gag/abl* в лейкемогенезе.

Изучение точек разрыва в генах *ABL* и *BCR* показало, что у разных пациентов их локализация неодинакова. Так, протяженность участка, на котором локализуются разрывы в гене *ABL*, велика — до 200 000 пар нуклеотидов, а в гене *BCR* разрывы у разных пациентов не локализуются за пределами маленького участка — 8 500 пар нуклеотидов (т.е., они образуют скопление, кластер), отсюда и название гена — *BCR* (breakpoint cluster region — участок, где находится скопление точек разрыва).

В подавляющем большинстве лейкозов с транслокацией t(9;22) в гене *BCR* разрывы локализуются на участке, обозначаемом M-BCR, и образующийся химерный ген *BCR-ABL* включает длинный фрагмент

гена *BCR*, и в результате возникает характерный для ХМЛ белок P210<sup>BCR/ABL</sup>. Кроме того, разрывы могут локализоваться на одном из двух других типичных участков, называемых m-bcr и μ-bcr. Разрывы в области m-bcr приводят к образованию химерного белка P190<sup>BCR/ABL</sup>, т.е. белка меньшей величины, чем P210<sup>BCR/ABL</sup>. При локализации разрывов в μ-bcr образуется более крупный белок — P230<sup>BCR/ABL</sup>.

Не наблюдается строгой корреляции между молекулярными характеристиками белков Bcr-Abl и клинико-морфологическими особенностями лейкозов. Так, P190<sup>BCR/ABL</sup> характерен для двух абсолютно разных лейкозов: с одной стороны, это Ph-позитивный ОЛЛ (см. выше), а с другой — хронический гранулоцитарный лейкоз с выраженным моноцитозом и миелодиспластическими чертами. При обнаружении P230<sup>BCR/ABL</sup> обычно наблюдается картина так называемого нейтрофильного варианта ХМЛ, т.е. ХМЛ, при котором формула крови представлена зрелыми нейтрофилами и единичными юными элементами. Следует подчеркнуть, что название «нейтрофильный гранулоцитарный лейкоз» используется на протяжении многих лет для обозначения Ph (*BCR-ABL*)-негативного ХМЛ — относительно доброкачественного варианта, наблюдаемого у пожилых людей, но изредка встречающегося также и у подростков. Необходимо отметить, что коррелятивная связь между типом химерного белка (P190<sup>BCR/ABL</sup>, P210<sup>BCR/ABL</sup> или P230<sup>BCR/ABL</sup>) и клинико-гематологической картиной лейкоза не является строгой. Любой из этих белков изредка обнаруживается при классической картине ХМЛ, но, с другой стороны, имеются сообщения о сочетании двух типов белков (P210<sup>BCR/ABL</sup> и P190<sup>BCR/ABL</sup>) при типичном ХМЛ.

Решающая роль гена *BCR-ABL* и его продукта — белка P210 в развитии ХМЛ была продемонстрирована на разных модельных системах *in vivo* и *in vitro*. Так, трансдукция Bcr-Abl в стволовые гемопоэтические клетки мыши с последующей трансплантацией этих клеток облученным сингенным животным вызывает

у них миелопролиферативное заболевание, сходное с ХМЛ человека. Установлено, что онкогенный потенциал химерного белка *Vcr-Abl* обусловлен его высокой тирозинкиназной активностью. Нарушение регуляции тирозинкиназной активности — одно из центральных событий в злокачественной трансформации клеток.

При введении клеток, экспрессирующих белок P210<sup>*Bcr/Abl*</sup>, группе летально облученных мышей в условиях одного и того же эксперимента, у одних из этих животных развивается лейкоз, очень похожий на ХМЛ человека, а у других — самые разнообразные новообразования из гемопоэтических клеток: миеломоноцитарные лейкозы, макрофагальные опухоли, пре-В- и Т-клеточные лимфомы, ретикулоклеточные саркомы и эритроидные опухоли. Причина различий не выяснена. Эти опыты, так же как и эксперименты с трансгенными мышами, показывают, что вся цепь событий, приводящая к развитию картины ХМЛ, пока еще не установлена.

В последние годы получены данные о том, что масса кроветворных клеток в организме больных ХМЛ существенно увеличена главным образом за счет резкого повышения времени жизни этих клеток, поскольку активированный ген *ABL* (в гене *BCR-ABL*) ингибирует апоптоз — запрограммированную клеточную смерть. Кроме того, этот ген усиливает пролиферацию миелоидных клеток. Есть основания считать, что при ХМЛ изменена функция специальных клеточных белков — интегринов, в результате чего нарушается адгезия молодых миелоидных клеток к стромальным элементам, и стволовые лейкемические клетки избегают негативных регуляторных влияний.

Недавно установлен еще один важный факт: примерно у 20–25% пациентов с ХМЛ имеется делеция в маркерной хромосоме 9q+. Эта аномалия не видна при «простом хромосомном анализе», ее можно обнаружить только при использовании FISH со специально разработанными зондами. Причем размер

делеции варьирует от пациента к пациенту: делетированный участок может включать последовательности гена *BCR*, перенесенные на хромосому 9 с хромосомы 22, последовательности самой хромосомы 9 или последовательности обеих этих хромосом. Установлено, что делеция возникает одновременно с формированием специфической транслокации t(9;22), ее частота одинакова в группах пациентов, исследованных на разных стадиях ХМЛ. Независимо от метода лечения (даже при использовании ингибиторов тирозинкиназы), прогноз у пациентов с интерстициальной делецией в маркере 9q+ существенно хуже, чем у пациентов без этой аномалии.

Роль делеций маркера 9q+ в прогрессии ХМЛ пока до конца не выяснена. Выпадение кодирующих последовательностей генов *ABL* и/или *BCR* в результате делеции приводит к тому, что экспрессируется только один химерный ген *BCR-ABL*, но нет экспрессии гена *ABL-BCR*. Возможно, и это событие играет роль в прогрессии лейкоза. Обсуждается также возможность инактивации неизвестных пока генов-супрессоров, локализованных в хромосомном районе, который делетируется.

Длительность хронической фазы и соответственно выживаемость у больных с делецией значительно меньше. Так, при исследовании большой серии пациентов (241 случай) было обнаружено, что медиана выживаемости составляла 38 мес. у пациентов с делецией (39 человек) против 88 мес. в группе больных без делеции (202 случая). Различия были статистически значимы.

Применение этого информативного, но весьма дорогостоящего метода в нашей стране пока, к сожалению, не вошло в клиническую практику. Однако за рубежом он применяется все шире, в особенности для оценки новых терапевтических программ, поскольку установлено, что наличие или отсутствие делеции в маркере 9q+ (deletion status) является более мощным независимым прогностическим критерием, чем ши-

роко используемые прогностические системы J. Soka или J. Hasford.

Переход ХМЛ в терминальную фазу у 70–80% больных сопровождается появлением клонов клеток с дополнительными (кроме Ph-транслокации) аномалиями. Необходимо отметить несколько важных моментов:

1. Дополнительные изменения кариотипа в терминальной фазе ХМЛ весьма разнообразны.

2. Эти изменения носят неслучайный характер, они повторяются. Наиболее характерны: удвоение Ph-хромосомы, трисомия 8, маркер  $i(17q)$ , трисомия 19. Значительно реже наблюдаются различные другие изменения кариотипа (числовые и/или структурные).

3. Клон клеток с дополнительными хромосомными аномалиями нередко выявляется за несколько месяцев до обнаружения четких клинико-лабораторных признаков терминальной стадии болезни. Следовательно, цитогенетический анализ помогает диагностировать терминальную фазу ХМЛ раньше, чем другие клинико-лабораторные показатели.

4. Морфологические варианты бластного криза различаются в цитогенетическом отношении: моносомия 7 и делеция хромосомы 7 чаще наблюдаются при лимфоидном кризе,  $i(17q)$ , +8, дополнительные Ph-хромосомы — при миелоидном. При промиелоцитарном варианте бластного криза в дополнение к транслокации  $t(9;22)$  появляется  $t(15;17)(q22;q21)$ , характерная для ОПЛ; при монобластном кризе с эозинофилией появляется инверсия хромосомы 16, как при остром лейкозе М4Ео; мегакариобластный криз может сочетаться с инверсией хромосомы 3,  $inv(3)(q21;q26)$ .

Бластный криз ХМЛ может начинаться с развития экстрamedулярных очагов: в селезенке, лимфатических узлах и др. Затем происходит генерализация процесса путем метастазирования. Этот вывод сделан на основании наблюдений за динамикой распространения клеток, маркированных хромосомными изме-

нениями, характерными для терминальной фазы. Например, клон клеток с двумя Ph-хромосомами сначала может быть обнаружен в лимфатическом узле, при этом одновременное исследование костного мозга не выявляет таких клеток; спустя 2–3 мес. клетки с двумя Ph-хромосомами уже преобладают в костном мозге. Еще один пример: Ph-позитивные клетки с дополнительными хромосомными аномалиями обнаруживаются сначала в селезенке, в то время как костный мозг содержит только клетки с транслокацией  $t(9;22)$ , но без дополнительных изменений, затем в костном мозге значительная доля клеток имеет те же дополнительные изменения, что и лейкозные клетки селезенки.

Чрезвычайно интересно, что при бластном кризе ХМЛ никогда не наблюдаются некоторые хромосомные аномалии, характерные для лимфобластных лейкозов — такие как транслокации  $t(4;11)$  и  $t(8;14)$ , т.е., возможно, что клетки, экспрессирующие ген *BCR-ABL*, получают селективные преимущества при возникновении не всех, а только определенных вторичных аномалий.

Еще одно важное наблюдение: характер вторичных изменений, ассоциированных с бластным кризом, коррелирует с особенностями лечения ХМЛ в хронической фазе. Иными словами, выявлены существенные (статистически значимые) различия в частоте повторяющихся цитогенетических изменений, обнаруженных во время бластного криза у больных, которые ранее лечились по-разному — проведена ли ТГСК или лечение одним из следующих препаратов: бусульфаном, гидроксимочевинной, интерфероном. Так, характерный маркер  $i(17q)$  обнаружен лишь у одного из 48 больных в бластном кризе, развившемся в разные сроки после ТГСК; частота его выявления составила около 30% у лиц, леченных бусульфаном, и лишь у 10–13% пациентов после лечения другими препаратами. Частота обнаружения второй Ph-хромосомы тоже варьировала в зависимости от лечения: она была в несколько раз ниже во время

бластного криза у пациентов, ранее леченных интерфероном, или после ТГСК, чем после других типов лечения. Это наблюдение ставит очень серьезный вопрос: каков вклад мутаций, обусловленных воздействием лечебных агентов во время хронической фазы, т.е. какова доля «вины» предшествующей химиотерапии в развитии бластного криза?

В течение длительного времени ведутся исследования, направленные на выяснение молекулярно-генетических механизмов развития терминальной стадии ХМЛ. Пока полученных данных недостаточно для воссоздания всей последовательности событий, происходящих в реальной действительности. В частности, установлено значительное повышение экспрессии гена *BCR-ABL* у большинства больных в терминальной стадии или еще до наступления этой стадии по сравнению с хронической стадией, причем это наблюдается не только в случаях с удвоением Рh-хромосомы. Есть также данные о повышении экспрессии гена *MYC* в лейкозных клетках некоторых пациентов, сообщается о делеции гена *CDKN2A*, о гиперметилировании гена кальцитонина. Возможно, что одним из важных молекулярных нарушений, приводящих к развитию бластного криза, является изменение белка *Gab2*. Этот белок важен для передачи сигнала *Bcr-Abl* к эффекторным генам. С помощью повышенной экспрессии гена *GAB2* в эксперименте можно затормозить рост и вызвать конечную дифференцировку в клеточных линиях, полученных от больных во время бластного криза.

Особое внимание уделяется изучению гена *TP53* (кодирует белок p53), различные изменения которого характерны для большинства злокачественных опухолей и который считают одним из ключевых генов, важных для стабильности генома. Однако частота обнаружения мутаций этого гена в терминальной стадии ХМЛ не превышает 10%. С другой стороны, известно, что перестройки короткого плеча хромосомы 17, где локализован ген *TP53*, наблюдаются значи-

тельно чаще. В эксперименте четко продемонстрирована роль гена *TP53* в развитии бластного криза у мышей с ХМЛ-подобным лейкозом, обусловленным химерным геном *BCR-ABL*. Нельзя забывать, что ген *TP53* находится во взаимосвязи с целым рядом других генов. Есть гены, оказывающие на него ингибирующее влияние. Недавно опубликованы данные, что при острых лейкозах активированы ингибиторы *TP53*. Не исключено, что сходные процессы могут происходить и при ХМЛ. Данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

В последние годы в клиническую практику вошел новый эффективный препарат — селективный ингибитор некоторых тирозинкиназ, а именно белков *Abl*, *Bcr-Abl*, *C-kit*. Этот препарат называется STI 571 (Signal transduction inhibitor 571), или иматиниба мезилат. При введении препарата в дозе 400 мг/сут у 98% пациентов с ХМЛ отмечается существенное гематологическое улучшение. Примерно в половине случаев получен выраженный цитогенетический ответ. Такой яркий клинический эффект ингибитора тирозинкиназ подтверждает решающую роль белка *Bcr-Abl*, обладающего тирозинкиназной активностью, в возникновении ХМЛ.

**Дифференциальный диагноз.** В клинике нередко приходится проводить дифференциальный диагноз ХМЛ с другими гемобластозами. Возникающие при этом трудности вызваны внешним сходством картины крови при различных миелопролиферативных заболеваниях — повышенный уровень лейкоцитов и сдвиг влево вплоть до появления бластных элементов. Главный дифференциально-диагностический критерий — присутствие специфической транслокации *t(9;22)* и/или ее молекулярного эквивалента — химерного гена *BCR-ABL*.

Бластный криз ХМЛ иногда нелегко отличить от Рh-положительного острого лейкоза. Важен результат цитогенетического анализа после химиотерапии: при ХМЛ достижение гематологической ремиссии не со-

проводится уменьшением количества клеток с Ph-хромосомой в костном мозге, а при остром лейкозе количество Ph-положительных клеток во время ремиссии существенно снижается, вплоть до полного исчезновения.

С тех пор, как стало известно, что для ХМЛ характерна специфическая хромосомная транслокация, дискутируется вопрос о существовании Ph-негативного ХМЛ. Постепенно картина проясняется. В частности, известно, что примерно у 5% больных ХМЛ кариотип не изменен, однако при молекулярно-генетическом исследовании выявляется химерный ген *BCR-ABL*. Следовательно, так называемый Ph-негативный ХМЛ может оказаться *BCR-ABL*-положительным, так как перестройки хромосом 9 и 22 могут быть субмикроскопическими.

Отметим, что метод FISH позволяет выявлять все разновидности Ph-транслокаций и, соответственно, дает возможность судить о наличии гена *BCR-ABL*, в то время как при ПЦР в стандартной модификации результат может быть ложноотрицательным в случае нетипичной локализации точек разрыва.

В настоящее время название «Ph-негативный ХМЛ» закрепилось за своеобразным миелопролиферативным заболеванием, частота которого составляет не более 3% от всех случаев ХМЛ. Обычно речь идет о пожилых людях с клинико-гематологической симптоматикой, характерной для ХМЛ, но без образования химерного гена *BCR-ABL*. У детей эта форма наблюдается редко. Преобладают пациенты мужского пола, редко наблюдается базофилия, часто — анемия и тромбоцитопения, невысокий лейкоцитоз, повышенное содержание моноцитов в крови, неэффективность стандартного лечения. Медиана общей выживаемости составляет 24 мес., только 7% больных переживает 5-летний рубеж. У большинства больных Ph-негативным ХМЛ кариотип не изменен, однако примерно в трети случаев выявлены клоны клеток с хромосомными аномалиями. Чаще всего наблюдается

трисомия 8, не характерна моносомия 7, сложные изменения кариотипа редки.

Диагноз «Ph-негативный ХМЛ» в настоящее время не относится к какой-либо четко очерченной клинико-морфологической форме миелопролиферативного процесса. Выделяют две группы Ph-негативного ХМЛ: с тяжелым коротким течением и с мягким многолетним течением без бластного криза.

По мере накопления данных о больных с миелопролиферативными заболеваниями, при исследовании которых применялся хромосомный и молекулярно-генетический анализ, выделяется все больше клинико-генетических вариантов. В течение нескольких последних лет опубликованы подробные обзоры литературы на эту тему. Сообщается о множестве разнообразных миелопролиферативных заболеваний, наблюдаемых у детей. Лучше всего изучены и вошли в классификацию ВОЗ: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, который раньше называли ювенильным ХМЛ; хронический миеломоноцитарный лейкоз; атипичный ХМЛ (аХМЛ). Описаны также группы миелопролиферативных заболеваний, для которых характерны перестройки специфических хромосомных участков: 8p11, 5q31, и др. Поскольку речь идет о редких заболеваниях, их клиническая характеристика выясняется медленно. Установлено, что для группы миелопролиферативных процессов с перестройками 8p11 характерна высокая эозинофилия. В дифференциальной диагностике решающими являются хромосомный и молекулярно-генетический анализ.

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз морфологически больше похож на хронический миеломоноцитарный лейкоз, чем на ХМЛ. В отличие от хронического миеломоноцитарного лейкоза, при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе черты миелодисплазии выражены слабо. Среди заболевших преобладают мальчики моложе 2 лет. Характерно сочетание с нейрофиброматозом I типа. Выражены гепато- и спленомегалия, лимфоаденопатия, эритематозная сыпь на

коже, частые повторные инфекции, анемия и тромбоцитопения уже на сравнительно ранних стадиях болезни. Нередко наблюдается нормальный уровень ЩФ, в отличие от пониженного при Ph-позитивном ХМЛ. Характерно повышенное содержание фетального гемоглобина в крови. Картина крови сходна с наблюдаемой при хроническом миеломоноцитарном лейкозе взрослых. Бластные кризы развиваются очень редко, но если и развиваются, то только миелоидные. Примерно в 35% случаев наблюдаются клоновые изменения кариотипа, среди них нередко описывают моносомию 7, а также делецию длинного плеча хромосомы 7 и другие перестройки с участием этого хромосомного района. Наблюдается также трисомия 8, перестройки длинного плеча хромосомы 3(q21q26) и др. Для исключения диагноза ХМЛ необходим хромосомный и/или молекулярно-генетический анализ.

Из лабораторных показателей важными для подтверждения диагноза ювенильного миеломоноцитарного лейкоза считают повышенный уровень фетального гемоглобина в крови и лизоцима в сыворотке крови, способность кроветворных клеток спонтанно образовывать гранулоцитарно-макрофагальные колонии *in vitro* и их высокая чувствительность к гранулоцитарно-макрофагальному фактору.

Прогноз — плохой: около 30% больных умирает в течение первого года. Отдельные больные переживают 5-летний рубеж. Трансплантация костного мозга считается единственным средством, увеличивающим продолжительность жизни.

**Контроль ответа на лечение.** Пока для лечения ХМЛ применяли бусульфан и гидроксимочевину, все клетки костного мозга оставались Ph-позитивными при достижении клинико-гематологической ремиссии, однако ТГСК, применение интерферона и ингибиторов тирозинкиназ, в частности иматиниба мезилата, коренным образом изменили ситуацию: у многих больных наблюдается цитогенетический ответ разной степени вы-

раженности. Возникла необходимость количественной оценки цитогенетического ответа на лечение, поскольку обнаружена явная зависимость продолжительности жизни от выраженности ответа на лечение. Этот вывод был сделан при изучении результатов терапии ХМЛ взрослых, но не следует сомневаться в том, что он должен учитываться и при лечении детей.

Необходимо также сказать, что эффективность разных терапевтических программ зависит от клинико-морфологических особенностей ХМЛ, наблюдаемых еще до начала лечения. Эти особенности позволяют относить пациента к одной из трех групп риска — низкого, промежуточного или высокого (по J. Sokal и J. Hasford). Показатели ответа на лечение (цитогенетического и молекулярного) и, соответственно, показатели безрецидивной и общей выживаемости значительно лучше в группе низкого риска, чем высокого. Это четко проявляется при лечении интерфероном или ингибиторами тирозинкиназ.

Между критериями, используемыми разными авторами, имеются определенные различия, но они не принципиальны. Важна степень уменьшения клонна с Ph-хромосомой в костном мозге пациента. Различают следующие виды ответа; полный ответ, когда после лечения не удается обнаружить клетки с Ph-хромосомой; частичный ответ, когда количество таких клеток снижается и составляет 1–35%; малый ответ, когда количество Ph-позитивных клеток колеблется от 36 до 65%; минимальный ответ, когда доля клеток с Ph-хромосомой составляет 66–95%. Ответ считают отрицательным, если количество Ph-позитивных клеток превышает 95%.

В последние годы рекомендуется не только оценивать клинический и цитогенетический ответ на лечение, но и производить количественную оценку молекулярного ответа, что позволяет получить более точную информацию об эффективности лечения и о возможном риске рецидива. Полным молекулярным ответом считается отсутствие химерного транскрипта

*BCR-ABL* (его «уход» после лечения), т.е. смена так называемой ПЦР-позитивности на ПЦР-негативность, а большим ответом называют такой, когда отношение уровня транскрипта *BCR-ABL* к уровню транскрипта контрольного гена равно или меньше 0,10 по международной шкале.

К сожалению, при лечении интерфероном цитогенетический ответ удается получить не у всех пациентов, а только в 20–30% случаев, причем полный ответ — у 8–12% больных. Выявлен параллелизм между цитогенетическим и клиническим эффектами интерферона. При полном ответе 5-летняя выживаемость составляет 90%, при малом — 76%.

В последние годы публикуются отдаленные результаты применения интерферона при ХМЛ, которые также свидетельствуют о тесной связи между первичным цитогенетическим ответом и эффективностью лечения. Так, по данным итальянских авторов, опубликовавших в 2003 г. результаты лечения 317 пациентов, 10-летняя выживаемость при полном цитогенетическом ответе составила 70%. Сходные показатели приведены в сводной работе десяти исследовательских групп из Европы и Японии, опубликованной в 2005 г.: 10-летняя выживаемость в группах низкого и промежуточного риска при большом цитогенетическом ответе достигла 75 и 56% соответственно, но для пациентов, у которых не удалось получить большой цитогенетический ответ, 10-летняя выживаемость была всего 21%.

Применение иматиниба мезилата вызывает клинический и цитогенетический ответ значительно чаще, чем интерферон. Так, частота полных гематологических ответов составляет 95% против 55%, а полных цитогенетических — 76% против 15%. Установлено, что большое значение имеют дозы препаратов и дизайн конкретных терапевтических программ. При лечении интерфероном полный ответ если и достигается, то обычно не ранее, чем через 8–12 мес. (от 6 мес. до 4 лет). Некоторого уменьшения количества Ph-

позитивных клеток в костном мозге можно ждать уже через 3–6 мес. от начала лечения.

Важно, что иматиниба мезилат позволяет получить клинический и гематологический ответ даже у пациентов в фазе акселерации болезни и при лечении бластного криза, однако в последнем случае ремиссии обычно короткие.

Пока срок наблюдения за первичными больными ХМЛ, лечеными иматиниба мезилатом, еще невелик, и еще неясно, насколько этот препарат улучшит отдаленные результаты лечения больных.

В настоящее время ТГСК и иматиниба мезилат рассматриваются как конкурирующие методы возможного полного излечения ХМЛ. Длительное (даже многолетнее) наблюдение как за больными, перенесшими ТГСК, так и за получающими ингибиторы тирозинкиназ, показывает, что у этих пациентов даже по прошествии длительного времени от начала лечения и установления стойкой ремиссии существует угроза рецидива, так что проблема мониторинга минимальной остаточной болезни весьма актуальна. Для отслеживания лейкозных клеток чаще всего используется метод ПЦР с обратной транскрипцией.

### 3.8. Мониторинг минимальной остаточной болезни при лейкозах

Результаты лечения лейкозов за последние годы значительно улучшились, однако пока еще у многих пациентов возникают фатальные рецидивы вследствие неполного уничтожения опухолевого клона. Разработка новых методов выявления и лечения пациентов со значительным риском рецидивов, возможно, позволила бы повысить эффективность терапии лейкозов.

Выжившие, не уничтоженные во время лечения, лейкозные клетки, персистирующие во время полной

гематологической ремиссии, представляют субстрат минимальной остаточной болезни. Эти клетки, размножаясь, могут послужить основой будущего рецидива. Во время полной гематологической ремиссии их не удается обнаружить с помощью обычных морфологических анализов крови и костного мозга, но можно выявить с помощью более чувствительных методик, таких как ПЦР с обратной транскрипцией, проточная цитометрия, FISH и некоторые другие (рис. 3.15).

Для объяснения того, как соотносится масса клеток, представляющих минимальную остаточную болезнь, с массой лейкозных клеток до лечения, приведем некоторые цифры: до лечения в организме больного ребенка содержится  $10^{12}$  злокачественных клеток, а при достижении ремиссии (менее 5% бластов в костном мозге) их количество снижается до  $10^{10}$ , т.е. они уже не видны при микроскопии, а уровень минимальной остаточной болезни составляет 1%. Современные методы позволяют выявить одну лейкозную клетку среди 10 000 нормальных, т.е. чувствительность методик, применяемых для мониторинга минимальной



Рис. 3.15. Различия в чувствительности лабораторных методов, используемых для выявления минимальной остаточной болезни

остаточной болезни, в 100 раз выше чувствительности морфологических методов.

Очень важно изучать минимальную остаточную болезнь на тех этапах (*временных точках*) болезни, которые наиболее информативны для оценки эффективности лечения и риска рецидива. Необходимо применять *высокочувствительные методы* и использовать адекватные *маркеры* лейкозных клеток.

Наибольшей чувствительностью обладает метод ПЦР. К сожалению, не у всех пациентов возможно его использование для мониторинга минимальной остаточной болезни, поскольку далеко не при всех лейкозах клетки несут специфические четкие маркеры, выявляемые этим методом. В частности, ПЦР не дает необходимой информации для мониторинга лейкозов с числовыми аномалиями кариотипа, а также с некоторыми делециями и транслокациями, при которых молекулярные перестройки пока точно не расшифрованы.

В настоящее время существует два способа отслеживать минимальную остаточную болезнь — два варианта мониторинга:

1) молекулярный мониторинг, включая мониторинг по химерным генам, а также по некоторым другим маркерам, определяемым при анализе ДНК или РНК;

2) иммунофенотипический мониторинг (мультипараметрическая проточная флуориметрия).

О первом методе уже упоминалось выше; в его основе лежит выявление лейкозных клеток со специфическими химерными генами, например *BCR-ABL*, *AML1-ETO*, *PML-RAR*, *AML1-TEL* и многими другими. Как уже было сказано, к сожалению, меньше чем половину лейкозов можно мониторить по известным химерным генам. Существуют и другие молекулярные маркеры, позволяющие отслеживать минимальную остаточную болезнь. В частности, используются изменения иммуноглобулиновых генов и генов Т-клеточных рецепторов, а также измененных

генов *FLT3*, *WT1*, *PRAME*. Изменения двух последних генов наблюдаются в 60–70% случаев ОМЛ.

Мультипараметрическая проточная флуориметрия выявляет так называемый «аберрантный иммунофенотип», т.е. обнаруживает необычное сочетание антигенов на поверхности лейкозных клеток. Это сочетание антигенов маркирует лейкозные клетки, создает возможность выявлять их и отслеживать остаточную болезнь в динамике. Метод с успехом применяется для мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах — лимфобластных и миелоидных, при первых значительно чаще. Оба названные метода могут быть использованы как в качественном, так и в количественном варианте. Второй вариант более информативен.

Качественный вариант позволяет получить ответ «да» или «нет» на вопрос, имеются ли лейкозные клетки в исследуемом материале. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией дает возможность получить сведения о массе клеток в организме больного. При повторных анализах, проводимых в ходе болезни и на разных этапах лечения, удается понять, происходит ли снижение или повышение экспрессии химерного гена (или другого маркера), и оценить степень этих изменений, а следовательно, оценить эффективность лечения. Этот подход позволяет также уловить приближение рецидива по нарастанию уровня маркера лейкозных клеток в костном мозге или периферической крови во время ремиссии.

Результаты исследования динамики минимальной остаточной болезни при различных лейкозах позволили установить, что если по окончании определенных курсов лечения не достигнут известный уровень падения количества лейкозных клеток (3 логарифма и более) — рецидив неизбежен. Кроме того, установлено, что появление или нарастание содержания маркера во время ремиссии означает начало так называемого молекулярного рецидива, за которым обычно следует гематологический рецидив. Так-

же установлено, что темп развития рецидива сильно различается у отдельных пациентов: так, при ОМЛ с хромосомной транслокацией t(8;21) срок от момента повышения уровня химерного транскрипта до гематологического рецидива может составлять у разных больных от 2 нед. до полутора лет. Для того чтобы предсказать быстро развивающиеся рецидивы, необходимо часто обследовать больных.

Остановимся на результатах применения молекулярного мониторинга минимальной остаточной болезни при некоторых лейкозах.

**Острые лимфобластные лейкозы.** Несмотря на то, что за последние годы результаты лечения этой группы лейкозов у детей значительно улучшились и доля пациентов, переживших 10-летний рубеж, близка к 70%, прогнозирование рецидивов не потеряло смысла. Изучение динамики минимальной остаточной болезни признается весьма информативным в этом отношении. Так, было показано, что при сохранении минимальной остаточной болезни после окончания курсов индукции ремиссии риск рецидива значительно выше, чем у пациентов с негативными показателями на этом этапе. Обнаружение лейкоэмических маркеров еще позже свидетельствует о еще более высоком риске рецидива: например, при выявлении резидуальных клеток на 14-й нед. от начала лечения доля больных, у которых впоследствии развились рецидивы, приближалась к 70%, а при негативных показателях на этом сроке рецидивы диагностированы примерно в 17% случаев. У всех больных, у которых минимальная остаточная болезнь выявлена на 32-й нед., возникли рецидивы. По данным этих авторов, риск рецидива максимально высок, если по окончании индукции ремиссии количество лейкозных клеток превышает  $10^{-2}$ , минимален риск минимальной остаточной болезни при уровне лейкозных клеток порядка  $10^{-4}$ .

Большое значение имеет мониторинг минимальной остаточной болезни при Ph-позитивном ОЛЛ:

прогноз значительно лучше у тех пациентов, у которых удается добиться молекулярной ремиссии. В настоящее время удается добиться увеличения продолжительности ремиссии (соответственно, и жизни) после пересадки костного мозга, включив в программу лечения препараты для редукции остаточной болезни, в том числе различные ингибиторы тирозинкиназ; стало возможным также регулирование интенсивности лечения в зависимости от показателей минимальной остаточной болезни.

**Острый промиелоцитарный лейкоз.** Несмотря на то, что при этом типе лейкоза в настоящее время удается получить длительные ремиссии более чем у 70% пациентов, рецидивы все еще возможны, их частота составляет около 20%. Причем подавляющее большинство рецидивов — поздние, они развиваются по истечении 2 лет от начала ремиссии.

При изучении показателей минимальной остаточной болезни в ходе лечения и в период длительной ремиссии получены четкие данные, совпадающие у разных авторов и свидетельствующие о важном прогностическом значении результатов мониторинга минимальной остаточной болезни. Наиболее важно проведение мониторинга минимальной остаточной болезни у пациентов с повышенным риском рецидива: инициальным уровнем лейкоцитов от 10 000 и выше в  $1 \text{ мм}^3$  или с задержкой ПЦР-позитивности после третьего курса консолидации (см. ниже).

Этот вопрос изучается около десяти лет, главным образом, с применением качественной ПЦР с обратной транскрипцией. При наблюдении за большими группами пациентов регистрируется сходная динамика: на определенном сроке от начала лечения химерный транскрипт *PML-RAR $\alpha$*  исчезает — наступает молекулярная ремиссия, причем в подавляющем большинстве случаев (90–95%) это происходит после 2–3-го курса консолидации, хотя примерно в половине случаев «молекулярная ремиссия» достигается уже по окончании курсов индукции. Однако период времени

по окончании курсов индукции не считается информативным в смысле риска рецидива. Персистирование транскрипта (ПЦР-позитивность) после окончания курсов консолидации обычно предвещает скорый рецидив, и пациенты, не получившие аллоТГСК при задержке ПЦР-позитивности, погибают от рецидивов. Этот вывод был подтвержден в 2004 г. при анализе результатов лечения 910 пациентов с ОПЛ. У 673 из 910 пациентов удалось провести консолидацию, после которой 650 больных достигли ПЦР-негативности, а у 23 химерный транскрипт в костном мозге сохранялся. В 7 из этих 23 случаев проведена интенсивная терапия до начала гематологического рецидива: у 3 больных это была химиотерапия с аутоТГСК, 4 пациентам проведена аллоТГСК. Эти 7 пациентов живы, ремиссия у них сохраняется более 64–118 мес. Из остальных 16 пациентов, которых начали лечить уже во время развившегося гематологического рецидива, выжили только 2 — именно те, кому была произведена аллоТГСК. Этот пример — ярчайшая иллюстрация опасности задержки транскрипта после проведения консолидации, он же демонстрирует необходимость профилактической (до наступления истинного рецидива) аллоТГСК как единственного шанса спасения таких пациентов.

Второй опасный момент — появление химерного транскрипта в ходе ремиссии, после периода ПЦР-негативности. Это обычно знаменует наступление молекулярного рецидива, вслед за которым следует настоящий гематологический рецидив в сроки от 2 до 6 мес., в среднем через 3 мес. Однако описаны и более длительные сроки от регистрации молекулярного рецидива до наступления рецидива гематологического — 18 мес. Таким образом, полученные фактические данные диктуют необходимость проведения молекулярного мониторинга минимальной остаточной болезни при МЗ с забором проб не реже чем 1 раз каждые 2–3 мес. Более того, у пациентов с инициальным уровнем лейкоцитов от 10 000 и выше в  $1 \text{ мм}^3$  пробы костного мозга должны исследоваться каждый месяц, потом

1 раз в 2 мес. в течение первого года после окончания консолидации, а уже на 2-м и 3-м году перерывы между пробами не должны быть больше 3 мес. При смене ПЦР-негативности на ПЦР-позитивность следует повторить анализ примерно через 2 нед., и, если положительный результат подтвердится, это будет свидетельством молекулярного рецидива, который нужно лечить. В литературе есть сообщения о существенном увеличении продолжительности жизни больных ОПЛ при интенсивном лечении молекулярного рецидива (рис. 3.16).

Применению количественной ПЦР с обратной транскрипцией для мониторинга минимальной остаточной болезни при ОПЛ посвящено не так много работ, которые подтвердили выводы, основанные на результатах исследований, о которых сказано ранее. Однако пока эти работы не прояснили вопрос, возможно ли прогнозирование *всех* рецидивов при ОПЛ на сроках, позволяющих провести лечение и предупредить (отменить) развитие истинных рецидивов?

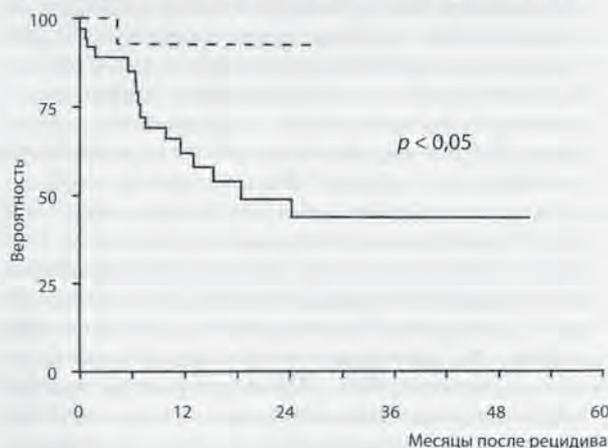


Рис. 3.16. Кривые выживаемости по Каплану—Майеру при лечении молекулярных (пунктир) и истинных рецидивов при ОПЛ (Diverio et al., 1999)

Авторами одной из последних статей, посвященных результатам применения количественного метода ПЦР в реальном времени для мониторинга минимальной остаточной болезни при ОПЛ, был обнаружен параллелизм между уровнем транскрипта *PML/RARα* после первой консолидации и прогнозом: рецидивы развились у 6 из 7 пациентов с уровнем транскрипта больше чем  $10^{-3}$  и только у 3 из 62 пациентов с более низким уровнем. Всего удалось изучить динамику минимальной остаточной болезни у 69 пациентов, причем у 9 из них развились гематологические рецидивы. К сожалению, только в 4 из 9 случаев до гематологического зарегистрирован молекулярный рецидив, причем между этими событиями прошло от 2 до 18 мес. У остальных больных повышения уровня транскрипта перед истинным рецидивом не выявлено. Авторы считают, что их протокол мониторинга предполагал слишком большие перерывы между заборами проб (сначала 6 мес., затем 3), что и помешало выявить молекулярный рецидив.

Возможно, применение количественной оценки уровня химерного транскрипта в крови через короткие интервалы времени позволит усовершенствовать протоколы мониторинга минимальной остаточной болезни при ОПЛ.

При **ОМЛ с транслокацией t(8;21)** прогнозирование рецидивов весьма актуально, поскольку их частота при этом варианте лейкоза превышает 30%, причем рецидивы могут наблюдаться и на первом году ремиссии. Рациональный протокол мониторинга минимальной остаточной болезни для практического применения в клинике пока не создан, хотя работа в этом направлении постоянно ведется. Характерный транскрипт *AML1-ETO* обнаружен у всех больных не только до лечения; у большинства пациентов он определяется на разных сроках полной гематологической ремиссии.

В последние годы опубликованы сообщения о том, что транскрипт *AML1-ETO* перестает обнаружи-

ваться у многих больных, находящихся в длительной полной ремиссии, достигнутой в результате применения современных химиотерапевтических программ или ТГСК. Причем конверсия от ПЦР-положительности к стойкой ПЦР-негативности обычно сочетается с последующей стойкой, длительной гематологической ремиссией.

Большинство авторов считает, что при этом варианте ОМЛ решающую роль для прогнозирования рецидивов играет *количественная модификация ПЦР* (ПЦР в реальном времени, или конкурентная). Именно количественная оценка экспрессии химерного гена позволяет поставить *диагноз молекулярного рецидива* и *предсказать гематологический рецидив* по повышению уровня транскрипта (рис. 3.17).

К настоящему времени опубликованы сведения о результатах использования количественной ПЦР с обратной транскрипцией для длительного мониторинга нескольких сотен случаев ОМЛ с транслокацией t(8;21). Установлено снижение экспрессии химерного гена *AML1-ETO* у подавляющего большинства пациентов под влиянием лечения. Получены данные, свидетельствующие о том, что риск рецидива существенно выше у больных, у которых после первых трех-четырёх месяцев лечения экспрессия химерного гена снижалась менее чем на 3 логарифма. К сожалению, анализ полученных результатов показывает, что возможности индивидуального прогнозирования течения этого варианта ОМЛ пока ограничены: большинство рецидивов обнаружено уже в стадии четких морфологических проявлений, даже при проспективном исследовании. Точный и хорошо воспроизводимый метод ПЦР в реальном времени весьма дорогостоящ, а для получения надежного результата требуются многочисленные повторные анализы. В настоящее время практически никому не удастся провести столько анализов, сколько это необходимо для оценки отдаленного прогноза у подавляющего большинства пациентов.

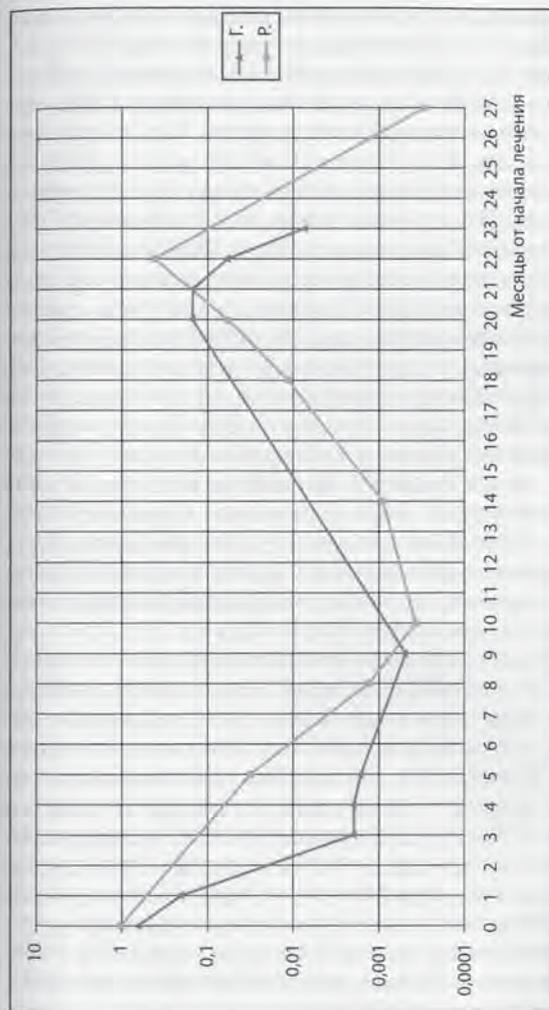


Рис. 3.17. Динамика изменений уровня химерного транскрипта *AML1-ETO* у двух (Г. и Р.) больных ОМЛ-М2 (количественная ПЦР в реальном времени, собственные данные)

На основании данных лаборатории цитогенетики РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (2005) и отдельных недавних публикаций мы пришли к заключению, что мониторинг минимальной остаточной болезни с помощью качественной ПЦР с обратной транскрипцией может давать весьма полезную в прогностическом отношении информацию. Так, длительная ПЦР-негативность обычно сопутствует стойкой гематологической ремиссии и никогда не предшествует рецидиву. В то же время длительное сохранение ПЦР-позитивности или смена стойкой ПЦР-негативности на ПЦР-позитивность должны настораживать. В этом случае реальный риск рецидива может быть оценен только по результатам двух-трех повторных анализов, выполненных с применением количественного метода, позволяющего определить степень нарастания уровня экспрессии химерного гена. Одновременное исследование крови и костного мозга дает возможность точнее оценивать риск рецидива, чем анализ только костного мозга или только периферической крови. Иногда молекулярный рецидив может быть выявлен по периферической крови, а не по костному мозгу, в других же случаях более информативны показатели костного мозга.

Работа по динамическому изучению минимальной остаточной болезни (мониторинг) позволила выявить много новых фактов, важных для понимания сути гематологической ремиссии и рецидива при ОМЛ. В частности, обнаружены огромные различия между показателями уровня экспрессии химерного гена в пробах, взятых у разных пациентов до лечения, однако нет параллелизма между уровнем транскрипта и количеством бластов в тех же пробах. Это позволяет предполагать, что клетки разных пациентов могут экспрессировать разное количество химерной РНК. Кроме того, выявлена неоднородность группы ОМЛ с транслокацией  $t(8;21)$  по темпам снижения экспрессии гена *AML1-ETO* во время лечения и по скорости развития рецидива. Эти факты свидетельствуют о

биологических различиях между лейкозными клетками у разных пациентов.

Предстоит еще большая исследовательская работа как для увеличения прогностических возможностей современных протоколов мониторинга минимальной остаточной болезни при ОМЛ с транслокацией  $t(8;21)$ , так и для углубления знаний о связи между биологическими особенностями лейкозных клеток при этом заболевании и ответом на терапию.

**Хронический миелолейкоз.** Мониторинг минимальной остаточной болезни при ХМЛ приобрел большое значение в последние годы — как при лекарственном лечении, так и при ТГСК, поскольку оценка эффективности терапии и возможность приближения рецидива остается необходимой при всех вариантах терапевтических программ. Например, рецидивы были зарегистрированы даже спустя 21 год после ТГСК. Их частота тесно ассоциирована с показателями минимальной остаточной болезни. В сроки 6–12 мес. после ТГСК рецидивы развиваются более чем в 40% случаев при обнаружении транскрипта *BCR-ABL* и только у 3% больных, если транскрипт не определяется. Однако простое выявление химерного транскрипта после ТГСК без его количественной оценки в динамике должно восприниматься с известной долей осторожности и не может служить основанием для назначения агрессивной терапии. У многих больных химерный транскрипт *BCR-ABL* выявляется по истечении нескольких лет после ТГСК, далеко не всегда предвещая скорый рецидив. Большинство исследователей обнаруживает *BCR-ABL*-транскрипт у 25–55% больных через 3 года после ТГСК, рецидивы же были зафиксированы не у всех, а у 8–10% этих пациентов. Известный прогресс в изучении остаточной болезни при ХМЛ и, в частности, после ТГСК достигнут благодаря количественному определению уровня транскрипта в крови и костном мозге пациентов в ходе клинической и цитогенетической ремиссии. Так, было четко показано, что стойкая ремиссия сопровождается стабиль-

ным низким уровнем транскрипта, а рецидиву предшествует повышение этого показателя (молекулярный рецидив). Сейчас ведутся интенсивные исследования по разработке рациональных протоколов мониторинга ХМЛ при разных вариантах терапии.

Еще в 1994 г. было показано, что для изучения динамики минимальной остаточной болезни при ХМЛ периферическая кровь подходит не меньше, чем костный мозг. В самое последнее время эти данные были неоднократно подтверждены, и теперь настоятельно рекомендуется использовать именно периферическую кровь, поскольку ее забор несравненно менее травмирует больного, чем взятие пунктата костного мозга, и позволяет изучать продукцию химерного гена через короткие интервалы времени, тем самым повышая возможность ранней диагностики молекулярного рецидива.

Для отслеживания лейкозных клеток при ХМЛ можно использовать FISH, поскольку это позволяет быстро получать ответ, причем *на клетках крови, а не костного мозга*. Применение FISH оказывается единственно возможным цитогенетическим способом слежения за Ph-положительным клоном в случаях, когда под влиянием лекарственных препаратов количество делящихся клеток в костном мозге резко снижается. Это затрудняет стандартный хромосомный анализ или исключает его. С другой стороны, общепринятые FISH-зонды дают довольно высокий процент клеток с ложноположительным сигналом (около 15%), что затрудняет оценку эффективности лечения.

В мае 2006 г. были опубликованы рекомендации международной группы экспертов по применению хромосомного и молекулярного анализов в ходе лечения ХМЛ у пациентов, вновь выявленных в хронической фазе болезни. Без выполнения этих анализов современное лечение ХМЛ невозможно. Согласно указанным рекомендациям, начинать лечение с иматиниба мезилата следует в суточной дозе 400 мг. Повышение дозы иматиниба мезилата, аллоТГСК или

какой-либо другой тип терапии показаны при недостаточной эффективности лечения или субоптимальном ответе. Если через 3 мес. от начала лечения нет полной гематологической ремиссии, это расценивается как неудача, так же как и отсутствие цитогенетического ответа или неполная гематологическая ремиссия после 6 мес. лечения. На более поздних сроках лечения неблагоприятной считают ситуацию, когда после 12 мес. терапии количество Ph-положительных клеток в костном мозге превышает 35%, или после 18 мес. нет полной цитогенетической ремиссии. Как неудачу, естественно, расценивают случаи срыва (утраты) полной гематологической или цитогенетической ремиссии либо появление мутаций в химерном гене *BCR/ABL*, обеспечивающих резистентность к иматиниба мезилату. Субоптимальный ответ определяют на тех же сроках. На 3-м месяце это неполная гематологическая ремиссия, на 6-м — количество Ph-положительных клеток в костном мозге, превышающее 35%, на 12-м — отсутствие полной цитогенетической ремиссии, на 18-м — невозможность достижения или утрата большого молекулярного ответа, а также появление новых мутаций или новых хромосомных аномалий. Подчеркивается важность цитогенетического и молекулярно-генетического (в количественном варианте) мониторинга минимальной остаточной болезни.

Время для окончательной оценки эффективности использования иматиниба мезилата при ХМЛ еще не пришло: только с 2001 г. препарат начали применять у ранее не леченных пациентов. Буквально каждый год появляется несколько статей, в которых сообщается о новых практически важных наблюдениях. Так, в 2006 г. были опубликованы данные о том, что у пациентов, которых начали лечить иматиниба мезилатом в поздней хронической фазе ХМЛ, не обнаружено снижения показателей выживаемости в зависимости от времени достижения полной цитогенетической ремиссии: доля больных, переживших без рецидива 3–4 года и более, не различалась в группах с относитель-

но ранним полным цитогенетическим ответом (в течение первых 12 мес.) и с более поздним ответом (15–40 мес.) — 92 и 100% соответственно. Авторы приходят к заключению, что если у пациента в поздней хронической фазе ХМЛ на первом году лечения иматиниба мезилатом был цитогенетический ответ, но он не был полным, то есть основания думать, что полный ответ может наступить несколько позже, при этом нет угрозы рецидива и не требуется резкое изменение тактики лечения.

### 3.9. Лейкозы с нормальным кариотипом

Выделение этого раздела обусловлено важностью проблемы, необходимостью подчеркнуть мысль о том, что *отсутствие аномального клона при стандартном цитогенетическом анализе само по себе не может служить прогностическим критерием.*

При любом морфологическом варианте лейкоза наблюдается известная доля случаев, где удается обнаружить только клетки с нормальным кариотипом. Причем есть морфологические варианты, где доля таких случаев высока; среди ОМЛ это М5, среди лимфобластных лейкозов — Т-клеточные лейкозы; у большинства пациентов с ювенильным ХМЛ кариотип также не изменен.

Остановимся на некоторых возможных причинах обнаружения нормального кариотипа при лейкозах.

1) *Субмикроскопические перестройки.* Выше уже неоднократно говорилось, что перестройки хромосом могут быть небольшими, т.е. их *величина может быть ниже разрешающей способности обычного светового микроскопа.* Ярким примером являются инсерции фрагмента гена *PML* в ген *RARα* или, наоборот, — гена *RARα* в ген *PML* при ОПЛ. При таких перестройках происходит образование типичного химерного гена *PML-RARα* не за счет обмена большими (видимыми в

*световом микроскопе) фрагментами хромосом, как при стандартной транслокации t(15;17), а за счет субмикроскопической инсерции.* Субмикроскопические инсерции могут иметь место и при формировании ряда других химерных генов, в частности *BCR-ABL*, *AML1-ETO*. Выявить такие «скрытые» химерные гены можно с помощью молекулярно-генетических методик (FISH, ПЦР). Известно также, что изменения гена *MLL* (мутации, амплификация) примерно в 6–10% случаев могут быть обнаружены только молекулярными методами; это очень важно, поскольку их выявление предсказывает, как правило, неудовлетворительный ответ на лечение. Есть сообщения и о точковых мутациях генов *AML1* и *C/EBP*. Прогностическое значение этих мутаций выясняется.

2) Как известно, при стандартном хромосомном анализе исследуются только делящиеся элементы, следовательно, одной из причин обнаружения в материале только клеток с нормальным кариотипом является *низкий митотический индекс* лейкозных клеток с числовыми или структурными изменениями хромосом. Митотический индекс может меняться на разных сроках культивирования лейкозных клеток: на одном сроке могут делиться лишь стромальные элементы с неизменным кариотипом, а на другом — удается выявить лейкозный клон. В связи с этим, если не обнаружен аномальный клон, рекомендуется производить хромосомный анализ не только на одном сроке культивирования клеток, а на двух-трех.

3) Иногда *опухольный клон невелик* и «ускользает» от анализа, если исследуется небольшое количество клеток. Применение FISH с использованием зондов на характерные аномалии кариотипа позволит в таких ситуациях провести анализ большего количества клеток и «поймать» небольшой клон с наличием изменений.

4) *«Технические» причины: качество хромосомных препаратов,* затрудняющее анализ. Общеизвестно, что на цитогенетических препаратах соседствуют

нормальные и аномальные метафазы. Вторые выглядят обычно менее «красивыми», их труднее расшифровать, и поэтому исследователь может невольно пропустить их и взять в анализ только «красивые», нормальные клетки, а в результате аномальные не будут изучены.

Приведенные факты показывают, что результат цитогенетического анализа с заключением о нормальном кариотипе не может служить самостоятельным критерием диагноза и прогноза, а требует дополнительного исследования с привлечением молекулярно-генетических методов для того, чтобы разобраться, какие именно изменения скрыты за нормальным кариотипом.

\* \* \*

Результаты многолетних морфоцитогенетических исследований показывают, какое важное место занимает хромосомный анализ в комплексе современных лабораторных методов диагностики и прогнозирования в онкогематологии. Отдельные варианты лейкозов удалось выделить и охарактеризовать благодаря цитогенетическому методу. Это относится главным образом к различным миелопролиферативным процессам у детей, которые в начале заболевания невозможно отличить от ХМЛ. Однако каждый опытный гематолог знает, что постановка диагноза базируется на морфологических особенностях лейкозных клеток, детали же уточняются с помощью дополнительных лабораторных методов, среди которых лидирует хромосомный анализ.

Прогностическое значение хромосомного анализа невозможно переоценить, и многие современные программы лечения лейкозов используют результаты цитогенетического исследования при планировании «риск-адаптированной» терапии. Однако хромосомному анализу, как и любому лабораторному методу присущи определенные недостатки и, прежде всего, это не очень высокая чувствительность и меньшая разрешающая способность по сравнению с молекулярно-

генетическими методиками. Наибольшая точность диагностики и прогнозирования достигается при рациональном сочетании классического хромосомного анализа с различными молекулярно-генетическими, цитохимическими и иммунофенотипическими исследованиями.

Остается еще много вопросов, решение которых необходимо для более успешного применения хромосомного анализа в клинике лейкозов. Это, прежде всего, оценка практического значения редких неслучайных цитогенетических и молекулярно-генетических аномалий. Кроме того, чрезвычайно важно выяснять прогностическое значение отдельных изменений кариотипа при использовании конкретных лечебных программ. Необходима разработка рациональных протоколов мониторинга минимальной остаточной болезни.

Решение указанных проблем возможно лишь с помощью больших многоцентровых исследований.

#### Основная литература

1. Флейшман Е. В. Клиническое значение хромосомного анализа в онкогематологии. В кн: Клиническая онкогематология/Под ред. Волковой М. А. — М., 2007.
2. Bienz M., Ludwig M., Mueller B. U. et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype // Clin. Canc. Res. — 2005. — Vol. 11. — P. 1416–1424.
3. Breccia M., Diverio D., Noguera N. I., et al. Clinicobiological features and outcome of acute promyelocytic leukemia patients with persistent polymerase chain reaction-detectable disease after AIDA front-line induction and consolidation therapy // Haematologica. — 2004. — Vol. 89 (1). — P. 29–33.
4. Brunning R. D., Matutes E., Harris N. L. et al. Summary of the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 2001.
5. Cimino G., Pane F., Elia L. et al. The role of BCR/ABL isoforms in the presentation and outcome of patients with

- Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: a seven-year update of the GIMEMA 0496 trial // *Haematologica*. — 2006. — Vol. 91. — P. 377–380.
6. *Farag S. S., Ruppert A. S., Mrozek K. et al.* Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with normal karyotype: A Cancer and Leukemia group study // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 482–493.
  7. *Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome of 1, 612 patients entered into the MRC AML 10 trial // *Blood*. — 1998. — Vol. 92. — P. 2322–2323.
  8. *Grimwade D., Lo Coco F.* Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia // *Leukemia*. — 2002. — Vol. 16. — P. 1959–1973.
  9. *Harrison Ch.* The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood Reviews*. — 2001. — Vol. 15. — P. 49–59.
  10. *Hasford J., Pfirman M., Sheperd P. et al.* The impact of the combination of baseline risk group and cytogenetic response on the survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon- $\alpha$  // *Haematologica*. — 2005. — Vol. 90. — P. 335–340.
  11. *Johansson B., Fioretos T., Mitelman F.* Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia // *Acta Haematologica*. — 2002. — Vol. 107. — P. 76–94.
  12. *Jones L. K., Saha V.* Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia of childhood // *Brit. J. Haematol.* — 2005. — Vol. 130. — P. 489–500.
  13. *Meshinchi S., Woods W. G., Stirewalt D. et al.* Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia // *Blood*. — 2001. — Vol. 97. — P. 89–94.
  14. *Rowley J. D.* Chromosome translocations revisited // *Nat. Rev. Cancer*. — 2001. — Vol. 1. — P. 245–250.
  15. *Wells R. I., Arthur D. C., Srivastava A. et al.* Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children Cancer group study 213 // *Leukemia*. — 2002. — Vol. 16. — P. 601–607.

## Глава 4

### АПОПТОЗ

А.Ю. Барышников

Гомеостаз у млекопитающих контролируется не только клеточной пролиферацией и дифференцировкой, но также клеточной смертью, являющейся важной составляющей общебиологических процессов. Наиболее частая форма клеточной смерти — некроз, который вызывается повреждением клетки прямой травмой, токсическими агентами (активные мембранные вещества и токсины), гипоксией и ишемией, клеточным лизисом, опосредованным комплементом, и т.д. Около 20 лет назад была описана другая форма клеточной смерти, названная запрограммированной клеточной смертью, или апоптозом, которая отличается от некроза как по биохимическим, так и по морфологическим признакам. Морфологически апоптоз характеризуется последовательными изменениями в ядре клетки, связанными с перевариванием хроматина и приводящими к фрагментации ДНК на части по 180 пар оснований в каждой. Морфологически апоптоз проявляется сморщиванием клет-

ки и уменьшением ее размера, конденсацией хроматина по периферии ядерной мембраны, распадом на несколько ядрышек. Эти ядрышки покрываются цитоплазматической мембраной, и клетка распадается на несколько апоптотических телец, которые затем фагоцитируются макрофагами. В отличие от некроза апоптоз проявляется в разбросанных отдельных клетках асинхронно и не ассоциирован с воспалением, т.е. он более физиологичен.

Апоптоз — фундаментальный биологический процесс, необходимый для удаления поврежденных, старых и инфицированных клеток. Он имеет большое значение в цикле развития различных организмов, включая гельминтов, насекомых, амфибий, птиц, рыб и млекопитающих. Апоптоз занимает ведущее место в эмбриогенезе и инволюции тканей, поддержании гомеостаза, сохранении клеточного баланса в физиологических условиях, при удалении клеток с генетическими повреждениями, лучевых повреждениях, росте и терминальной дифференцировке. Он участвует в удалении избытка клеток, особенно в нервной и иммунной системах. В настоящее время ясно, что запрограммированная клеточная смерть является важным механизмом поддержания корректного числа клеток в многоклеточном организме.

Апоптоз вовлечен в механизм развития большого количества заболеваний у человека. Предполагается, что развитие лейкоза и опухолевый рост являются результатом дисбаланса между пролиферацией клеток и запрограммированной клеточной смертью.

Процесс апоптоза структурно может быть разделен на четыре независимые фазы: фаза инициации, эффекторная фаза, фаза деградации и фаза очистки.

Фаза инициации может быть достигнута самыми различными путями: удалением факторов роста и метаболизма, гипоксией, гипероксией, субнекротическим поражением химическими реагентами, физическими агентами, перекрестным связыванием соот-

ветствующих рецепторов, нарушением сигналов клеточного цикла.

За фазой инициации следует эффекторная фаза, в ходе которой происходит активация каспазной системы клетки. В течение этой фазы различные иницирующие пути конвертируются в один общий или несколько путей апоптоза.

Вслед за эффекторной фазой наступает фаза деградации клетки, характеризующаяся деструкцией клеточного материала. Фаза деградации — общая для всех иницирующих путей. На этом этапе наблюдаются нуклеазная, протеазная и липазная гиперактивность, что неизбежно ведет к дезинтеграции клеточных подсистем. Формирующиеся в результате сложных и многообразных процессов деградации апоптотические тельца покрыты мембраной, что исключает возможность утечки агрессивной внутриклеточной среды в межклеточное пространство. Кроме того, в фазе деградации тканевая транслугаминаза свободно проходит внутрь апоптотирующей клетки и формирует сшивки между белками с образованием протеиновой сети, фиксирующей клеточное содержимое.

В финальной фазе апоптоза — фазе очистки — умирающая клетка поглощается макрофагами, что обеспечивает отсутствие воспалительных реакций, связанных с выбросом в межклеточное пространство продуктов деградации.

Выявлен поверхностный клеточный рецептор, воспринимающий сигнал апоптоза, и лиганд этого рецептора. Апоптоз нормальных и злокачественных клеток индуцируется при участии рецепторно-лигандной системы CD95/FasL [7]. Рецептор, опосредующий апоптоз, стали именовать APO-1 или Fas по названию моноклональных антител, выявляющих его. Затем на Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека он был обозначен как CD95. В литературе он встречается под всеми тремя названиями — CD95, APO-1 или CD95(Fas/APO-1).

CD95-антиген — это гликозилированный трансмембранный протеин с молекулярной массой 45–52 кДа, относящийся к суперсемейству TNF-рецепторных молекул. В состав данного суперсемейства входят два типа рецепторов фактора некроза опухолей (TNF-R1 и TNF-II), низкоаффинный фактор роста нервов (NGF), Т-клеточный активационный антиген CD27, антиген CD30, ассоциированный с лимфомой Ходжкина, В-клеточный антиген CD40 и некоторые иные гомологи молекул млекопитающих и вирусов.

Человеческий Fas-антиген (CD95) относится к мембранным белкам I типа. Функционально активная мембранная форма CD95-антигена является гомотримером. Каждая из входящих в его состав гликопротеиновая молекула состоит из 320–335 аминокислотных остатков.

В структуре Fas-молекулы выделяют следующие регионы:

1) внеклеточный, построенный из трех обогащенных цистеином доменов и состоящий примерно из 160 аминокислотных остатков, закодированных в пяти первых экзонах;

2) трансмембранный, закодированный в шестом экзоне (17 аминокислот);

3) внутриклеточный, соответствующий седьмому-девятому экзонам, кодирующий примерно 150 аминокислот.

Гомология между членами суперсемейства рецепторов TNF/NGF обычно ограничена внеклеточными доменами. CD95 дополнительно имеет значительную гомологию с TNF-рецептором I типа во внутриклеточной части (около 80 аминокислот); 70 аминокислот во внутриклеточной области необходимо и достаточно для передачи сигнала смерти. Мутационный анализ подтвердил, что эта консервативная область существенна для CD95 и TNF-рецепторов при передаче сигнала смерти. Этот домен называют

доменом смерти, так как в обеих молекулах он передает сигнал смерти.

Мутации гена Fas приводят к экспрессии неактивных продуктов. Врожденные или приобретенные дефекты гена Fas ассоциированы с лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями. Подобная стратегия защиты от апоптоза реализуется и в опухолевых клетках. Соматические мутации гена, кодирующие CD95-антиген, описаны при злокачественных лимфомах. Подобные мутации известны для многих линий опухолевых клеток как лимфоидного, так и нелимфоидного ряда. Существуют растворимые формы CD95-антигена, образующиеся за счет альтернативного сплайсинга матричной РНК. Растворимый Fas-протеин конкурирует с локализованным на мембране рецептором CD95 в связывании лиганда и может ингибировать CD95-опосредованный апоптоз *in vitro*. Мономерная форма растворимого CD95-антигена блокирует центры связывания Fas-лиганда с мембранным CD95. Обнаружено существование не только мономерного, но и олигомерного растворимого CD95-антигена. Повышение сывороточного уровня растворимого CD95-рецептора обнаружено при определенных В- и Т-клеточных лейкозах, аутоиммунных заболеваниях и имеет прогностическое значение [2].

Антиген CD95 экспрессирован у человека на кортикальных тимоцитах, активированных Т- и В-клетках, покоящихся лимфоцитах, моноцитах и нейтрофилах. Антиген CD95 экспрессирован как на CD4<sup>+</sup>-, так и на CD8<sup>+</sup>-субпопуляциях лимфоцитов человека. На нормальных лимфоцитах взрослых людей экспрессия CD95-антигена регулируется интерлейкином-2 (ИЛ-2),  $\gamma$ -интерфероном или суперантигенами. Экспрессия антигена повышается при активации Т-клеток моноклональными антителами против CD3-антигена.

CD95-антиген обнаружен также на клетках лимфатических узлов. Его сильно экспрессируют клетки зародышевых центров лимфатических узлов, кото-

рые высокочувствительны к CD95-опосредованному апоптозу. В-клетки мантийной зоны, напротив, слабо экспрессируют CD95-антиген и устойчивы к CD95-опосредованному апоптозу. CD95-антиген сильно экспрессирован на Т-лимфоцитах, выделенных из смывов легких здоровых людей и больных саркоидозом. Такие Т-клетки более чувствительны к апоптозу, чем Т-лимфоциты периферической крови.

Нейтрофилы по сравнению с другими клетками экспрессируют относительно низкий уровень CD95-антигена. Вне иммунной системы CD95 определен в нормальных человеческих клетках различных типов, включая диплоидные фибробласты, гепатоциты, кератиноциты, эпителии и мезенхимальные клетки некоторых типов.

Уровень CD95-антигена на лимфоцитах периферической крови зависит от возраста человека. У новорожденных он экспрессирован очень слабо. У старших детей и здоровых взрослых людей продемонстрировано повышение экспрессии антигена, которое прогрессивно увеличивается с возрастом. Аналогичным образом с возрастом изменяется восприимчивость клеток к CD95-опосредованному апоптозу.

CD95-лиганд, называемый также Fas-лигандом (FasL), — это трансмембранный белок с молекулярной массой 40 кДа. CD95-лиганд является членом суперсемейства лигандов TNF, которые относятся к цитокинам. Члены суперсемейства TNF-рецептора являются мембранными гликопротеидами I типа с ограниченной гомологией (общих гомологов — 25–30%) во внеклеточном домене, содержащем переменное количество обогащенных цистеином последовательностей. В противоположность этому, члены суперсемейства TNF-лиганда (за исключением LT-альфа) являются мембранными гликопротеидами II типа с ограниченной гомологией к TNF (общих гомологов — 20%) во внеклеточной области.

CD95-лиганд опосредует гибель клеток путем перекрестного связывания с CD95-рецептором

в чувствительных к апоптозу клетках. Покоящиеся Т-лимфоциты не экспрессируют CD95-лиганд. Он в избытке экспрессирован на активированных Т- и В-лимфоцитах. Другие гемопоэтические клетки не имеют CD95-лиганда.

Подобно TNF-лиганду, CD95-лиганд может освобождаться с клеточной поверхности с помощью внеклеточных матриксных металлопротеиназ и быть физиологически активным в растворимой форме, сохраняя способность связывать CD95-антиген. Как и другие лиганды белков семейства рецепторов TNF, Fas-лиганд является гомотримером, причем справедливо это не только для мембранной, но и для растворимой формы.

Спонтанный апоптоз может происходить в клетках различных типов. Особенно он выражен при кратковременном культивировании клеток периферической крови *in vitro* без добавления в культуральную среду каких-либо гуморальных факторов. Лимфоциты периферической крови не подвергаются спонтанному апоптозу при культивировании в течение 24 часов. Все нейтрофилы погибают путем апоптоза, который регистрируется различными методами. Среди моноцитов таким путем погибает только малая часть клеток.

Моноклональные антитела против CD95-антигена индуцируют апоптоз только в CD95<sup>+</sup>-клетках. Молекула CD95 сама по себе не убивает клетку, а лишь участвует в передаче сигнала смерти. CD95-опосредованный апоптоз — чрезвычайно быстрый процесс, который обнаруживается уже через 1 час после начала инкубации клеток с моноклональными антителами против CD95-антигена. Апоптоз, индуцированный моноклональными антителами против CD95-антигена, не чувствителен к ингибированию циклоспорином А, циклогексимидом и актиномицином D. CD95-антиген экспрессирован как на покоящихся, так и на активированных лимфоцитах. Однако апоптоз можно индуцировать только в лим-

фоцитах, активированных в течение 4 дней и более. Часть CD95<sup>+</sup>-активированных Т-клеток является резистентной к CD95-опосредованному апоптозу после активации. Присутствие CD95-антигена на поверхности клетки — обязательное условие индукции апоптоза с помощью моноклональных антител против CD95-антигена в опухолевых клетках. Однако следует подчеркнуть, что моноклональные антитела не всегда индуцируют запрограммированную клеточную смерть. При одинаковом количестве CD95-антигена на злокачественных клетках моноклональные антитела могут или индуцировать апоптоз, или вызывать стимуляцию пролиферации опухолевых клеток, или же не оказывать никакого воздействия. Добавление к клеткам различных ингибиторов синтеза белка может изменять спектр биологических ответов, инициируемых моноклональными антителами против CD95-антигена. Комбинация моноклональных антител анти-CD95 с циклогексимидом приводит в 90% случаев к ингибированию пролиферации CD95-положительных опухолевых клеток. Fab-фрагменты моноклональных антител против CD95-рецептора не индуцируют апоптоз, так как для индукции необходимо перекрестное связывание рецептора.

В последние годы интенсивно изучается механизм передачи сигнала от CD95-рецептора с клеточной поверхности к ядру. В основе механизма индукции апоптоза лежит олигомеризация находящихся на мембране Fas-молекул. После того как Fas-лиганд присоединяется к мембранному CD95-антигену, последний изменяет свою конформацию так, что домен смерти оказывается способным связываться с подмембранными цитоплазматическими белками группы FADD/Mort-1. Последние связываются с прокаспазой-8, неактивной протеиназой, относящейся к семейству каспаз. В результате образуется комплекс, в состав которого входят CD95, FADD и прокаспазы-8, называемый DISC (сигнальный комплекс, индуцирующий смерть). В составе DISC прокаспазы-8 само-

активируется, расщепляя саму себя с образованием двух белковых субъединиц, которые взаимодействуют с двумя такими же субъединицами и образуют активную форму фермента. Каспаза-8 активирует следующий протеолитический фермент — каспазу-3.

С активацией каспазы-3 наступает эффекторная фаза Fas-опосредованного апоптоза, в течение которой происходит активация целого ряда ферментов, факторов транскрипции и других проапоптотических факторов. Существуют и антиапоптотические факторы, такие, например, как тирозиновая фосфатаза FAP-1. Она способна взаимодействовать с цитоплазматическим регионом молекулы CD95. Происходит отщепление 15 аминокислотных остатков от домена смерти CD95-антигена, и образование DISC становится невозможным. В результате апоптотические процессы не развиваются. Высокие внутриклеточные концентрации FAP-1 создаются в CD95-положительных, но резистентных к апоптозу опухолевых клетках.

В реализации сигнала смерти участвует каскад цистеиновых протеиназ, названных каспазами. Всего описано более 10 таких каспаз. Все члены семейства каспаз синтезируются как неактивные проферменты, которые активируются в ходе каскада событий, связанных с передачей сигнала смерти. Различают две функциональные группы каспаз: группу каспаз-инициаторов и группу каспаз-эффекторов. Каспазы первой группы активируют другие каспазы в ходе каскада реакций. К этой группе принадлежат каспазы-2, -8, -9, -10. Каспазы-эффекторы вызывают деструкцию специфичных субстратов, нарушая интеграцию клеточных подсистем (каспазы-3, -6, -7).

Каспазы постоянно присутствуют в самых разных типах клеток, обнаруживаясь даже в нейронах. Постоянное наличие в клетке прокаспаз позволяет быстро индуцировать апоптоз.

Существует три основных пути развития каскада активации каспаз. Один из них связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфически-

ми рецепторами (например, активация каспазы-8 при взаимодействии Fas-лиганда с Fas-рецептором). Другой путь — активация каспазы-9 в результате образования гетеродимеров из белков семейства Bcl-2. И наконец, третий путь активации каспаз — при помощи сериновой протеиназы — гранзима В. Этот путь актуален при индукции апоптоза клетки цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками, которые и секретируют эти ферменты.

Для индукции апоптоза необходимо также участие порообразующих белков — перфоринов, продуцируемых цитотоксическими клетками. В качестве мишеней гранзимов В выступают каспазы-3, -7 и -10. Известны белки, ингибирующие каспазу-8; они получили название с-FLIP. Ингибирование активности каспазы-8 осуществляется путем взаимодействия с комплексом DISC.

Другая группа специализированных ингибиторов апоптоза относится к семейству белков IAP (апоптоз-ингибирующих белков). Все IAP-протеины на N-конце имеют от 1 до 3 специфических доменов, примерно по 70 аминокислотных остатков в каждом, которые ответственны за ингибирующую функцию. В настоящее время у человека идентифицировано 6 видов белков IAP-семейства, ингибирующих активность различных каспаз.

Известен еще один путь проведения апоптотического сигнала от CD95-антигена в клетку. После взаимодействия CD95 с лигандом активируются кислые сфингомиелиназы. При этом сфингомиелин гидролизует до церамида, а церамид, в свою очередь, превращается в ганглиозид GD3. Последний — это потенциальный медиатор апоптоза, индуцирующий митохондриальные повреждения. Ни один из этих эффектов не может быть реализован без участия ряда других ганглиозидов (GD1a и GM1). Все эти формы образуются в клетке при развитии липидного пути апоптоза.

Апоптоз регулируется большой группой протоонкогенов, наиболее важными среди которых счита-

ются *TP53* и *BCL-2*. Дикий (т.е. нормальный) тип гена *TP53* индуцирует апоптоз, а протоонкогены *BCL-2* и *BCL-X* его блокируют. В результате мутации дикого типа гена *TP53* образуется мутантный тип гена *TP53*, и клетка теряет способность к апоптозу, вследствие чего возникает опухоль. Дикий тип гена *TP53* является геном-супрессором, ингибирующим трансформацию клеток; мутантный ген *TP53* — онкогеном, который наряду с другими онкогенами участвует в механизмах канцерогенеза. Дикий тип гена *TP53* не только индуцирует апоптоз, но и блокирует клеточный цикл, возможно, совместно с *MYC*-геном, в точке контроля в фазе G<sub>1</sub> или перехода фазы G<sub>1</sub> в S-фазу. Продукты гена *TP53* нужны клетке для инициации апоптоза в ответ на генотоксические повреждения. Этот фундаментальный путь позволяет организму освобождаться от поврежденных клеток.

Другие гены, контролирующие апоптоз, — это семейство генов *BCL-2*, продукты которых или ингибируют, или индуцируют апоптоз. Среди генов, кодирующих белки, регулирующие апоптоз, первым был обнаружен *BCL-2*. Затем была выявлена целая группа генов, кодирующих семейство белков, гомологичных Bcl-2 и контролирующих апоптоз у человека и животных. Члены семейства белков Bcl-2 или угнетают апоптоз, или, подобно Вах, индуцируют его. Белок, кодируемый *BCL-2*, является мембранным протеином с молекулярной массой 25 кДа, который локализован в митохондриальной мембране, околоядерной мембране и гладком эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок защищает клетки от запрограммированной клеточной смерти в некоторых экспериментальных системах и дает онкогенный эффект, так как снижает апоптоз.

Известно, каким образом выглядит механизм защиты от апоптоза с помощью Bcl-2, локализованного на митохондриальной мембране. Белок Bcl-2 поддерживает инактивированное состояние индуцирующего апоптоз белкового комплекса, в состав которого

го входят прокаспазы-9, белок Аraf-1, цитохром *c* и ряд других белков. Среди белков Bcl-2-семейства существует также группа проапоптотических белков (например, Bax, Bad, Bak, Bik, Bid, Bcl-xs и др.). Для переключения клетки в режим апоптоза необходима нейтрализация ингибирующего действия Bcl-2 путем его связывания с каким-либо из проапоптотических белков Bcl-2-семейства. При этом компоненты проапоптотического комплекса освобождаются и выходят в цитоплазму через дезорганизованную мембрану митохондрии. В присутствии АТФ и цитохрома *c* белок Аraf-1 олигомеризуется (часто до октамера) и повторно связывается с прокаспазой-9 [12]. Протеиназа активируется и, в свою очередь, активирует каспазу-3 [6]. Каспаза-3 активирует другие эффекторные каспазы (например, каспазу-6 и каспазу-7) и вызывает протеолиз различных субстратов. Цистеиновые протеиназы инактивируют белки, защищающие клетку от апоптоза, в том числе и Bcl-2, а также расщепляют структурные белки, такие как актин, ламинин, плектин, виментин, фодрин. Кроме того, нарушается работа киназных, полимеразных и других ферментных систем, инициируется фрагментация ДНК путем активации ДНКаз.

Выявлена многогранность функции белка Bcl-2. Он оказывает двойное действие: может функционировать и как ионный канал, и как адапторный или связывающий белок. В эксперименте на трансфекцированных клетках, а также на синтетических липидных мембранах получены веские доказательства того, что Bcl-2 может иметь мембранную транспортную функцию, такую, как перекачивание ионов  $Ca^{2+}$  и перенос белков через внутриклеточные мембраны, на которых Bcl-2 и его гомологи локализованы, а именно, на митохондриальной мембране, эндоплазматическом ретикулеуме и ядерной мембране. Повышенная экспрессия Bcl-2 ингибирует транзит веществ из митохондрий, тогда как сверхэкспрессия Bax индуцирует транзит. Подобно другим белкам, регулирующим мегапоры на

мембране, Bcl-2 и Bax могут модулировать мегапоры или участвовать в их образовании, возможно, контролируя поток ионов, закрывая или открывая мегапоры. Блокирующее действие Bcl-2 на апоптоз может заключаться в блокаде транспорта из митохондрий цитохрома *c*, являющегося важнейшим звеном в каскаде реализации сигнала смерти.

Bcl-2 экспрессирован во многих тканях в эмбриогенезе и во взрослом организме. Bcl-2 отсутствует на примитивных гемопоэтических клетках-предшественниках, но экспрессирован на высоком уровне в незрелых предшественниках Т- и В-клеток. Bcl-2 отсутствует в фазе перестройки генов рецептора антигена, но по мере созревания Т- и В-клеток его экспрессия усиливается. Покоящиеся лимфоциты периферической крови сильно экспрессируют Bcl-2, а также CD95-антиген. В В-клетках зародышевых центров лимфатических узлов, в которых происходит соматическая мутация и селекция для высокоавидного связывания антигена, экспрессия Bcl-2 снижается. В активированных *in vitro* или *in vivo* Т-лимфоцитах экспрессия Bcl-2 также снижается.

Таким образом, количество Bcl-2 коррелирует с чувствительностью клеток к апоптозу: в течение селекции он экспрессирован на низком уровне, а после созревания его экспрессия повышается. Bcl-2 отсутствует в нейтрофилах периферической крови. Моноциты периферической крови слабо экспрессируют Bcl-2.

CD95-рецепторно-лигандная система принимает непосредственное участие в апоптозе, индуцированном через CD3-Т-клеточный рецептор антигена. Связывание Т-клеточного рецептора с моноклональными антителами против антигена CD3 индуцирует в этих клетках апоптоз. После связывания моноклональных антител анти-CD3 с комплексом CD3/TcR на поверхностной мембране Т-лимфоцитов происходит индукция CD95-лиганда, который, взаимодействуя с

собственным CD95-рецептором, индуцирует в этих клетках самоубийство.

Оказалось, что CD95-лиганд вовлечен в цитотоксическое действие Т-лимфоцитов. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают клетки-мишени двумя независимыми механизмами. Один путь зависит от поляризованной секреции гранул, содержащих перфорины или гранзимы, которые вызывают клеточную смерть через повреждение мембраны или ДНК. Он осуществляется CD8<sup>+</sup>-цитотоксическими клетками. Перфорины образуют поры в клетках-мишенях, а гранзимы являются сериновыми протеазами, содержащимися в гранулах клеток, и попадают в клетку-мишень через поры. Однако недавно был открыт другой механизм цитотоксического действия Т-клеток. Среди CD4<sup>+</sup>-хелперных/индукторных Т-лимфоцитов обнаружена субпопуляция клеток, оказывающих киллерное действие в отношении клеток-мишеней. В отличие от CD8<sup>+</sup>-цитотоксических Т-лимфоцитов, которые убивают клетки-мишени посредством перфоринов или гранзимов, CD4<sup>+</sup>-киллеры убивают свои мишени по механизму апоптоза, т.е. передают сигнал апоптоза. Исследование этих клеток показало, что они имеют цитокиновый фенотип Th1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-клеток, т.е. продуцируют ИЛ-2 и  $\gamma$ -интерферон, в отличие от Th2-клеток, которые продуцируют ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4 и ИЛ-12. Th1-клетки сильно экспрессируют на своей поверхности CD95-лиганд, тогда как Th2-клетки — очень слабо.

Таким образом, соединяясь с CD95<sup>+</sup>-клетками-мишенями, Th1-лимфоциты посредством CD95-лиганда передают им сигнал апоптоза. Данным путем иммунные Т-клетки удаляют лишние CD95<sup>+</sup>-клетки. CD95-рецепторно-лигандная система вовлечена в защиту от иммунологических реакций в иммунологически привилегированных тканях — в глазу, яичке и ЦНС.

Различные противоопухолевые препараты оказывают действие на опухолевые клетки также через

CD95-рецепторно-лигандную систему. Индукция CD95-лиганда химиопрепаратами и их действие через CD95-рецепторно-лигандную систему были открыты совсем недавно и явились новым механизмом противоопухолевого действия препаратов. Впервые это было показано на модели Т-клеточных линий человека при использовании метотрексата и дексаметазона. Терапевтические дозы препаратов индуцируют появление CD95-лиганда на поверхности клеток. Он связывается с CD95-рецептором и индуцирует сигнал смерти. Блокада CD95-рецептора блокирует действие дексаметазона и метотрексата. Эти исследования показали возможность прогнозирования исхода терапии. Клетки, не экспрессирующие CD95-рецептор, не будут погибать путем апоптоза при лечении больных.

Апоптоз вовлечен в патогенез различных заболеваний человека и животных, таких как аутоиммунные, инфекционные и онкологические. Одни заболевания ассоциированы с ингибированием апоптоза, другие, напротив, с повышением уровня апоптотических процессов.

Заболевания, ассоциированные с ингибированием апоптотических процессов:

1) злокачественные: фолликулярная лимфома, карциномы с мутацией *TP53*, гормональнозависимые опухоли (рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника);

2) аутоиммунные: системная красная волчанка, аутоиммунный гломерулонефрит;

3) вирусные инфекции.

Заболевания, ассоциированные с повышением апоптотических процессов:

1) СПИД;

2) нейродегенеративные заболевания: болезни Альцгеймера, Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, церебральная дегенерация;

3) миелодиспластический синдром;

4) ишемические повреждения: инфаркт миокарда, реперфузионные повреждения;

5) индуцированные токсинами повреждения печени.

CD95(Fas/APO-1)-антиген широко экспрессирован на опухолевых клетках как гематологической, так и негематологической природы, в том числе при Т- и В-клеточных лейкозах и лимфомах, рабдомиосаркоме, плоскоклеточной карциноме, карциноме толстой кишки, меланоме, глиобластоме, аденокарциноме предстательной железы, аденокарциноме поджелудочной железы, эпидермоидной карциноме, гепатоцеллюлярной карциноме. Клетки некоторых опухолей не содержат CD95-антигена. Как и в нормальных клетках, в злокачественных клетках экспрессия CD95-антигена повышается после их культивирования с  $\gamma$ -интерфероном, высокомолекулярным В-клеточным фактором роста или в присутствии суперантигенов. В сыворотке крови большинства пациентов с солидными опухолями выявляется растворимая форма CD95-антигена. Уровень растворимого CD95 протеина коррелирует с тяжестью заболевания.

С нарушением апоптотических процессов связаны многие гематологические заболевания. Учитывая возможные механизмы нарушения апоптоза, гематологические заболевания можно разделить на три группы:

1. Заболевания, связанные с усилением апоптоза: рефрактерная анемия (одна из форм миелодиспластического синдрома по FAB-классификации), врожденная амегакариоцитарная гипоплазия, лейкопения, связанные со снижением продукции нейтрофилов и усилением их разрушения в селезенке, апластическая анемия, анемии, связанные с нарушением кроветворения (анемия Аддисона—Бирмера, сидеробластные анемии, талассемии), парциальная красноклеточная аплазия.

2. Заболевания, связанные с ослаблением апоптоза: острые лейкозы, хронические лейкозы, лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы.

3. Заболевания, связанные с разобщением механизмов регуляции апоптоза: рефрактерная анемия с избытком бластов.

CD95-рецептор, опосредующий апоптоз, обнаружен на лейкозных клетках при различных формах лейкоза. При ХМЛ антиген CD95 отсутствует на гранулоцитах в хронической стадии заболевания, но появляется на бластных клетках в стадии бластного криза [1, 3, 6]. Экспрессия антигена CD95 на бластных клетках коррелирует с экспрессией маркера стволовой клетки CD34. Антиген CD95 локализован на CD34<sup>+</sup>-клетках. CD95-рецептор находится в функциональном состоянии, так как моноклональные антитела против антигена CD95 индуцируют апоптоз в CD95-положительных клетках [1]. В норме не все CD34<sup>+</sup>-клетки экспрессируют антиген CD95, а клетки нормального костного мозга мало чувствительны к CD95-индуцированному апоптозу. У больных ХМЛ, бластные клетки которых экспрессировали антиген CD95, хроническая фаза была более длительной по сравнению с таковой у больных, чьи бластные клетки не имели антигена CD95.

Антиген CD95 экспрессирован на бластных клетках части больных ОМЛ [3, 5]. Степень экспрессии антигена коррелирует со стадией дифференцировки клеток: в более дифференцированных лейкозных клетках антиген сильнее экспрессирован [9]. Низкая экспрессия CD95-антигена ассоциирована с низкой индукцией полных ремиссий после химиотерапии: 62,5% ремиссий при уровне антигенположительных клеток менее 20% против 92,9% ремиссий в случаях уровня антигенположительных клеток более 20% ( $p < 0,01$ ) [13]. Полагают, что определение количества антигенположительных клеток может предсказать исход ОМЛ.

Антиген CD95 обнаружен на клетках костного мозга у половины пациентов с миелодиспластическим синдромом [3]. Количество CD95<sup>+</sup>-клеток снижается при достижении ремиссии. Экспрессия антиге-

на CD95 является благоприятным прогностическим признаком [3].

Бластные клетки больных ОЛЛ также экспрессируют CD95-антиген [1]. Антиген представлен на бластных клетках как при ОЛЛ у детей, так и при Т-клеточном ОЛЛ у взрослых. Клетки взрослых больных Т-ОЛЛ экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген значительно больше, чем клетки здоровых людей [10]. У большинства больных лейкозные клетки отвечают на CD95-опосредованный апоптоз.

Результаты изучения прогностической значимости экспрессии антигена CD95 при ОЛЛ весьма противоречивы. Так, Т. Kotani et al. [10] не обнаружили корреляции экспрессии антигена с различными субтипами ОЛЛ. К.-М. Debatin и Р.Н. Krammer [7] также не выявили прогностической значимости экспрессии CD95-антигена при Т-клеточном ОЛЛ у детей. Однако автор этой главы с соавт. [1] показали, что экспрессия CD95-антигена на мембране бластных клеток является клинически благоприятным признаком, увеличивающим как безрецидивную, так и общую выживаемость пациентов, в то время как отсутствие антигена CD95 на поверхности бластов свидетельствует о плохом прогнозе в развитии заболевания. При анализе 10-летней выживаемости установлено, что медиана продолжительности жизни составляет на момент исследования у больных CD95-положительной группы 118,5 мес., а в CD95-отрицательной группе — только 13,2 мес.

Таким образом, представленные данные показывают, что CD95-рецепторно-лигандная система участвует в поддержании гомеостаза организма, а нарушения в механизмах регуляции апоптоза играют существенную роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе гематологических. Учитывая прогностическое значение экспрессии CD95-антигена, его необходимо определять в клинической практике.

### Основная литература

1. Барышников А.Ю., Шелепов В.П., Кузнецов С.В. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1996. — №5. — С. 42–44.
2. Новиков В.В. Растворимые дифференцировочные антигены: Материалы Европейской школы онкологов. — М., 1999. — С. 10–14.
3. Полосухина Е.Р., Заботина Т.Н., Шишкин Ю.В. и др. // Экспер. онкол. — 1997. — Т. 19. — С. 206–211.
4. Шишкин Ю.В., Седяхина Н.П., Заботина Т.Н. и др. // Бюлл. экспер. биол. — 1997. — Т. 122, №11. — С. 544–546.
5. Astwell J.D., Cunningham R.E., Noguchi P.O., Hernandez D.J. // Exp. Med. — 1987. — Vol. 185. — P. 173–178.
6. Chinnaiyan A.M. // Neoplasia. — 1999. — Vol. 1. — P. 5–15.
7. Debatin K.-M., Krammer P.H. // Leukemia. — 1995. — Vol. 9. — P. 815–820.
8. Dhein J., Waiczak H., Baumier C. et al. // Nature. — 1995. — Vol. 373. — P. 438–441.
9. Di Giuseppe J.A., Le Beau P., Augenbraun J., Borowitz M.J. // J. Clin. Path. — 1996. — Vol. 106. — P. 345–351.
10. Kotani T., Aratake Y., Kondo S. et al. // Leuk. Res. — 1994. — Vol. 18. — P. 305–310.
11. Lepelley P., Campergue L., Gardel N. et al. // Brit. J. Haemat. — 1996. — Vol. 95. — P. 368–371.
12. Maciejewski J.P., Salleri C., Sato T. et al. // Brit. J. Haemat. — 1995. — Vol. 91. — P. 245–252.
13. Min Y.H., Lee S., Lee J.M. et al. // Brit. J. Haemat. — 1996. — Vol. 93. — P. 928–930.
14. Wolf B.B., Green D.R. // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274, №29. — P. 20049–20052.

### Острые лимфобластные лейкозы

*С.А. Маякова*

**О**стрые лейкозы — это злокачественные опухолевые заболевания системы крови, первично поражающие костный мозг. Субстрат опухоли представлен незрелыми бластными клетками с «нежной» структурой ядерного хроматина, вытесняющими нормальные элементы и инфильтрирующими различные органы и ткани.

Острые лейкозы — клональные заболевания, возникающие из одной мутированной кроветворной клетки, которая относится либо к очень ранним, либо к коммитированным в направлении различных линий кроветворения клеткам-предшественникам. Принадлежность бластов к той или иной линии кроветворения, степень их дифференцировки обуславливают клиническое течение и прогноз острого лейкоза, терапию и эффективность лечения.

Среди злокачественных новообразований кроветворной и лимфоидной ткани, составляющих по-

довину всех злокачественных опухолей детей, на долю лейкозов приходится 38–40%. Частота острых лейкозов у детей до 15 лет составляет  $4,1 \pm 0,4$  случаев на 100 000 детского населения, чаще болеют мальчики (соотношение 1,6:1 для В-линейного и 4:1 для Т-линейного ОЛЛ) с пиком заболевания в возрасте от 2 до 5 лет.

В основе современных классификаций острых лейкозов лежат принципы функционального гистогенеза, предполагающие, что в злокачественно трансформированных клетках сохраняются основные фенотипические признаки, свойственные исходным нормальным клеткам. В связи с этим по морфологическим признакам клеток острых лейкозов у детей классифицируется как лимфоидные (лимфобластные) лейкозы и миелоидные (миелобластные) лейкозы. Острый недифференцированный лейкоз выделяют в тех случаях, когда идентификация клеток современными методами исследования затруднена. У детей на ОЛЛ приходится 80%, на ОМЛ — 15–17%.

На модели ОЛЛ у детей в течение последних 50 лет продемонстрирована уникальная возможность лечения опухолевых заболеваний с помощью терапевтических средств, позволивших сделать ОЛЛ из абсолютно фатального курабельным в 76–80% случаев. Этому способствовало научное понимание молекулярных, генетических и иммунофенотипических особенностей лейкозных клеток, а также определение критериев групп риска среди больных ОЛЛ [10, 12].

Генетические факторы играют значительную, предрасполагающую роль в возникновении острых лейкозов, включая ОЛЛ. Этот факт основывается на возможной ассоциации различных конституциональных изменений в хромосомном аппарате у больных ОЛЛ, случаях семейного лейкоза, возможности заболевания лейкозами близнецов и обнаружении хромосомных aberrаций (транслокации, делеции, инверсии и др.) в лейкозных клетках при этом заболевании. Об-

нарушение хромосомных нарушений во многих бластных клетках свидетельствует об их клональном происхождении.

### 5.1. Патогенез

Имеется мнение, что биология опухолевой лейкозной клетки является результатом комплексного генетического дефекта.

В развитии ОЛЛ придается значение химерному гену *TEL/AML*, формирование которого происходит внутриутробно, возможно, в результате спонтанных ошибок в процессе репликации и репарации ДНК. Накопление генетических аномалий в опухолевом клоне ведет к блоку нормальной клеточной дифференцировки и нарушениям в процессах пролиферации и апоптоза.

Наряду с генетическими факторами, к развитию лейкоза могут предрасполагать вирусная инфекция и состояние иммунитета. Однако исследователям не удалось установить роль только вирусов без влияния каких-либо других причин при формировании ОЛЛ. Множество работ указывает на повышенный риск заболевания лейкозами при воздействии ряда факторов (низкие дозы радиации, химические вещества, физическое воздействие, курение и др.). Приводятся веские аргументы в пользу этиологической роли эндогенных канцерогенов в развитии опухолей. Нарушение обмена тирозина у больных детей с ОЛЛ и их родителей свидетельствует о генетической детерминированности этих нарушений. В большинстве случаев конкретная причина возникновения ОЛЛ остается неизвестной.

### 5.2. Диагностика

Диагностика ОЛЛ основывается на оценке морфологических особенностей бластов костного мозга и периферической крови. Помимо обнаружения опу-

холевых клеток лимфоидной линии кроветворения при обычной окраске по Романовскому—Гимзе проводятся и другие исследования, такие как цитохимические, иммунофенотипические, цитогенетические, молекулярно-биологические и культуральные.

Гематологические изменения при ОЛЛ обусловлены выраженностью инфильтрации лейкозными клетками костного мозга, нарушением их дифференцировки и преобладанием пролиферативной активности над нормальным кроветворением.

Для подтверждения диагноза ОЛЛ необходимо комплексное обследование, главным в котором является морфологический метод. Основой современной диагностики ОЛЛ является FAB-классификация, предложенная в 1976 г. группой французских, американских и британских гематологов и построенная на критериях, полученных при морфологическом и цитохимическом изучении бластов. Диагноз ОЛЛ устанавливается при наличии в костномозговом пунктате более чем 25–30% бластов.

По морфологическим критериям бластных клеток ОЛЛ имеет три типа клеток — L1, L2, L3.

Около 85% детей с ОЛЛ имеют преимущественно L1-тип, 14% — L2 и 1% — L3. Лимфобласты L3-типа имеют поверхностные иммуноглобулины и другие маркеры В-клеток. Вместе с тем, не обнаружено корреляции между L1 и L2 морфологическими типами клеток и иммунологическими маркерами на поверхности бластных клеток.

Активность пероксидазы и хлорацетатэстеразы отрицательная, в лейкозных лимфобластах не содержится липидов. Для лимфобластов характерно гранулярное распределение мукополисахаридов в ШИК-реакции в виде пурпурных гранул по периферии цитоплазмы. Высокая активность кислой фосфатазы в лимфобластах среди детей с ОЛЛ встречается в 20–30% случаев.

Гистохимические исследования и проточная цитометрия помогают в дифференциальной диагно-

стике линейной принадлежности лимфобластов и миелобластов.

Острый недифференцированный лейкоз характеризуется отрицательными цитохимическими реакциями. Бластные клетки крови и костного мозга при этом варианте заболевания должны подлежать иммунологическому и цитохимическому типированию.

Другим характерным признаком ОЛЛ является наличие терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТdT), которая не может расцениваться как маркер лимфоидной пролиферации, но в комплексе с другими данными помогает классифицировать тип и стадию дифференцировки лимфоидной клетки. Наличие лизосомальных ферментов (бета-глюкуронидазы и др.) позволяет уточнить диагноз ОЛЛ в случаях, когда ШИК-реакция не демонстративна.

При электронной микроскопии в ядре бластных клеток при ОЛЛ выявляется крупное ядрышко, часто рыхлое, без ограничительной мембраны. Эндоплазматическая сеть и структура пластического комплекса в цитоплазме редуцированы. По всей цитоплазме разбросаны многочисленные рибосомы. Число митохондрий невелико, но они крупные.

Имунофенотипирование явилось новым подходом, дополняющим морфологическую диагностику ОЛЛ и позволяющим устанавливать линейную принадлежность и стадию зрелости бластных клеток. Поскольку интенсивность лечения ОЛЛ зависит от иммуноподварианта лейкоза, то иммунофенотипирование можно считать обязательным компонентом диагностического процесса (см. гл. 2).

Метод основан на обнаружении дифференцировочных антигенов на мембране лимфобластов с помощью моноклональных антител. Каждому из иммуноподвариантов соответствует специфический набор антигенов. В основе выделения подвариантов лежит сопоставление иммунофенотипа бластных клеток с их неопухолевыми аналогами, встречающимися в ходе нормальной дифференцировки В- и Т-лимфоцитов.

По этой причине наименования иммуноподвариантов ОЛЛ соответствуют стадиям зрелости лейкозных клеток. Выделяются В- и Т-линейные ОЛЛ. Острые лимфобластные лейкозы из В-линейных предшественников встречаются у 60–80% пациентов, В-ОЛЛ — у 2–3% и Т-ОЛЛ — у 13–15% больных. Наиболее распространенным и прогностически благоприятным является ранний пре-В-клеточный (common, пре-пре-В) иммуноподвариант. Редко встречается и агрессивно протекает В-ОЛЛ [8].

Цитогенетические исследования с помощью методов дифференциального окрашивания для идентификации отдельных хромосом клеток костного мозга и периферической крови дополняют информацию об особенностях лейкоза у детей. Некоторые морфологические варианты острых лейкозов характеризуются специфическими хромосомными аномалиями, что важно для дифференциальной диагностики и прогнозирования заболевания.

Современные цитогенетические технологии позволили установить хромосомные нарушения приблизительно в 90% случаев ОЛЛ. В нашей клинике были проведены цитогенетические исследования кариотипа лимфобластов у детей с ОЛЛ с помощью дифференциальных методов окраски препаратов на G-полосы. Большинство больных имели нормальный (28,8%) и гипердиплоидный (более 50 хромосом) (31,2%) набор хромосом. Редкие аномалии хромосом встречались реже: гиподиплоидный (менее 40 хромосом) — 12,5%, псевдодиплоидный (7,4%), гипердиплоидный (47–48 хромосом) — 6,3%, 6q — (6,3%) и t(4;11) — 2,5%. Особо следует отметить, что в 5% случаев была выявлена t(9;22) или Rh-хромосома, характерная для взрослого типа ХМЛ.

Цитогенетическая характеристика лейкозных клеток у детей в возрасте до 3 лет тождественна таковой у детей старшего возраста, однако изменения кариотипа лейкозных клеток встречаются с большей частотой, и особенно у детей в возрасте до 1 года. Име-

ются данные, что структурные хромосомные нарушения (основные транслокации) коррелируют с иммунофенотипической характеристикой клеточного субстрата при ОЛЛ.

Различные аномалии кариотипа при ОЛЛ не только коррелируют с прогнозом заболевания, но и позволяют осуществлять мониторинг минимальной остаточной болезни, а также определять адекватную для больного терапию (см. гл. 3).

В анализах периферической крови у детей с ОЛЛ обычно наблюдается снижение уровня гемоглобина, количества эритроцитов, тромбоцитов. В зависимости от лейкоцитоза различают случаи с нормальным, сниженным ( $1 \cdot 10^9/\text{л}$  и менее) и повышенным ( $20 \cdot 10^9/\text{л}$  и более, вплоть до  $500 \cdot 10^9/\text{л}$ ) количеством лейкоцитов. Повышенное количество лейкоцитов ( $> 10 \cdot 10^9/\text{л}$ ) определяется приблизительно у 1/2 больных, а более  $50 \cdot 10^9/\text{л}$  — у 1/5 пациентов. Абсолютным показателем заболевания является появление бластных клеток, количество которых может варьировать (от 1–2 до 90% и более). Однако могут быть случаи с отсутствием бластных клеток в периферической крови.

В костномозговом пунктате, который производят из подвздошной кости или грудины, а у детей раннего возраста (до 1 года) — из пяточной кости, количество бластных клеток может колебаться в пределах 50–100%, имеется нарушение нормальных клеточных соотношений, уменьшение количества или отсутствие мегакариоцитов. Если диагноз вызывает сомнения, необходима трепанобиопсия и гистологическое исследование костного мозга. Обнаружение диффузной или крупноочаговой бластной инфильтрации при нарушении нормальных соотношений ростков кроветворения, угнетение нормального гемопоэза подтверждают диагноз острого лейкоза.

Пункция лимфатических узлов при их увеличении, а также пункция опухолевых образований, если таковые имеются, является обязательной для получе-

ния цитологического подтверждения диагноза заболевания.

При рентгенологическом исследовании костной системы часто выявляется остеопороз в трубчатых костях и позвоночнике. При остром лейкозе у детей изменения в скелете могут быть в виде поперечных полос разрежения в метафизах, деструктивно-очаговых поражений, общего диффузного разрежения костной структуры и периостозов, системной бревиспондии. Кроме того, при рентгенологическом исследовании грудной клетки может быть выявлено расширение средостения за счет увеличенных внутригрудных лимфатических узлов, когда следует проводить дифференциальный диагноз с неходжкинской лимфомой.

Спинномозговая пункция позволяет диагностировать поражение нервной системы даже в отсутствие клинической симптоматики. При анализе ликвора в качестве нормы принимаются следующие показатели: цитоз 0–6 лимфоцитов/мкл, белок 0,2–0,3%, сахар 50–75 мг%, мочевая кислота 0,2–0,5 мг (по методике Мюллера–Зейферта). При увеличении количества ядерных элементов в ликворе следует думать о нейролейкозе, чаще всего в этих случаях увеличивается и уровень белка. Однако возможны случаи, когда клинически имеются неврологические симптомы, а в ликворе отсутствует цитоз. При этом следует обращать внимание на увеличение количества белка.

#### Международные критерии оценки поражения ЦНС

ЦНС статус I (негативный):

- Нет клинических проявлений поражения ЦНС.
- Нет данных за поражение ЦНС по данным КТ/МРТ.
- Нормальное глазное дно.
- В ликворе полностью отсутствуют бластные клетки.

## ЦНС статус II (негативный):

— Бласты в ликворе не определяются. Соотношение эритроцитов и лейкоцитов 100:1 по препаратам, сделанным на цитоспине. Количество клеток в 1 мл ликвора не превышает 5 клеток. Пункция визуально не была травматичной.

— Определяются лимфобласты, но соотношение эритроцитов и лейкоцитов — более чем 100:1 по препаратам, сделанным на цитоспине. Данное соотношение эритроцитов и лейкоцитов рассматривается как результат травматичной пункции и ликвор был контаминирован кровью.

— Травматичная пункция (ликвор на глаз контаминирован кровью). Количество лейкоцитов в 1 мл ликвора — более 50.

## ЦНС статус III (позитивный):

— Массивное поражение мозга или моговых оболочек по данным КТ/МРТ.

— Лейкемическое поражение сетчатки даже при отсутствии бластов в ликворе.

— Нетравматичная люмбальная пункция, количество клеток в 1 мл ликвора — более 5, при этом большинство клеток по данным цитологического исследования (цитоспин) — бласты.

— Если контаминация ликвора кровью сомнительная, лейкемическое поражение ЦНС должно быть констатировано при следующих показателях:

1. Количество клеток более 5 в 1 мл + большинство из них — бласты (цитоспин) + соотношение лейкоцитов к эритроцитам — 100:1 (цитоспин).

2. Количество клеток — более 5 в 1 мл ликвора + более высокий процент бластов в ликворе, чем в периферической крови (цитоспин).

С помощью новых методов исследования стало возможным обнаружение даже минимального числа лимфобластов в спинномозговой жидкости. Для повышения чувствительности цитологического исследования используют центрифугирование ликвора и проводят иммунофенотипирование клеток, опреде-

ление терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и др.

При исследовании ликвора методом иммунофореза с ПЦР при первичной диагностике ОЛЛ у всех детей выявляется наличие бластов в ликворе даже в случаях отрицательного результата при цитологическом исследовании.

С целью диагностики поражения нервной системы проводятся также дополнительные методы исследования: рентгеновская КТ, МРТ, электроэнцефалография и эхоэнцефалография.

Другие лабораторные исследования могут регистрировать последствия инфильтрации различных органов лейкемическими клетками и продукты их разрушения. Повышение уровня мочевой кислоты может быть результатом нарушения пуринового обмена при диагностике заболевания или в начальной стадии химиотерапии. Гиперурикемия может привести к почечной недостаточности. Одновременно может наблюдаться повышение в сыворотке крови уровня электролитов (калия, фосфора), лактатдегидрогеназы, особенно у больных с высоким лейкоцитозом в периферической крови, а также выраженная лимфаденопатия и гепатоспленомегалия.

При ранней диагностике ОЛЛ у детей, в связи с отсутствием определенных клинических симптомов, в некоторых случаях заболевание приходится дифференцировать от инфекционного мононуклеоза, острого инфекционного лимфоцитоза, вирусных инфекций (в том числе и от цитомегалии), коклюша и паракклюша, а также идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. При неопределенности диагноза важным является исследование пунктата костного мозга, являющегося основанием для диагноза ОЛЛ.

Острый лимфобластный лейкоз в некоторых случаях дифференцируют от апластических анемий, которые протекают с панцитопенией и могут быть начальной стадией развития ОЛЛ. В этих случаях обязательно исследование пунктата и биопта-

та костного мозга в сочетании с морфологическим и цитогенетическим исследованием. Наличие хромосомных aberrаций указывает на формирование опухолевого заболевания. Иногда первым проявлением ОЛЛ является гиперэозинофилия. Этот синдром может ассоциироваться с транслокацией t(5;14) в клетках костного мозга.

### **Дифференциальный диагноз ОЛЛ у детей**

#### ***Незлокачественные заболевания:***

- Ювенильный ревматоидный артрит
- Инфекционный мононуклеоз
- Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура
- Коклюш, паракоклюш
- Апластическая анемия
- Острый инфекционный лимфоцитоз

#### ***Опухоли:***

- Нейробластома
- Ретинобластома
- Рабдомиосаркома

#### ***Редкие состояния:***

- Синдром гиперэозинофилии

Дифференциальную диагностику ОЛЛ следует проводить с другими злокачественными опухолями, встречающимися в детском возрасте, такими как неходжкинская лимфома, саркома Юинга, остеосаркома.

## **5.3. Клиника**

Клинические симптомы ОЛЛ у детей обусловлены степенью инфильтрации костного мозга лимфоцитами и экстрамедуллярным распространением процесса.

В течении ОЛЛ выделяют: первый острый период (дебют или манифестация), ремиссии и рецидивы.

Предклинический период предполагается, но часто не диагностируется, так как основные симптомы заболевания, как правило, отсутствуют. Могут отмечаться подъемы температуры тела, снижение аппетита, нарастающая слабость, вялость. В ряде случаев по анализу периферической крови удается выявить изменения (анемия, гранулоцитопения, тромбоцитопения). Однако чаще они определяются только в костномозговом пунктате.

**Острый период** у большинства детей имеет бурное начало и характеризуется полиморфизмом клинических симптомов. Наиболее ранними являются симптомы общей интоксикации, анорексия без значительной потери массы тела и боли в костях, обусловленные лейкозной инфильтрацией периоста и костной ткани; чаще при этом поражаются трубчатые кости (диафиз), особенно бедренная и большеберцовая, но в процесс может быть вовлечен и позвоночник с развитием синдрома бревиспондилит. Артралгии связаны с лейкоэмической инфильтрацией суставов, что бывает порой трудно дифференцировать от таких заболеваний, как ревматоидный артрит или остеомиелит.

Кожные покровы и видимые слизистые у большинства больных отличаются бледностью. Характерным признаком острого лейкоза является геморрагический синдром, проявляющийся полиморфными кровоизлияниями (от петехий до кровоизлияний крупных размеров) на коже и кровотечениями со слизистых оболочек (носовые, желудочно-кишечные, почечные).

Одним из характерных симптомов ОЛЛ у детей является безболезненное увеличение периферических лимфатических узлов, наиболее часто — шейных, подмышечных, паховых. Одновременное увеличение лимфатических узлов в подчелюстной, околоушной и окологлазничной областях характеризует симптомокомплекс Микулича. В связи с тем, что при ОЛЛ пролиферация лейкозных клеток имеет место не только в

костном мозге, но и вне его, практически у всех детей наблюдается увеличение не только лимфатических узлов, но также печени и селезенки.

К редким проявлениям ОЛЛ относятся изменения на коже и в подкожной клетчатке в виде лейкемидов, некротические поражения кожи и слизистой ротовой полости (гингивит, стоматит от катарального до язвенно-некротического) и кишечника (энтеропатия). Развитие их связано с лейкемической инфильтрацией слизистых, тканей и сосудов, наличием кровоизлияний и присоединением инфекций.

При ОЛЛ у детей возможно вовлечение в процесс ЦНС, половых органов, глаз и легких. Наличие этих симптомов в начальном периоде острого лейкоза считалось до последнего времени плохим прогностическим признаком.

Полной **ремиссией** считается отсутствие клинических симптомов заболевания при состоянии кроветворения у больных, когда в нормо- или умеренноклеточном костном мозге обнаруживается не более 5% бластных клеток при нормальном соотношении других ростков кроветворения. В периферической крови гранулоцитов не менее  $1 \cdot 10^9/\text{л}$ , а тромбоцитов  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ ; экстрамедуллярные очаги лейкозного поражения отсутствуют.

Несмотря на прогресс в лечении ОЛЛ, в 15–20% случаев наблюдаются **рецидивы заболевания**. По своей характеристике рецидивы могут быть ранними (до 6 мес. после окончания лечения) и поздними (в сроки более 6 мес. после окончания лечения).

Рецидивы могут характеризоваться различной локализацией: костномозговой, экстрамедуллярный с поражением ЦНС (нейролейкоз), половых органов и др. (кожа, кости, орбита, легкие, миндалины). Вместе с тем, возможны комбинированные рецидивы (сочетание лейкемического поражения костного мозга с другими локализациями).

Время возникновения рецидива и его локализация являются важными факторами определения ис-

хода заболевания. При поздних рецидивах отмечается лучший ответ на терапию, чем в случаях ранних рецидивов. Лейкемическое поражение яичек более благоприятно, чем нейролейкоз. Вместе с тем, при поражении ЦНС исход лучше по сравнению с лейкемической инфильтрацией костного мозга.

Исход заболевания после рецидива лучше у пациентов с *TEL/AML*, хуже у больных с Т-линейным ОЛЛ и у пациентов с транслокацией t(9;22), особенно в случаях, когда имелся плохой ответ на преднизолон и эндолюмбальное введение метотрексата [14]. В мультицентровых исследованиях, анализирующих течение заболевания у 1000 детей с рецидивами, инициальный лейкоцитоз играл наибольшую роль в исходе заболевания после рецидива. Отмечалось также, что дети с ОЛЛ, которые получали менее интенсивную терапию в начале заболевания, лучше отвечали на лечение рецидива. В случаях низкой эффективности первичной индукционной терапии ответ на лечение рецидива был меньший.

Нет достаточных сведений о клеточных и молекулярных характеристиках рецидива. На клеточном уровне при оценке цитотоксического действия химиопрепаратов МТТ-тестом указывают, что рецидив ассоциируется с резистентностью к преднизолону и дексаметазону. Есть указания на значение определения уровня p53-регулятора апоптоза у детей с ОЛЛ. В начале заболевания функция p53 обычно интактна. Но обнаружение аномального p53 или повышенная экспрессия mdm-2 при диагностике заболевания ассоциируется с плохим ответом на индукционную терапию или ранним рецидивом заболевания. Имеются доказательства того, что при рецидиве утрачиваются функции p53, особенно у детей с транслокацией t(1;19) или при Т-линейном лейкозе (см. гл. 3).

**Костномозговой рецидив** обычно проявляет себя, как и при первичном ОЛЛ, костными болями, геморрагическим синдромом, лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, бледностью кожных покровов и ви-

димых слизистых, персистирующей субфебрильной температурой. Цитопения или появление бластных клеток в периферической крови могут быть первыми проявлениями костномозгового рецидива. В некоторых случаях клинико-гематологические данные могут отсутствовать и только исследования костномозгового пунктата указывают на рецидив заболевания. Более интенсивная первичная терапия может скорректировать риск возникновения рецидива.

Достижение повторной ремиссии имеет важнейшее значение для детей с ОЛЛ. В различных исследованиях у 70–95% пациентов может быть получена повторная ремиссия. Успех терапии зависит от продолжительности первой ремиссии и, возможно, от интенсивности предшествующей терапии. «Качество» повторной ремиссии может быть хуже по сравнению с первой ремиссией.

**Нейролейкоз** встречается обычно между 1-м и 3-м годами от момента установления диагноза и проявляется симптомами повышения внутричерепного давления, а именно головными болями, диплопией, тошнотой или рвотой и/или отеком диска зрительного нерва. При частых периодических эндолюмбальных пункциях с введением химиопрепаратов в большинстве рецидивов отсутствуют симптомы поражения ЦНС. Диагноз может быть установлен только при наличии цитоза в спинномозговой жидкости. В очень редких случаях нейролейкоз может проявляться поражением черепно-мозговых нервов, гипоталамическим синдромом или полифагией. Частота нейролейкоза наблюдалась в 4,4% случаев в CCG-1800 исследовании и у 4% больных при проведении протокола BFM 90.

У незначительного числа пациентов с явным изолированным нейролейкозом, подтвержденным микроскопическими критериями, с помощью ПЦР или FACS/LPC (fluorescent antibody cell sorting/leukemia progenitor cell) было продемонстрировано вовлечение в процесс костного мозга.

**Яички** у мальчиков являются второй по частоте локализацией экстрамедуллярного лейкозного поражения. Вовлечение в лейкозный процесс половых органов определяется пальпаторно по безболезненному увеличению, уплотнению яичек, семенных канатиков у мальчиков и яичников у девочек. Диагноз устанавливается на основании исследования биопсийного материала. Среди 112 мальчиков, наблюдавшихся ССГ-группой в период 1983–1988 гг., 6-летний уровень БСВ составил 64%.

#### 5.4. Прогноз

Сравнительный анализ особенностей клинико-гематологических, морфоиммунологических и цитогенетических данных при ОЛЛ выявил гетерогенность этого заболевания, что послужило основанием для дифференцированного подхода к лечению ОЛЛ с помощью изучения прогностического значения различных параметров.

Существуют различные критерии оценки прогноза ОЛЛ. Взаимотношение между прогностическими факторами окончательно еще не выяснено.

Неблагоприятным считается число лейкоцитов более  $20,0 \pm 35,0 \cdot 10^9/\text{л}$ . Некоторые авторы определяют существенно худший прогноз при лейкоцитозе свыше  $50,0 - 100,0 \cdot 10^9/\text{л}$ .

Относительно влияния возраста на прогноз заболевания мнения исследователей разноречивы. Большинство авторов полагает, что ранний возраст (менее 1 года) отрицательно влияет на прогноз заболевания. Что касается старшего возраста, то, по мнению одних авторов, неблагоприятным является возраст старше 10 лет, а по мнению других — старше 15 лет. Есть даже мнение, что возраст больных не имеет существенного прогностического значения.

Другие характеристики больных, такие как пол, раса, выраженное увеличение селезенки, печени и лимфатических узлов средостения, а также первона-

чальный уровень гемоглобина, количество тромбоцитов и сывороточных иммуноглобулинов предлагаются как вероятные признаки, которые могут иметь значение в прогнозе болезни, однако однозначно их прогностическая значимость еще не определена.

На неблагоприятный исход влияет масса опухоли в сочетании с поражением ЦНС и наличием других экстрамедуллярных очагов лейкозной инфильтрации.

В соответствии с FAB-классификацией, по мнению некоторых авторов, наиболее прогностически благоприятным является тип клеток L1 с инфильтрацией костного мозга лимфоидными клетками малого размера, с правильной формой ядра без видимых ядрышек. Другие исследователи полагают, что морфологические данные не влияют на прогноз ОЛЛ.

Ряд работ посвящен анализу прогностического значения цитохимических показателей лимфобластов при ОЛЛ у детей. Показано, что случаи ОЛЛ с высокой активностью кислой фосфатазы в лейкозных клетках костного мозга и периферической крови, протекающие часто с гиперлейкоцитозом, составляют группу повышенного риска. Прогностически неблагоприятными являлись крайне низкие и, наоборот, очень высокие показатели активности дегидрогеназ лейкозных клеток костного мозга и периферической крови.

Существенным для оценки прогноза ОЛЛ оказались кинетические параметры. Большая скорость роста массы лейкозных клеток и, соответственно, большая величина «ростковой фракции» при ОЛЛ ухудшали прогноз болезни.

Благодаря внедрению в клиническую практику иммунологических методов идентификации лейкозных клеток обнаружилась коррелятивная связь иммунологических подвариантов с клиническим течением и прогнозом заболевания.

Некоторые исследователи считают, что T-линейный ОЛЛ прогностически менее благоприятный по сравнению с ОЛЛ из предшественников В-клеток.

Мнение американских авторов группы CCG — исход T- и В-линейных ОЛЛ одинаков в случае лечения больных по протоколам в соответствии с идентичными показателями, такими как возраст и инициальный лейкоцитоз периферической крови.

Мнение ученых о прогностическом значении коэкспрессии T- и В-клеточных антигенов на поверхности бластных клеток противоречиво. В исследованиях, проведенных в нашей клинике, показано, что смешанно-линейный ОЛЛ характеризовался худшим прогнозом с более низкой БРВ детей.

Риск рецидива заболевания может быть установлен с помощью цитогенетических и молекулярных данных.

В настоящее время у детей с ОЛЛ изучается прогностическая значимость некоторых биомаркеров, участвующих в апоптозе, или запрограммированной клеточной смерти (p53, Bcl-2, глутатион). Как известно, сигналом к апоптозу является регулятор клеточного цикла — белок p53. Плохой ответ на инициальную терапию связан с потерей функции p53 и образованием мутантного типа гена *TP53*, вследствие чего теряется способность клеток к апоптозу. Высокий уровень глутатиона и Bcl-2 в лимфобластах ассоциируется с резистентностью к химиопрепаратам *in vitro* и увеличением риска рецидива. Однако при T-линейном ОЛЛ повышенное количество Bcl-2 не ухудшает выживаемость больных.

Риск рецидива заболевания может быть установлен путем определения чувствительности бластов к химиопрепаратам *in vitro* МТТ-тестом или с помощью изучения ответа на терапию *in vivo*. Летальная концентрация химиопрепаратов для 50% лимфобластов (LC50) в МТТ-тесте для преднизолона, дексаметазона, винкристина, L-аспарагиназы, доксорубицина, 6-меркаптопурина и других является прогностически значимой в мультивариантном анализе. CCG-группа исследователей в качестве критерия для разделения больных по прогнозу заболевания использует дан-

ные о количестве бластов в костномозговом пунктате на 7-й день индукционной химиотерапии. Немецкие ученые (BFM-группа) отмечают прогностическое значение количества бластных клеток в периферической крови после эндолюмбального введения метотрексата и приема преднизолона внутрь. Благодаря данному исследованию удается выявить гетерогенность больных внутри цитогенетических подгрупп, таких как с транслокациями t(9;22) и t(4;11) [14].

Приведенные сведения указывают на значительное число исследований, направленных на выявление корреляций между отдельными признаками, характеризующими изначально ОЛЛ у детей, и прогнозом заболевания. Отмечается определенная разноречивость полученных данных. Однако, по мнению большинства авторов, первоначальный лейкоцитоз периферической крови — наиболее значимый фактор для оценки продолжительности костномозговой ремиссии.

#### Факторы прогноза ОЛЛ у детей

- Первичный лейкоцитоз
- Возраст
- Пол
- Цитогенетика/плоидность
- Иммунофенотип
- морфология по классификации FAB
- Увеличение внутригрудных лимфатических узлов
- Органомегалия и лимфаденопатия
- Уровень гемоглобина
- Раса
- Количество тромбоцитов
- Сывороточные иммуноглобулины
- Быстрота лейкоцитарной циторедукции
- Экспрессия миелоидных антигенов на лейкозных клетках
- Соматическое состояние

Как фактор риска рецидива можно рассматривать наличие в периоде ремиссии резидуальных опу-

холевых клеток или минимальной остаточной болезни. Основными методами определения минимальной остаточной болезни являются проточная флюороцитометрия и ПЦР-реакция.

При идентификации факторов прогноза ОЛЛ у детей стало очевидно, что при данном заболевании могут быть выделены прогностические или стадийные группы с помощью характеристик, значительно и независимо влияющих на прогноз. Это было необходимо для создания риск-адаптированных терапевтических протоколов лечения. Больные с лучшим прогнозом должны получать стандартную терапию со сведением до минимума риска вторичных эффектов. В более интенсивном лечении нуждаются больные с плохим прогнозом.

Многофакторный анализ позволил остановиться в одних исследованиях на первоначальном числе лейкоцитов, а в других — на возрасте больных и лейкоцитозе как на наиболее информативных факторах для предсказания прогноза. При группировании больных по этим факторам, считавшиеся предварительно важными другие показатели (органомегалия, наличие увеличенных лимфатических узлов средостения, раса и др.) при многофакторной оценке не обнаружили статистически значимого влияния на прогноз.

Группа исследователей США (1993) основными критериями высокого риска считали следующие факторы: наличие транслокаций t(9;22) и t(4;11), отсутствие ремиссии после курса индукции, инициальный лейкоцитоз более  $50 \cdot 10^9/\text{л}$ , а также возраст детей до 1 года и старше 10 лет. Одновременно при оценке прогноза рекомендовали принимать во внимание ДНК-индекс бластных клеток.

BFM-группа исследователей в протоколах ALL-BFM 90/95 использовала гепатоспленомегалию с первичным лейкоцитозом для определения индекса фактора риска, который явился основой для стратификации больных по прогностическим факторам. В последних протоколах в качестве основных прогности-

ческих признаков предлагаются: лейкоцитоз более  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ , t(9;22); t(4;11), возраст детей от 1 года до 6 лет, Т-линейная принадлежность лейкозных клеток, плохой ответ на преднизолон, больше 25% бластов на 15-й день и больше 5% бластов в пунктате костного мозга на 33-й день лечения.

Ответ на терапию детей с ОЛЛ — наиболее важный прогностический фактор для установления риска рецидива и уточнения стратегии лечения. Это отмечают все группы исследователей [2, 5, 7]. Дети с высоким риском рецидива нуждаются в наиболее агрессивном лечении по сравнению с больными стандартного риска, которые не имеют основания для интенсификации химиотерапии.

По данным большинства исследователей, ранний ответ на терапию (по данным пунктата костного мозга на 15-й день лечения) является благоприятным прогностическим признаком для длительной выживаемости больных.

## 5.5. Лечение

Основные цели лечения ОЛЛ — эрадикация лейкозного клона, восстановление нормального кроветворения, а в результате — достижение длительной БРВ вплоть до выздоровления больных.

Миелотоксический эффект, приводящий к аплазии костного мозга, достигается с помощью полихимиотерапии за счет уменьшения объема опухолевой массы. В этот период наступает состояние клональной конкуренции, когда пролиферативное преимущество получает клон клеток нормального кроветворения, репопулирующий в костном мозге, тем самым восстанавливая здоровое поликлональное кроветворение.

В настоящее время очевидно, что длительность индуцированной ремиссии при ОЛЛ во многом обуславливается строгим соблюдением принципов этапного лечения заболевания: адекватной терапии ин-

дукции, консолидации и интенсификации ремиссии, химио- и химиолучевой профилактики нейролейкоза, поддерживающего лечения, предполагающего наличие в организме остаточных очагов лейкозной инфильтрации.

Впервые значительно улучшились результаты лечения детей с ОЛЛ при применении так называемой «тотальной терапии», заключающейся в использовании комбинации химиопрепаратов для достижения ремиссии, осуществлении мер, направленных на профилактику нейролейкоза (химиолучевая терапия), и в длительном противорецидивном (поддерживающем) лечении в периоде ремиссии (R.J.A. Aug, 1979).

Эффективность «тотальной терапии» несомненна. Если в 1950 г. средняя продолжительность жизни детей, больных ОЛЛ, составляла 2,5 мес., а в 1957–1959 гг. 3-летний срок переживали около 1% больных, то благодаря «тотальной терапии» американскими авторами была объявлена перспектива достижения 50%-й выживаемости детей с ОЛЛ более 5 лет.

В последующем на основе «тотальной терапии» были разработаны программы лечения ОЛЛ, что дало возможность сопоставления полученных результатов. К началу 70-х годов прошлого века в большинстве крупных центров мира процент детей, больных ОЛЛ с 5-летним безрецидивным течением, приблизился к 50.

Анализ результатов лечения ОЛЛ у детей в России и за рубежом свидетельствует о повсеместной унификации схем индукционной терапии. Получение ремиссии — первый шаг на пути достижения длительно-го безрецидивного течения ОЛЛ.

**Индукция ремиссии.** Целью первичного (после установления диагноза) лечения ОЛЛ является индукция ремиссии. Достижение ремиссии в результате индукционного курса характеризуется отсутствием клинических признаков заболевания, нормоклеточностью пунктата костного мозга с количеством бластов менее 5% при отсутствии их в периферической

крови и числом гранулоцитов  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ , а тромбоцитов —  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ . Имеет значение также отсутствие признаков поражения ЦНС или других экстрамедуллярных проявлений.

Современная тактика лечения детей с ОЛЛ заключается в применении трех-четырёх химиопрепаратов для индукции ремиссии у детей группы стандартного риска. Трехкомпонентная индукция винкристином, преднизолоном и антрациклинами предпочтительна перед применением только винкристина и преднизолона. Имеются данные о преимуществе использования четырех химиопрепаратов: винкристина, преднизолона, L-аспарагиназы и антрациклинов.

Рандомизированное исследование UKALL VIII, включавшее 800 пациентов с ОЛЛ, не обнаружило преимущества добавления дауномицина для достижения ремиссии.

При терапии ОЛЛ базисными препаратами являются преднизолон, винкристин, когда наступление ремиссии наблюдается в 85% случаев, а при включении антрациклинов и L-аспарагиназы процент ремиссий увеличивается до 98. Кроме того, увеличивается продолжительность жизни больных при условии применения консолидации и поддерживающего лечения в периоде ремиссии.

Несмотря на то, что четырехкомпонентная индукционная терапия может приводить к увеличению токсичности лечения, в большинстве исследований показано, что такая терапия предпочтительна при добавлении противолейкозных средств для детей с высоким риском.

В исследовании Dutch ALL VI при сравнении эффективности дексаметазона и преднизолона отмечается, что первый проявлял бóльшую активность в отношении бластных клеток *in vitro* и для профилактики поражения ЦНС. Группа CCG при сравнении эффективности этих двух препаратов для интенсификации у больных группы стандартного риска показала

преимущество дексаметазона: 4-летняя БСВ составила 88% по сравнению с 81% при использовании преднизолона.

Современные исследования доказывают, что препараты аспарагиназы не эквивалентны по действию. В настоящее время существует два нативных препарата аспарагиназы, получаемых из различных микроорганизмов: *Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi*. Кроме того, известна пэгиллированная аспарагиназа (ПЭГ-аспарагиназа), являющаяся конъюгатом нативной аспарагиназы *E. coli* и полиэтилена. Как известно, нативная аспарагиназа *Erwinia* имеет более короткий период полураспада, чем нативная аспарагиназа *E. coli* (0,7 и 1,3 дня соответственно), и некоторые группы исследователей сообщают, что обычные дозы и схемы применения аспарагиназы *Erwinia* не способны обеспечить длительное действие на ОЛЛ, в связи с чем она не может использоваться как препарат первой линии [1]. The European Organization for Research on the Treatment of Cancer (EORTC) сравнивала действие обоих препаратов аспарагиназы, применявшихся в дозе 10 000 Ед/м<sup>2</sup> дважды в неделю у 6052 детей с ОЛЛ. Уровень 4-летней БСВ составил 75% при использовании аспарагиназы *E. coli* по сравнению с 62% при применении аспарагиназы *Erwinia*. Предварительные данные, полученные в исследовании Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) при изучении эффективности у детей с ОЛЛ двух аспарагиназ в одинаковых дозах и схемах, также указывают на преимущество аспарагиназы *E. coli* [15].

ПЭГ-аспарагиназа позволяет уменьшить число инъекций и снизить образование антител при назначении в индукции ремиссии, что может служить показанием к включению ее в первую линию терапии детей, больных ОЛЛ. Требуется обязательный мониторинг за уровнем аспарагина с целью выявления больных, у которых развивается инактивация ПЭГ-аспарагиназы без клинических проявлений.

**Постиндукционная интенсификация** (консолидирующая терапия). Вопрос о необходимости

сти проведения постиндукционной интенсификации химиотерапии в различных программах лечения решается по-разному: от отсутствия ее в протоколах POG 7420, St. Jude Total V, ix (США) до высокоинтенсивной полихимиотерапии в протоколах ВФМ (Германия), DFCI (США), MSKSS L2 (Великобритания). Концепция постиндукционной интенсификации заключается в дальнейшей редукции популяции лейкозных клеток, достигнутой в период индукции ремиссии.

В 1970 г. Riehm с соавт. применили дауномицин в добавление к винкристину, преднизолону и L-аспарагиназе для индукции ремиссии с последующим применением циклофосфида и цитарабина (цитозин-арабинозида) для усиления обычной консолидации, состоящей из еженедельных введений метотрексата и 6-меркаптопурина *per os*, формировавших протокол I. Результат этого был скромный. В 1976 г. они включили в программу лечения детей с ОЛЛ вторую двухмесячную фазу интенсивной терапии (протокол II), которая осуществлялась больным с высоким риском или сразу же вслед за протоколом I или с интервалом в 2 мес. (отсроченная интенсификация). Исход заболевания был значительно лучше по сравнению с историческим контролем. Бессобытийная выживаемость больных не зависела от времени проведения протокола II относительно протокола I. Переносимость отсроченной интенсификации была лучше. Два рандомизированных исследования ССГ-группы (США), проведенных в 1983–1988 гг., продемонстрировали значительное преимущество ВФМ-исследований по сравнению с похожими подходами к лечению детей с высоким риском.

Для больных со средним риском группа ССГ провела сравнение вклада в эффективность лечения детей с ОЛЛ протокола I (интенсивная индукция/консолидация) и протокола II (отсроченная интенсификация) [8, 11]. По их данным, БСВ больных улучшилась в случае применения отложенной интенсификации

по сравнению с детьми, которым интенсивная консолидация вообще не проводилась или имела место сразу же после индукционного курса (77 по сравнению с 61%). При этом меньший эффект был получен в возрасте моложе 10 лет. В более старшей группе детей улучшение результатов лечения отмечалось как в случае индукции/консолидации, так и при отложенной интенсификации. Роль индукции/консолидации и отложенной интенсификации окончательно не изучена в группе детей с ОЛЛ высокого риска. Вместе с тем было показано, что вторая отсроченная интенсификация улучшает результаты лечения по сравнению с первой (84 и 77% соответственно).

В протоколе ССГ-группы исключалась интенсивная индукция/консолидация у больных стандартного риска. При этом не назначались антрациклины (100 мг/м<sup>2</sup>) и циклофосфамид (2 г/м<sup>2</sup>) по сравнению с ВФМ-протоколом. Бессобытийная выживаемость больных при этом не ухудшалась.

ССГ группа изучает эффективность применения реиндукционных курсов винкристином и преднизолоном одновременно с интратекальным введением метотрексата с интервалом в 3 мес. во время проведения поддерживающего лечения в периоде ремиссии у детей, не получавших отсроченную интенсификацию, или в случаях, если она была неэффективной. Ценность реиндукционных курсов винкристином и дексаметазоном изучается у больных, которым применен протокол II в ВФМ-программах лечения.

Для больных с высоким риском изучается длительная и сильная постиндукционная интенсификация. Она заключается в применении пятикратной схемы Capizzi I-терапии, состоящей из винкристина, эскалации доз внутривенного метотрексата и L-аспарагиназы с одновременным ежедневным приемом 6-меркаптопурина и еженедельным — метотрексата *per os* в течение предшествующих 8 нед., а также после первой и второй отсроченной интенсификации.

Две дозы винкристина и шесть доз L-аспарагиназы применяются в период восстановления показателей периферической крови после каждой из двух реиндукций циклофосфамид/цитарабин/тиопуринов, консолидаций и один — после каждой отсроченной интенсификации. Этот режим был показан пациентам, у которых на 7-й день терапии выявлялось более чем 25% бластов в костномозговом пунктате и имеющих высокий риск рецидива заболевания. После достижения ремиссии в рандомизированном исследовании больные получали один из интенсивных режимов лечения («augmented intensive regimen» или модифицированный CCG-группой протокол, основанный на VFM-программе). Nachman с соавт. [11] сообщают о 75–85% выживаемости больных. Эти режимы лечения больных с высоким риском исследовались группой CCG в 1997–2001 гг.

The Medical Research Council в Великобритании (MRC [UK]) в рандомизированных исследованиях демонстрируют ценность постиндукционной интенсификации как в группе больных со стандартным, так и с высоким риском [7].

Другие стратегии постиндукционной интенсификации, такие как средние дозы метотрексата с лейковорином, изучаются. В протоколе X в SJCRH-корпоративных исследованиях проводится сравнение эффективности пар препаратов: 6-меркаптопурин/метотрексат, циклофосфамид/доксорубин и тенипозид/цитарабин с ежедневным приемом 6-меркаптопурина и средними дозами метотрексата с лейковорином. Отмечается, что 4-летняя БРВ составила 56 и 67% соответственно.

В двух исследованиях группы CCG было показано отсутствие различия в эффективности между парентеральным введением метотрексата в дозе 33,6 г/м<sup>2</sup> или 0,5 г/м<sup>2</sup> с лейковорином, помимо еженедельного его применения перорально.

Последними английскими и французскими исследованиями не удалось показать преимущества па-

рентерального введения метотрексата в дозе от 6 до 8 г/м<sup>2</sup> с лейковорином по сравнению с еженедельным приемом метотрексата *per os* без лейковорина. The Pediatric Oncology Group (POG) показала преимущество действия парентерального метотрексата в дозе 1 г/м<sup>2</sup> с лейковорином перед оральным его применением. Через 3 года исследований уровень БСВ составлял 89% по сравнению с 78%. Вместе с тем, такая же доза лейковорина применялась внутривенно через 2 ч после введения метотрексата в дозе 1 г/м<sup>2</sup>, и в последующем метотрексат вводился в дозе 25 мг/м<sup>2</sup> *per os* каждые 6 часов (всего четыре дозы). Нейротоксичность отмечалась в тех случаях, когда метотрексат *per os* применялся без лейковорина, но нейротоксичность встречалась также и при парентеральном введении метотрексата.

DFCI-группа выстроила успешную стратегию применения пролонгированной L-аспарагиназы еженедельно. Исследователи POG-группы показали преимущество применения пролонгированной L-аспарагиназы больным с T-линейным ОЛЛ. Однако в группе контроля больные получили только три дозы L-аспарагиназы в случаях V-линейного ОЛЛ в дозе 25 Ед/м<sup>2</sup> внутримышечно (24 нед.) (Alin C 14-исследование).

Попытка применения ТГСК для консолидации ремиссии детям с очень высоким риском развития рецидива не показала преимуществ этого метода перед химиотерапией. Вместе с тем, имеются доказательства успешного применения ТГСК от гистосовместимого донора группе больных ОЛЛ, у которых обнаруживается Ph-хромосома (t(9;22) или BCR/ABL).

**Профилактика нейролейкоза.** Концепция профилактики поражения ЦНС при ОЛЛ у детей основывается на наличии там «убежища» для лейкозных клеток, не определяемых в момент диагностики заболевания и при проведении системной химиотерапии. Исходя из этого, предупреждение лейкозного поражения ЦНС с большим основанием следует рассма-

тривать как «пресимптомную терапию», а не «профилактику нейролейкоза».

Одним из самых ранних методов профилактики нейролейкоза явилось эндолюмбальное введение метотрексата, доказавшее свою эффективность для уменьшения случаев поражения ЦНС, но не повлиявшее на выживаемость больных.

Первые клинические сведения об использовании лучевой терапии для профилактики нейролейкоза поступили из St. Jude Children's Research Hospital. Pinkel с соавт. (1973) продемонстрировали эффективность краниоспинального облучения в суммарной очаговой дозе (СОД) 24 Гр и на первых этапах исследования показали, что половина детей с ОЛЛ может быть излечена. В дальнейшем краниоспинальное облучение было заменено краниальным с одновременным коротким курсом эндолюмбального применения метотрексата. Последовательно отработывались дозы облучения: от 5 до 24 Гр. Было доказано, что использование облучения в СОД 18 Гр в сочетании с эндолюмбальным введением метотрексата может оказывать равный эффект, как и при применении 24 Гр. Попытки снижения доз облучения были обусловлены появлением отдаленных побочных эффектов этого вида лечения.

Последующие сообщения касались применения для профилактики поражения ЦНС при ОЛЛ у детей «triple»-терапии (эндолюмбального введения трех препаратов: метотрексата, цитозин-арабинозида и преднизона), средних доз метотрексата, вводимого только внутривенно или в сочетании с его эндолюмбальным применением, системного использования высоких доз метотрексата. Была доказана эквивалентная эффективность «triple»-терапии и облучения головного мозга. Аналогичные данные получены и при применении только высоких доз метотрексата.

Несомненным остался факт необходимости краниального облучения больных ОЛЛ в сочетании с эн-

долюмбальным введением метотрексата пациентам с ОЛЛ высокого риска развития поражения ЦНС, хотя есть указания на эффективность в этих случаях только системной химиотерапии.

В 1978 г. был изменен расчет дозировки эндолюмбального введения метотрексата по возрасту — все дети 3 лет и старше стали получать 12 мг, так как объем внеклеточной жидкости в ЦНС увеличивается с возрастом ребенка гораздо быстрее, чем площадь поверхности тела, и достигает уровня взрослого уже к 3 годам. Аналогичные изменения доз коснулись цитарабина и преднизолон. Внедрение дозирования метотрексата по возрасту привело к снижению нейротоксичности и уменьшению частоты развития рецидивов в ЦНС [3].

В исследовании CCG-161 было показано, что облучение головного мозга с целью профилактики нейролейкоза может быть заменено эндолюмбальным введением метотрексата у пациентов с ОЛЛ стандартного риска.

**Поддерживающая терапия.** Цель поддерживающего лечения ОЛЛ у детей — максимальная редукция лейкоэмического клона. Наличие остаточной болезни документируется лабораторными исследованиями и в некоторых случаях — исследованием биопсийного материала.

Существует несколько гипотез объяснения существования у больных лейкоэмических клеток в периоде ремиссии: развития биохимической лекарственной резистентности, наличие физиологических или фармакологических «убежищ» (ЦНС, яички и др.), поддержание популяции лейкозных клеток в фазе  $G_0$ , менее чувствительных к химиотерапии, и др.

Наиболее часто для поддержания ремиссии используются 6-меркаптопурин и метотрексат. Метотрексат в поддерживающей терапии ингибирует синтез пуринов *de novo* и является синергистом 6-меркаптопурина, усиливая его конверсию в активные метаболиты. Практикуется ежедневный пероральный

прием 6-меркаптопурина и еженедельный — метотрексата. Уменьшение доз препаратов вдвое было менее эффективным, вместе с тем попытка увеличения доз 6-меркаптопурина и метотрексата по сравнению со стандартными не привела к успеху. В исследовании английских авторов (UKALL VII) доказывалось преимущество внутримышечного введения метотрексата во время поддерживающего лечения, так как преодолевалась проблема плохого кишечного всасывания. Другими авторами не отмечено различия эффективности лечения метотрексатом в зависимости от метода введения. Добавление реиндукционных курсов преднизолон + винкристин в некоторых случаях способствует увеличению сроков ремиссии, особенно в группах среднего риска. Имеются исследования, доказывающие эффективность еженедельного применения L-аспарагиназы. Добавление других химиопрепаратов, таких как циклофосфамид и цитарабин к базисной терапии приводило к уменьшению доз 6-меркаптопурина и метотрексата, что ухудшало прогноз заболевания. Было также показано, что применение непрерывной поддерживающей терапии предпочтительнее прерывистых курсов.

В отличие от других злокачественных новообразований, ОЛЛ требует поддерживающей терапии, длительность которой до конца не определена. В более ранних исследованиях было доказано отсутствие преимущества 5-летней поддерживающей терапии перед 3-летней. Группа исследователей CCG утверждает, что для больных в группе стандартного риска необходима терапия в течение 2 лет, а в группе высокого риска — более 2 лет. При этом мальчикам требуется более длительное лечение, чем девочкам. Имеется даже указание на то, что для девочек с хорошим прогнозом достаточна продолжительность лечения 1,5 года.

В настоящее время можно считать доказанным значение пола для исхода ОЛЛ. Риск возникновения рецидива (особенно тестикулярного) у мальчиков

ориентирует большинство авторов проводить им лечение не менее 3–3,5 лет.

По современным протоколам общая длительность терапии составляет 2–3 года. Интерес представляют данные по эффективности применения поддерживающего лечения до 2 лет от начала лечения по программе BFM.

Большинство современных протоколов (BFM, DFCI, POG, CCSG, UKALL, Dutch ALL-VI и др.), применяемых в США, Германии, Великобритании и Голландии, использует интенсивную полихимиотерапию с обязательным включением профилактики нейрорлейкоза. Применение программного лечения позволило увеличить долгосрочную выживаемость до 70–80%. Возникла настоятельная необходимость создания риска адаптированных протоколов лечения, снижающих тяжесть побочных явлений у детей со стандартным риском: исключается краниальное облучение, снижены суммарные дозы антрациклиновых антибиотиков, исключена высокодозная интенсификация. С другой стороны, альтернативой лечения для больных с плохим прогнозом стала алло- и аутоТГСК.

Высокую эффективность показали программы лечения, разработанные немецкими авторами, — ALL-BFM (BFM 83, BFM 87, BFM 90, BFM 95 и т.д.), которые получили широкое распространение в Европе и России [13]. Эти программы составлены с учетом факторов риска. В программе BFM 90 для больных со стандартным и средним риском схема лечения включает в себя три протокола. Для индукции ремиссии (протокол 1) используются преднизолон, винкристин, даунорубицин и L-аспарагиназа с последующим однократным применением циклофосфана и 4 блока цитарабина в сочетании с 6-меркаптопурином.

В целях консолидации ремиссии вводится четырехкратно метотрексат в дозе 5 г/м<sup>2</sup> (протокол М).

В протоколе 2 (реиндукция) при применении 6-меркаптопурина используются дексаметазон, винкристин, адриамицин и L-аспарагиназа, однократно

циклофосфан и 2 блока цитарабина с 6-меркаптопурином.

Всем больным проводится профилактика нейрорлейкоза путем эндолюмбального введения метотрексата (в дозе, зависящей от возраста).

В случаях ОЛЛ среднего риска также обязательна лучевая терапия на область головного мозга (СОД 12 Гр).

При лечении детей, имеющих ОЛЛ высокого риска, используется программа лечения, включающая индукцию ремиссии преднизолоном, винкристином, даунорубицином и L-аспарагиназой (в дозах, аналогичных применяемым при терапии больных со стандартным и средним риском ОЛЛ). В последующем лечение осуществляется полихимиотерапией блоками (блок А, блок В и блок С) — всего 9 блоков. Профилактика нейрорлейкоза включает в себя эндолюмбальное применение метотрексата и гамма-терапию на область головного мозга (СОД 12 Гр). Поддерживающее лечение проводится 6-меркаптопурином и метотрексатом в течение 104 недель. Отдаленные сроки наблюдения за детьми, получившими лечение по этим протоколам, составили более 20 лет. Пятилетняя БСВ наблюдается у 70–80% больных.

Существенный вклад в достижение таких результатов лечения внесла научно обоснованная сопроводительная терапия на всех этапах программы, позволившая максимально избежать нежелательных побочных явлений и осложнений химиотерапии. Использование модифицированной программы ВФМ 90 белорусскими авторами, заменившими в протоколе ALL-BFM 90 дозу метотрексата с 5 на 1 г/м<sup>2</sup>, также позволило достичь высоких результатов лечения: 5-летняя БСВ наблюдалась в 67,1% случаев [1], что согласуется с данными, полученными в нашей клинике [6].

Сотрудники Российского НИИ детской гематологии МЗ совместно с немецким профессором Г. Хенце разработали программу лечения Москва —

Берлин-91 (МБ-91, МБ-02). В условиях рандомизированных исследований доказана одинаковая эффективность программ лечения МБ 91 и ВФМ 90 у детей с ОЛЛ.

Результаты протоколов лечения детей с ОЛЛ ведущих кооперативных групп представлены в табл. 5.1.

В настоящее время в Германии лечение ОЛЛ у детей проводится по программе ALL IC-BFM 2002. Основные принципы терапии аналогичны предыдущим программам. Однако имеется тенденция к уменьшению доз L-аспарагиназы и даунорубицина, изучается необходимость назначения реиндукционных курсов (дексаметазон + винкристин) в периоде ремиссии для детей с ОЛЛ (средний риск) и удлинения сроков поддерживающего лечения у мальчиков до 3 лет. Лучевая профилактика нейрорлейкоза проводится только больным ОЛЛ высокого риска.

По данным нашей клиники БСВ в группе больных ОЛЛ стандартного и среднего риска составляет 90 и 84,7% соответственно, а высокого риска — 62,5% (срок наблюдения более 4 лет).

Значительное ухудшение прогноза ОЛЛ у детей после рецидива подчеркивает необходимость улучшать инициальную терапию для его предотвращения. Возникновение рецидивов делает необходимыми дальнейшие научные разработки, направленные на более полное раскрытие биологической гетерогенности опухоли, совершенствование системы прогностических факторов и выявление причин резистентности к различным химиопрепаратам.

Лечение рецидивов ОЛЛ у детей проводится с помощью интенсивных программ химиотерапии, включающих высокие дозы химиопрепаратов (метотрексат, цитарабин).

Из новых подходов к лечению используются нуклеозидные аналоги (флударабин), липосомный даунорубицин, иматиниба мезилат (Гливек) при наличии у больных транслокации t(9;22), а также моноклональные антитела CD19 и CD3. Abshire с соавт. (1995) пока-

Сравнительный метаанализ кооперативных протоколов лечения ОЛЛ у детей

Протокол	Годы	Число больных	Критерии включения (по группам риска и возрасту)	Бессобытийная выживаемость, %
ALOP-ALL 88	1988—1992	396	все < 15 лет	66,4 (5 лет)
BFM 86	1986—1990	998	все < 18 лет	72 (6 лет)
BFM 90	1990—1995	1950	все < 19 лет	76 (5 лет)
CCG-105	1983—1989	1388	MIRG, < 21 года	68 (7 лет)
CCG-882	1991—1995	311	HRG, < 21 года	75 (5 лет)
Dana-Faber 85—01	1985—1987	220	все < 18 лет	73 (7 лет)
Dutch VI	1984—1988	291	все < 15 лет	72 (6 лет)
FRALLE-8	1983—1987	559	все < 15 лет	57 (7 лет)
MRC UK ALL X	1985—1990	1612	все < 15 лет	62 (5 лет)
POG AlinC-14	1986—1990	2404	все < 21 года	66,4 (4 года)
POG 9005	1991—1993	609	LRG, < 21 года	79,6 (4 года)
SICRH-XI	1984—1988	358	все < 18 лет	71 (8 лет)
SICRH-XII	1988—1991	188	все < 18 лет	67 (5 лет)
SICRH-XIIIa	1991—1994	165	все < 18 лет	80,2 (5 лет)

зали, что еженедельное введение ПЭГ-аспарагиназы повышает уровень достижения повторных ремиссий по сравнению с использованием ее 1 раз в 2 нед. Менее эффективен препарат при быстром снижении клиренса аспарагиназы или появлении высокого титра антител к аспарагиназе в сыворотке крови. Больные с повторной ремиссией ОЛЛ нуждаются также в профилактике нейролейкоза. Терапией выбора при костномозговых рецидивах является ТГСК от гистосовместимого донора.

Barret с соавт. (1995) опубликовали сравнительные данные о 5-летней БРВ больных при применении ТГСК (40%) и химиотерапии (17%). Hoogerbrugge с соавт. (1995) указывают на соотношение 44 и 24%, Uderzo с соавт. (1995) — 37 и 22%, а Schroeder с соавт. (1999) — 35 и 15%. Учитывая, что небольшое число пациентов имеет гистосовместимых доноров, альтернативными методами являются пересадка стволовых периферических клеток, неродственного костного мозга и стволовых клеток донорской пуповинной крови. Исследования в этом направлении продолжаются.

По сведениям немецких исследователей, входящих в группу BFM, имеются обнадеживающие результаты при лечении рецидивов по протоколам ALL-BFM 96 и ALL-BFM 01.

В случаях нейролейкоза применяется эндолюмбальное введение метотрексата, цитарабина и дексаметазона (преднизона). Однако имеются единичные исследования, указывающие на то, что эндолюмбальное введение трех препаратов не имело преимуществ по сравнению с использованием двух агентов (метотрексат, дексаметазон или преднизон).

В случаях нейролейкоза обязательна системная химиотерапия, включающая постиндукционную интенсификацию, и поддерживающее лечение. Экстрамедуллярное поражение ЦНС требует назначения лучевой терапии (как правило, в СОД 24 Гр).

По данным группы CCG (1998), 6-летняя БСВ наблюдалась у 37% детей с ОЛЛ, имеющих нейролей-

коз. В исследованиях POG-группы (1999) получены обнадеживающие результаты лечения изолированного поражения ЦНС у больных, не получивших предшествующего облучения головного мозга, — 4-летняя БСВ составила 71% при терапии 83 детей с ОЛЛ, из которых у 46% больных с продолжительностью первой ремиссии составила менее 18 мес. и у 54% — более 18 мес. Больные получали системную химиотерапию, включающую в период индукции винкристин, дексаметазон и дауномицин с последующим введением для консолидации ремиссии высоких доз цитарабина и L-аспарагиназы, а затем для постиндукционной интенсификации — альтернативные курсы внутривенного введения метотрексата/6-меркаптопурина и циклофосфамида/этопозиды в течение 11 нед. После 5 мес. интенсивной терапии больным назначался винкристин, дексаметазон и L-аспарагиназа, а также проводилась лучевая терапия на область головного мозга (СОД 24 Гр) и спинальное облучение (СОД 15 Гр). В последующие 18 мес. осуществлялось менее интенсивное лечение, заключающееся в альтернативных 6-недельных курсах 6-меркаптопурина ежедневно и метотрексата еженедельно *per os*, а также внутривенных введениях циклофосфамида/этопозиды. Пациенты также получали 9-кратное эндолюмбальное введение «triple»-терапии в первые 22 нед. лечения. Поражение костного мозга отмечалось у 10 из 14 больных, у которых после лечения наблюдали рецидив заболевания.

В случаях изолированного лейкемического поражения яичек у мальчиков с ОЛЛ терапия состоит из системной реиндукционной химиотерапии, профилактики нейролейкоза, интенсификации и поддерживающего лечения. Общепринято применение билатерального облучения яичек в СОД 24 Гр. Имеются сообщения об исключении лучевой терапии при поражении яичек, в этих случаях используются средние дозы метотрексата, вводимого парентерально.

В настоящее время очевидно, что если у детей с ОЛЛ с прогнозируемым хорошим исходом можно

ограничиться теми программами терапии, которые доказали свою эффективность, то особого внимания заслуживают больные, имеющие высокий риск развития рецидива, лечение которых требует дальнейшего совершенствования, учета индивидуальной чувствительности пациентов к химиопрепаратам и проведения мероприятий для профилактики и снижения их токсичности.

Важный момент заключается в совершенствовании тактики сопроводительного лечения, включающего своевременное назначение инфузионной терапии, антибактериальных, противогрибковых и противовирусных средств, препаратов протекторного действия, КСФ и др. (см. гл. 9).

#### Основная литература

1. Avramis V.S., Senser S., Periclou A.P. et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard risk acute lymphoblastic leukemia: a children's Cancer group study // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 1986–1994.
2. Carroll W.L., Bhojwani D., Min D.J. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia // *Hematology*. — 2003. — Vol. 1. — P. 102–131.
3. Clarke M., Gaynon P., Hann J. et al. CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: childhood ALL collaborative group overview of 43 randomized trials // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 1798–1809.
4. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. — 2000. — Vol. 96. — No 8. — P. 2691–2696.
5. Donadieu J., Hill C. Early response to chemotherapy as a prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia: a methodological review // *Br. J. Haematol.* — 2001. — Vol. 115. — No 1. — P. 34–45.
6. Hann J., Vora A., Richards S. et al. Benefit of intensified treatment for all children with acute lymphoblastic leukemia: Results from MRC UKALL XI and MRC ALL

- 97 randomised trials // *Leukemia*. — 2000. — Vol. 14. — P. 356.
7. *Kaspers G.J., Pieters R., Van Zantwijk C.H. et al.* Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs // *Blood*. — 1998. — Vol. 92. — P. 259.
  8. *Lange B., Sather H., Weetman R. et al.* Double delayed intensification improves outcome in moderate risk pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): A Children's Cancer Group study, CCG-1891 [abstract] // *Blood*. — 1997. — Vol. 90. — P. 559.
  9. *Lauten M., Zimmerman M., Reiter A. et al.* Bone marrow day 15 has an additional impact on the prediction of event free survival in children with acute lymphoblastic leukemia characterized by the prednisone response (abstract) // *Blood*. — 2002. — Vol. 100. — P. 69a.
  10. *Margolin J.F., Poplack D.G.* Acute Lymphoblastic Leukemia: Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3<sup>rd</sup> ed. / Eds. Ph.A. Pizzo, D.G. Poplack. — Philadelphia — New York, 2002. — P. 409–463.
  11. *Nachman J., Sather H.N., Gaynon P.S. et al.* Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significans of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features. A report from the Children's Cancer Group // *J. Clin. Oncol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 2222.
  12. *Pui C.H., Relling M.V., Dawning J.R.* Acute lymphoblastic leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2004. — Vol. 350. — P. 1535–1548.
  13. *Schrapppe M., Reiter A., Zimmermann M. et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995 // *Leukemia*. — 2000. — Vol. 14. — P. 2205–2222.
  14. *Seeger K., Buchwald D., Peter A. et al.* TEL-AML 1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. — 1999. — Vol. 94, No 1. — P. 374–376.
  15. *Silverman L., Kimball Dalton V., Zong et al.* Erwinia asparaginase is less toxic than E.coli asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Results from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium // *Blood*. — 1999. — Vol. 94. — P. 290.

## Острые миелоидные лейкозы

А.В. Пона

Острые миелоидные лейкозы у детей и подростков проявляются так же, как у взрослых. Тем не менее отмечена разница в демографии, патогенезе, токсичности лечения и выживаемости больных. Например, у больных раннего возраста может быть выраженная генерализация лейкоемического процесса с лучшим исходом и даже спонтанной регрессией. Особенно это касается врожденного лейкоза у детей в возрасте до 1 года и пациентов с синдромом Дауна. По сравнению со взрослыми, ОМЛ у детей встречается реже — лишь 15–20% среди всех случаев лейкоза.

Причина развития ОМЛ до настоящего времени остается неизвестной. Повышенное внимание было уделено довольно частым случаям развития ХМЛ и ОМЛ у перенесших атомную бомбардировку жителей Хиросимы и Нагасаки, особенно в возрасте старше 45 лет на момент бомбардировки [4]. Острые мие-

лоидные лейкозы у этой группы людей обычно развивались через 6–10 лет после катастрофы. В то же время не было отмечено увеличения числа случаев ОМЛ среди населения, проживавшего во время аварии на атомной станции в районе Чернобыля. Вместе с тем, есть данные, что в России количество острых лейкозов увеличилось через 4 года после Чернобыльской аварии с дальнейшим его снижением до прежнего уровня.

### 6.1. Патогенез

Чтобы выяснить механизм лейкемогенеза у выживших после атомной бомбардировки людей, их опухолевые клетки сравнивались с опухолевыми клетками пациентов с ОМЛ, рожденных значительно позднее бомбардировки, используя метод FISH. Было выявлено достоверно более высокое содержание субклонов с моносомией 7 и делецией участка 20q13.3 в популяции, перенесшей атомную бомбардировку. Более того, сегментарная транслокация *C-KIT*-гена была обнаружена в группе, побывавшей в зоне с повышенным уровнем радиации. Такая генетическая аномалия предполагает, что население, пережившее воздействие радиации, характеризуется генетической нестабильностью, которая может привести к развитию лейкоза.

Давно известно, что терапевтическое облучение иногда ассоциируется с развитием ОМЛ, а облучение при лечении анкилозирующего спондилита пятикратно повышает риск ОМЛ. Также отмечено более частое развитие ОМЛ у больных лимфомой Ходжкина после химиотерапии (в сочетании с радиотерапией или без нее), через 5–10 лет после окончания лечения.

И все же какую-либо единственную причину заболевания ОМЛ у детей назвать нельзя. Возможно, на развитие ОМЛ влияет длительное воздействие пестицидов, принимаемых с пищей, прием алкоголя и

ингибиторов топоизомеразы II матерью во время беременности. Кроме того, у детей может развиваться вторичный лейкоз или миелодиспластический синдром вследствие приема алкилирующих агентов или ингибиторов топоизомеразы II при лечении другой опухоли. Это все отражает крайнюю уязвимость плода к лейкемогенным агентам. Ионизирующая радиация, множественные выкидыши у матери, курение марихуаны в период беременности не влияли на развитие лейкоза у детей.

Дети, получавшие химиотерапию во время лечения другой опухоли, имеют больший риск заболеть вторичным ОМЛ, чем другие дети. Различают две формы вторичного ОМЛ, одна из которых встречается чаще, особенно после применения алкилирующих агентов. Морфологически эти клетки относятся к менее дифференцированным и часто ассоциируются с моносомией 7 или *del(7q)* и предшествующим миелодиспластическим синдромом в течение 5–7 лет. Риск вторичного ОМЛ связан также с суммарной дозой алкилирующих агентов, дозой и объемом терапевтического облучения и возрастом пациентов. Наибольший риск (23%) вторичных лейкозов отмечен у больных с метастатической саркомой Юинга, леченных интенсивно с использованием ифосфамида, циклофосфана и лучевой терапии.

Известна и другая форма вторичного ОМЛ — развивающаяся вследствие лечения ингибиторами топоизомеразы II (эпиподофиллотоксины) и антрациклиновыми антибиотиками. В этом случае наиболее часто развивается миеломоноцитарный или монобластный ОМЛ, нередко встречается аномалия длинного плеча хромосомы 11 (11q23). Эта форма вторичного ОМЛ встречается у 2–3% больных и не зависит от их возраста или доз химиопрепаратов. Отмечается много сходных черт между вторичными ОМЛ и ОМЛ у детей в возрасте до 3 лет.

Острые миелоидные лейкозы возникают при трансформации гемопоэтической клетки, которая яв-

ляется родоначальницей клональной популяции опухолевых клеток, замещая при этом нормальные клетки костного мозга, а также может поражать экстрамедуллярные ткани. Точное количество генных мутаций, участвующих в возникновении и патогенезе ОМЛ, до сих пор не определено. Несмотря на расширяющиеся знания о природе человека, точные цели этих мутаций не вполне ясны. В большинстве случаев ОМЛ нельзя определить клетку-родоначальницу опухолевого клона.

Трансформация гемопоэтической клетки в стволовую лейкозную клетку теоретически может произойти на стадии развития: от полипотентной стволовой до клетки-предшественницы, например, миелобласта. Использование клональных маркеров, которые определяются посредством цитогенетического анализа, помогло установить происхождение опухолевых клонов. Так, у некоторых пациентов клональные маркеры отмечались на эритроидных, мегакариоцитарных и гранулоцитарных клетках, включая полипотентные предшественники: клетки КОЕ или КОЕ-ГМ. У других пациентов опухолевые клональные маркеры были определены только на клетках гранулоцитарных и макрофагальных линий, предполагающих вовлечение коммитированных гранулоцитарно-макрофагальных предшественников. Правда, этот анализ в какой-то степени не является естественным, так как лейкозные клетки утрачивали взаимосвязь и искусственно регулировали экспрессию миелоид-специфических генов, что затрудняло применение приобретенных знаний о развитии нормальной гемопоэтической дифференцировки. Тем не менее, например, при ХМЛ стволовая клетка является родоначальницей опухолевого клона.

В настоящее время известно, как минимум, три потенциальных механизма, посредством которых лейкозные клетки могут накапливаться в костном мозге. Один из них способствует более быстрой пролиферации опухолевых клеток по сравнению с нор-

мальными клетками костного мозга, хотя при исследовании *in vitro* рост лейкемических и нормальных гемопоэтических клеток в тканевых культурах одинаков. Для поддержания роста большинства лейкозных клеток при ОМЛ требуются ростовые факторы, такие как ГМ-КСФ, Г-КСФ, ИЛ-3 и М-КСФ. Но в то же время в 20–25% всех случаев ОМЛ отмечается спонтанный рост культуры лейкозных клеток без экзогенного добавления гемопоэтических факторов роста, при этом обессмертившаяся лейкозная клеточная линия не может самовоспроизводиться.

Другим потенциальным механизмом клеточной трансформации является нарушение запрограммированной клеточной смерти, или апоптоза, генетически детерминированного биохимического процесса, посредством которого происходит последовательная гибель клеток. Существует множество механизмов, с помощью которых запускается и протекает апоптоз. При ОМЛ выявлен механизм, при котором отмечается повышенная экспрессия негативного регулятора клеточной смерти Bcl2 вследствие хромосомной аномалии, вовлекающей BCL2-ген.

Третий механизм патогенеза лейкозных клеток состоит в блокировке нормальной дифференцировки клеток-предшественников гемопоэза, однако молекулярные основы этого до сих пор не выяснены. Одним из примеров его, тем не менее, является ОПЛ, при котором в результате транслокации t(15;17) формируется аномальный ген PML/RAR $\alpha$ , способствующий синтезу патологического белка Pml/Rar $\alpha$ , который блокирует клеточную дифференцировку путем ингибирования рецептора к ретиноидам. Лейкозные клетки нормально дифференцируются до промиелоцитов, после чего происходит полная остановка дифференцировки. Этот блок может быть преодолен назначением полностью транс-ретиноевой кислоты (all trans retinoic acid — ATRA, третиноин). Такой пример иллюстрирует возможность лечения ОМЛ посредством агентов клеточной дифференцировки.

## 6.2. Диагностика

Морфологически ОМЛ достаточно гетерогенен. В гл. 1 подробно представлена морфологическая характеристика группы ОМЛ.

Нормальные гемопоэтические клетки изменяются по мере созревания от стволовых до различных линейно-специфических клеток костного мозга, а также меняется экспрессия тех или иных антигенов. Моноклональные антитела используются для определения линейно-специфических и стадиоспецифических антигенов лимфоидной и миелоидной дифференцировки бластов. Моноклональные антитела помогают установить диагноз ОМЛ и отдифференцировать ОМЛ от ОЛЛ, если это затруднительно при морфоцитохимическом исследовании. Некоторые миелоидные маркеры могут определяться и на лимфобластах, и тогда диагноз ОМЛ не может быть установлен на основании только результатов иммунофенотипирования. Подробные данные по иммунофенотипированию представлены в гл. 2.

Внедрение в медицину техники хромосомного анализа, обладающей высокой разрешающей способностью, способствовало развитию молекулярных основ изучения ОМЛ (см. гл. 3). Клональные хромосомные аномалии могут определяться в большинстве случаев ОМЛ и способствовать более точной диагностике. Существуют хромосомные аномалии, характерные для определенных морфологических вариантов ОМЛ:  $t(15;17)$  — для ОЛЛ,  $t(8;21)$  — для М2 ОМЛ,  $inv(16)$  — для М4 ОМЛ. Но и другие аномалии, например вовлекающие *MLL*-ген, локализованный в 11q23, могут определяться в бластах не только при различных морфологических вариантах ОМЛ, но и при ОЛЛ. Исследование с помощью FISH позволяет определить генетические аномалии при ограниченных возможностях стандартного цитогенетического исследования. Применяя FISH-исследование, можно выявить хромосомные aberrации не только на метафазных, но

и на интерфазных ядрах, что особенно важно для обнаружения остаточного клона клеток после химиотерапии. Подробнее генетические изменения при ОМЛ у детей излагаются в гл. 2.

Применяемая до недавнего времени FAB-классификация, основывалась только на морфологических признаках опухолевых клеток (см. гл. 1). Новая классификация ОМЛ ВОЗ (2008) для опухолевых заболеваний системы крови базируется на морфологических, иммунофенотипических и цитогенетических признаках опухолевых клеток, а также на клинических проявлениях заболевания [16].

### Классификация ОМЛ ВОЗ (2008)

ОМЛ с неслучайно встречающимися генетическими аномалиями

- ОМЛ с  $t(8;21)(q22;q22)$ ; *RUNX1-RUNX1T1*
- ОМЛ с  $inv(16)(p13.1;q22)$  или  $t(16;16)(p13.1;q22)$ ; *CBFB-MYH11*
- Острый промиелоцитарный лейкоз с  $t(15;17)(q22;q12)$ ; *PML-RARA*
- ОМЛ с  $t(9;11)(q22;q23)$ ; *MLLT3-MLL*
- ОМЛ с  $t(6;9)(p23;q34)$ ; *DEK-NUP214*
- ОМЛ с  $inv(3)(q21;q26.2)$  или  $t(3;3)(q21;q26.2)$ ; *RPN1-EVII*
- ОМЛ (мегакариобластный) с  $t((1;22)(p13;p13)$ ; *RBM15-MKL1*
- ОМЛ с мутантным геном *NPM1*
- ОМЛ с мутантным геном *CEBPA*

ОМЛ с признаками миелодисплазии

Вторичный ОМЛ

ОМЛ без специфических особенностей

- ОМЛ с минимальной дифференцировкой
- ОМЛ без признаков созревания
- ОМЛ с признаками созревания
- Острый миеломонобластный лейкоз
- Острый монобластный и моноцитарный лейкоз

- Острый эритроидный лейкоз
- Острый мегакариобластный лейкоз
- Острый базофильный лейкоз
- Острый панмиелоз с миелофиброзом

Миелоидная саркома

Миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна

- Транзиторный аномальный миелопоэз
- Миелоидный лейкоз, ассоциированный с синдромом Дауна

Бластная неоплазия из плазмацитоидных дендритических клеток.

### 6.3. Клиника

Большинство симптомов при ОМЛ отражает недостаточность нормального кроветворения и инвазию опухолевых клеток в экстрамедуллярные органы и ткани: кожу, слизистые полости рта (гингивит), орбиту, головной и спинной мозг. При ретроспективном анализе клинические проявления ОМЛ обычно начинают отмечаться родителями пациента за 2–4 нед., иногда за 1–2 мес. до установления диагноза.

Клиническая картина ОМЛ достаточно хорошо известна и проявляется следующими синдромами: анемическим, геморрагическим и токсическим. Представленные симптомы и синдромы являются отражением снижения продукции эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов. Первым симптомом ОМЛ у детей может быть лейкозное экстрамедуллярное поражение кожи.

Повышенная утомляемость, бледность кожных покровов, выраженная слабость, головокружение, головная боль, одышка, тахикардия являются симптомами анемии, которая обычно бывает нормохромной. Уровень гемоглобина в анализе периферической крови может колебаться от 27 до 140 г/л, составляя в среднем 70 г/л. Часто родители не обращают внимания на повышенную утомляемость ребенка, бледность кож-

ных покровов, объясняя эти симптомы большими нагрузками в школе и недостаточным нахождением ребенка на свежем воздухе.

Тромбоцитопения обычно является причиной развития геморрагического синдрома, который может быть представлен как кожными проявлениями (петехии, пурпура, экхимозы, гематомы), так и различными кровотечениями: носовыми, кишечными, маточными, с поверхности слизистой десен и полости рта. На момент диагностики приблизительно у 50% детей, больных ОМЛ, уровень тромбоцитов по данным анализов периферической крови составляет не более  $50 \cdot 10^9/\text{л}$ . Кроме того, геморрагический синдром часто бывает проявлением синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), который может развиваться при любом варианте ОМЛ, но особенно характерен для ОПЛ, так как активированный тромбопластин находится в гранулах патологических промиелоцитов. ДВС-синдром усиливается при лизисе опухолевых промиелоцитов вследствие индукционной цитостатической терапии. Для купирования ДВС-синдрома многие исследователи предлагали назначать небольшие дозы гепарина (100–150 Ед/кг/сут). Но в настоящее время для лечения ОПЛ стали применять изомер ретиноевой кислоты — полностью транс-ретиноевую кислоту (АТРА, третиноин), используя который в терапии этого заболевания можно избежать усиления ДВС-синдрома.

Как правило, в дебюте заболевания у детей, больных ОМЛ, снижено абсолютное количество гранулоцитов (менее  $1 \cdot 10^9/\text{л}$  в анализе периферической крови); часто развиваются инфекции, вызванные сапрофитными микроорганизмами, локализующимися обычно в полости рта, кишечнике, параректальной области, легких, на коже. Наиболее часто повышение температуры тела, обусловленное инфекционным процессом, отмечается при снижении абсолютного количества нейтрофилов менее  $0,2 \cdot 10^9/\text{л}$ . В связи с этим фебрильную температуру до начала цитостати-

ческой терапии, в первую очередь, необходимо рассматривать как признак инфекции, для подтверждения которой требуется бактериологическое исследование крови, кала, мочи, мазков из полости рта, носа и с поверхности кожи, а также назначение эмпирической антибактериальной терапии с последующей ее коррекцией в зависимости от результатов бактериологических исследований.

Количество лейкоцитов в анализе периферической крови детей, больных ОМЛ, варьируемо. Приблизительно у  $\frac{1}{4}$  части пациентов отмечается увеличение числа лейкоцитов более  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ . Количество бластных клеток может быть увеличено как значительно (более 80%), так и незначительно, вплоть до полного их отсутствия, несмотря на гиперклеточное состояние костного мозга с содержанием бластных клеток в пунктате костного мозга 90–100%.

Гепатомегалия и спленомегалия встречаются более чем в половине всех случаев ОМЛ у детей. Выраженный гепатолиенальный синдром отмечается у 25% больных ОМЛ и больше характерен для пациентов, у которых имеется моноцитонный компонент в опухолевых клетках (M4 и M5 FAB-варианты).

Лимфатические узлы у большинства больных — небольших размеров, безболезненные, не спаяны с кожей и друг с другом. В редких случаях наблюдаются увеличенные лимфатические узлы размером от 2,5 до 5 см с образованием конгломератов в шейно-надключичной области.

Изменения в костно-суставной системе в некоторых случаях проявляются выраженными оссалгиями в нижних конечностях и в области позвоночного столба, что сопровождается нарушением движений и походки. На рентгенограммах костной системы отмечаются деструктивные изменения различной локализации, периостальные реакции, явления остеопороза.

Экстрадуральные опухолевые поражения чаще проявляются гингивитом и экзофтальмом, в том числе двусторонним; в редких случаях отмечается

опухолевая инфильтрация мягких тканей, гипертрофия небных миндалин, поражение носоглотки и лицевого нерва. Экстрадуральные локализации ОМЛ объединяет термин «гранулоцитарная (миелоидная) саркома», включая классическую хлорому и непигментированные опухоли.

По данным аутопсии миелоидная саркома диагностируется у больных ОМЛ в 3–8% случаев. Она может предшествовать поражению костного мозга или сочетаться с признаками ОМЛ, характеризующимися бластной инфильтрацией костного мозга и наличием бластов в периферической крови, а также наблюдаться при рецидиве заболевания. Наиболее частой локализацией опухолевого роста является орбита (поражаются мягкие ткани орбиты и внутренние структуры черепа). Бластные клетки чаще представлены FAB M2-вариантом и транслокацией t(8;21), а у детей в возрасте до 1 года — M4- и M5-вариантами ОМЛ. Ряд авторов указывает на более плохой прогноз у этих больных, чем у детей с ОМЛ без экстрадуральной инфильтрации.

Поражение ЦНС может быть как локальным, представленным миелоидной саркомой этой зоны, так и диссеминированным с поражением оболочек головного мозга. Клинически вовлечение в лейкозный процесс ЦНС проявляется головной болью, тошнотой, рвотой, фотофобией. Поражение ЦНС должно быть подтверждено анализом цитологических препаратов, приготовленных центрифугированием ликвора. Вовлечение в лейкозный процесс ЦНС отмечается у 5–15% детей с ОМЛ. Поражение ЦНС коррелирует с высоким лейкоцитозом или возрастом пациентов менее 2 лет на момент диагностики ОМЛ, а также у детей с M4Eo- и M5-вариантами.

#### 6.4. Прогноз

До применения интенсивных программ химиотерапии решение вопроса о факторах прогноза при ОМЛ у детей представляло определенные трудности, поскольку

ку у большинства этих пациентов либо не достигалась ремиссия, либо развивались очень ранние рецидивы. Но в последние 25 лет благодаря интенсификации химиотерапии стали выявляться различные клинико-лабораторные признаки, от которых зависит прогноз ОМЛ у детей. В первую очередь, он зависит от кариотипа опухолевых клеток. Так, к прогностически благоприятным относятся следующие аномалии:  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$ ,  $inv(16)$ ,  $t(9;11)$  и другие аномалии 11q23, исключая  $t(10;11)$ ; к «промежуточным» — нормальный кариотип, к высокому риску развития рецидива —  $-5$ ,  $-7$ ,  $7q$ -, более пяти различных аномалий, исключая стандартные. По данным протокола CCG-213, выживаемость больных с  $t(8;21)$  оказалась довольно низкой, что заставило исследователей отнести больных с данной аномалией в неблагоприятную по прогнозу группу. Но необходимо отметить, что протокол CCG-213 оказался недостаточно интенсивным. По данным Ю.А. Батуриной с соавт., из 16 больных с транслокацией  $t(8;21)$ , получавших лечение по программе «7 + 3», 5-летняя БРВ составила  $15,3 \pm 10\%$ , в то время как 5-летняя БРВ детей с ОМЛ, леченных по программе AML-BFM 87, была  $58,3 \pm 20\%$ . Эти данные подтверждают необходимость проведения адекватной, достаточно интенсивной терапии больным ОМЛ с благоприятным прогнозом.

До сих пор нет определенных данных о значении инициального уровня лейкоцитов, размеров паренхиматозных органов для прогноза ОМЛ. В первую очередь это связано с различной по интенсивности терапией, используемой различными авторами, и гетерогенностью ОМЛ. Практически все группы исследователей отмечают неблагоприятное течение ОМЛ при FAB M4 без  $inv(16)$ , M5, M6 и M7 морфологических вариантах.

Следует отметить, что группа BFM в исследованиях AML-BFM 83 и AML-BFM 87 впервые определила гематологические и морфологические признаки прогноза ОМЛ у детей (табл. 6.1) [6]. К сожалению, в исследовании было включено недостаточное количе-

ство детей с FAB M6 (7 пациентов) и FAB M7 (3 пациента), поэтому адекватно оценить прогноз у этих пациентов не представлялось возможным.

Таблица 6.1

### Стратификация детей с ОМЛ на различные группы риска согласно результатам протокола AML-BFM 83 [9]

	Группа риска I	Группа риска II
	6-летняя бессобытийная выживаемость > 80%	6-летняя бессобытийная выживаемость < 45%
FAB M1	Палочки Ауэра есть	Палочек Ауэра нет
FAB M2	Лейкоцитоз < $20 \cdot 10^9/\text{л}$	Лейкоцитоз > $20 \cdot 10^9/\text{л}$
FAB M3	Все*	—
FAB M4	Эозинофилы в пунктате костного мозга $\geq 3\%$	—
FAB M5	—	Все
FAB M6	Все*	—
FAB M7	—	Все*
Дополнительный фактор для группы риска II: время достижения ремиссии		> 10 нед.

\* Малое количество больных.

## 6.5. Лечение

Результаты лечения детей, больных ОМЛ, за последние 15 лет существенно улучшились благодаря, в первую очередь, применению системной терапии.

Первые попытки создания рандомизированного протокола для лечения детей с ОМЛ были предприняты в США Научно-исследовательским детским госпиталем St. Jude, Memphis в 1968 г. В исследование было включено 58 детей, и только один из них прожил 5 лет [5]. По данным голландских исследователей, из 57 детей, больных ОМЛ, лечившихся по протоколам,

предназначенным для детей с ОЛЛ, ни один больной не выжил [14]. Во Франции и Великобритании дети с ОМЛ получали лечение по протоколам, предназначенным для взрослых больных, и также с плачевными результатами. В начале 70-х годов прошлого века был создан первый протокол группы CCG-102, состоявший из 4–7 курсов химиотерапии с интервалами между курсами 14 дней и поддерживающей терапии. Каждый курс химиотерапии состоял из винкристина, преднизолона, цитарабина, 6-тиогуанина и циклофосфида. Поддерживающая терапия длилась от 3 до 5 лет и заключалась в ежедневном приеме 6-тиогуанина и четырехдневном назначении цитарабина в сочетании с циклофосфаном каждые 28 дней. Шестилетняя БРВ составила всего лишь 14% [4], но протокол CCG-102 решил одну из главных задач — был разработан режим химиотерапии. С этого времени 14–21-дневный интервал между курсами химиотерапии при лечении детей с ОМЛ стал стандартным. Ни профилактика лейкозного поражения ЦНС, ни различные виды ТГСК не были включены в это исследование. Более успешные результаты (6-летняя БСВ — 38%) были получены в Европе и США в середине 70-х годов прошлого века после применения протоколов терапии, основанных на применении антиметаболитов и антрациклиновых антибиотиков: «7 + 3» (цитарабин и даунорубин) или DAT (даунорубин, цитарабин, 6-тиогуанин) [1, 4, 14]. Следовательно, в 70-х годах XX в. было показано, что основными препаратами для лечения детей с ОМЛ являются цитарабин (200 мг/м<sup>2</sup>/сут), даунорубин (60 мг/м<sup>2</sup>/сут) и 6-тиогуанин (50 мг/м<sup>2</sup>/сут), а интервалы между курсами химиотерапии не должны превышать 21 дня.

Группа исследователей BFM из Германии в протоколах AML-BFM 83 и AML-BFM 87 индукции ремиссии предложила увеличить суммарную дозу даунорубина до 180 мг/м<sup>2</sup>, сохраняя невысокие дозы цитарабина — 100–200 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–8-й дни, и добавить этопозид в суммарной дозе 500 мг/м<sup>2</sup>. Полная

ремиссия была достигнута в 76,4% случаях при лечении по протоколу AML-BFM 83 и в 74,9% случаев — по протоколу AML-BFM 87. Терапия консолидации ремиссии состояла из 8-недельного (AML-BFM 83) и 6-недельного (AML-BFM 87) курсов химиотерапии (цитарабин 75 мг/м<sup>2</sup>/сут №32 и 24 соответственно, даунорубин 30 мг/м<sup>2</sup> №4 в суммарной дозе 120 мг/м<sup>2</sup>, 6-тиогуанин 60 мг/м<sup>2</sup> ежедневно, циклофосфан 500 мг/м<sup>2</sup> №2, винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup>/сут №4). После консолидации ремиссии проводилась поддерживающая терапия до 24 мес. от начала лечения, состоявшая из четырехдневных курсов цитарабина (40 мг/м<sup>2</sup>/сут) каждые 28 дней, ежедневного приема 6-тиогуанина (40 мг/м<sup>2</sup>/сут) и одного раза в 56 дней — доксорубина (25 мг/м<sup>2</sup>/сут). Даунорубин назначался до достижения суммарной дозы антрациклинов 400 мг/м<sup>2</sup>. Пятилетняя БСВ детей с ОМЛ, получивших лечение по протоколу AML-BFM 83, составила 47 ± 4% [3].

Следует отметить, что основным в исследовании AML-BFM 87 был вопрос о необходимости проведения краниального облучения и возможности замены его на два курса химиотерапии, содержащей высокие дозы цитарабина. В связи с этим в протоколе AML-BFM 87 после консолидации в терапию были добавлены два курса ранней интенсификации, состоявшие из высоких доз цитарабина (3000 мг/м<sup>2</sup>) и этопозид (суммарная доза 500 мг/м<sup>2</sup>) — НАЕ. Профилактическое краниальное облучение в СОД 18 Гр проводилось в начале поддерживающей терапии. Больные без инициального поражения ЦНС были разделены на две группы: пациенты, получившие краниальное облучение, и больные без облучения ЦНС. Поддерживающая терапия была такой же, как и в протоколе AML-BFM 83, за исключением доксорубина, и была короче — до 18 мес. от начала лечения. Первые результаты показали, что отказ от проведения облучения ЦНС привел к значительному увеличению рецидивов с лейкозным поражением ЦНС и костного мозга. Детальный ана-

лиз вероятности развития рецидивов в рандомизированных и нерандомизированных группах пациентов продемонстрировал необходимость проведения краниального облучения с целью профилактики лейкозного поражения ЦНС. У пациентов, не подвергшихся рандомизации, вероятность развития рецидивов в группе больных, которым было проведено облучение ЦНС, была значительно меньше, чем в группе больных, которым краниальное облучение не проводилось:  $29 \pm 5$  и  $50 \pm 6\%$  соответственно ( $p = 0,001$ ); в рандомизированных группах — соответственно  $33 \pm 14\%$  и  $56 \pm 12\%$  ( $p = 0,12$ ). Полная ремиссия была достигнута у 75% детей, 5-летняя БСВ, БРВ и общая выживаемость (ОВ) была соответственно  $41 \pm 3$ ,  $49 \pm 3$  и  $55 \pm 3\%$  [8].

Результаты доклинических исследований идарубина *in vitro*, показавшие его большую эффективность, а также сокращение выраженности множественной лекарственной резистентности по сравнению с даунорубицином [2], позволили в протоколе AML-BFM 93 провести рандомизированное исследование между курсами индукции ремиссии ADE и AIE (цитарабин, идарубин, этопозид). Кроме того, больным, относившимся к группе высокого риска, проводилась вторая рандомизация: после окончания ADE на 21-й день начиналась терапия HAM (высокие дозы цитарабина и митоксантрон) с последующим 6-недельным курсом консолидации или в другой группе — шестинедельный курс консолидации с последующим курсом HAM. В дальнейшем всем больным проводился курс химиотерапии HAE и поддерживающая терапия до 18 мес., считая от начала индукции ремиссии. Полная ремиссия была достигнута у 82% больных, 5-летняя БСВ, БРВ и ОВ составили соответственно  $50 \pm 2$ ,  $61 \pm 3$  и  $57 \pm 2\%$ . Была отмечена достоверная разница в ответе на терапию к 15-му дню между больными, получавшими ADE и AIE: в пунктате костного мозга количество бластов более 5% было соответственно в 31 и 17%

случаев ( $p = 0,01$ ) [7]. В то же время не было выявлено значимой разницы в 5-летней БСВ между больными, получившими ADE или AIE:  $57 \pm 4$  и  $60 \pm 4\%$  соответственно ( $p = 0,55$ ) [7]. Практически одинаковые БСВ, БРВ и ОВ были получены в обеих группах больных при использовании второй рандомизации (HAM после ADE или после 6-недельной консолидации) —  $49 \pm 5$  и  $41 \pm 5$ ;  $56 \pm 6$  и  $49 \pm 6$ ;  $57 \pm 5$  и  $54 \pm 5\%$  соответственно. Несколько лучшая БСВ была в группе больных, получивших индукцию ремиссии ADE + HAM, чем ADE + 6-недельный курс консолидации.

Заметное улучшение выживаемости пациентов с ОМЛ при применении протокола AML-BFM 93 по сравнению с предыдущими исследованиями в большей степени было связано с улучшением сопроводительной терапии и снижением уровня ранней смертности.

Следовательно, группа BFM на основании данных собственных исследований доказала необходимость проведения краниального облучения у всех детей, больных ОМЛ, а повышение уровня выживаемости больных было связано не только с интенсификацией химиотерапии, но и с адекватной сопроводительной терапией.

В исследовании группы из Великобритании MRC AML 9 было показано отсутствие эффективности поддерживающей терапии у больных ОМЛ после интенсивного консолидирующего лечения, поэтому в последующих исследованиях ими поддерживающая терапия не применялась.

Одной из задач последующего исследования MRC AML 10 было сравнение двух режимов индукции ремиссии, состоявших или из двух курсов химиотерапии DAT «3 + 10», или ADE «10 + 3 + 5» (цитарабин, даунорубин и этопозид). Другой задачей было выявление роли ТГСК после интенсивной консолидирующей терапии. АллоТГСК была проведена всем больным, имевшим полностью совместимого родственного донора. Больных, у которых не было со-

вместимого донора, разделяли на две группы: 1) проводилась аутоТГСК после двух интенсивных курсов консолидации ремиссии (забор костного мозга осуществлялся после третьего курса химиотерапии); 2) отсутствие лечения после окончания консолидации ремиссии. Суммарная доза антрациклинов и цитарабина в обеих группах была одинаковой: 550 мг/м<sup>2</sup> и 10,6 г/м<sup>2</sup>, а этопозида различалась: 500 и 1500 мг/м<sup>2</sup>.

В результате лечения детей с ОМЛ согласно протоколу MRC AML 10 ремиссия была достигнута у 93% больных, при этом ранняя смертность составила всего 4%, а 5-летняя БСВ, БРВ и ОВ были соответственно 49, 53 и 58%. Не было получено достоверной разницы в количестве полных ремиссий при применении различных курсов индукции. Недостоверно выше была БСВ, БРВ и ОВ у больных, получавших индукционную химиотерапию, которая состояла из двух курсов ADE, по сравнению с DAT. Общая выживаемость была несколько выше у больных, подвергшихся аутоТГСК (70%), в сравнении с больными, которым терапия была остановлена после проведения двух курсов интенсификации (58%), достоверно снижалась вероятность развития рецидива после проведения аутоТГСК: 31 и 52% соответственно ( $p = 0,03$ ). Также 10-летняя БРВ была значительно лучше у больных после аутоТГСК: 68 и 44% соответственно ( $p = 0,02$ ) [9]. Десятилетняя ОВ больных, получивших аллоТГСК, была недостоверно выше, чем пациентов, нуждавшихся в аллоТГСК, но не подвергшихся ей в связи с отсутствием полностью совместимого родственного донора: 68 и 59% соответственно ( $p = 0,3$ ) [9].

В отличие от VFM-исследований, детей с ОМЛ в данном исследовании разделяли на три группы риска, основываясь на результатах кариотипа и ответа на первый курс химиотерапии.

В следующем исследовании группы MRC — MRC AML 12 в индукции ремиссии проводилось сравнение двух курсов химиотерапии MAE (митоксантрон, цитарабин, этопозид) и двух курсов ADE. Кроме того, на

основании результатов, полученных в предыдущих исследованиях, больные ОМЛ были стратифицированы на две группы риска: низкого и высокого. В группе низкого риска исследовалась длительность консолидирующей терапии — 2 или 3 курса. В группе высокого риска пациентам, у которых не было полностью совместимого родственного донора, проводили терапию, аналогичную терапии пациентов с низким риском, а детям с ОМЛ, у которых был полностью совместимый родственник донор, проводилась аллоТГСК сразу после первого курса консолидации либо после второго курса консолидации. Следовательно, данный протокол должен был решить следующие задачи: 1) возможность снижения дозы антрациклинов за счет замены даунорубицина на митоксантрон в индукции ремиссии; 2) определение необходимого количества курсов химиотерапии для лечения детей с низким и высоким риском без проведения аллоТГСК; 3) значение и место аллоТГСК у детей с ОМЛ, относящихся к группе высокого риска.

Полная ремиссия была достигнута у 92% больных, 4% детей не достигли ремиссии в связи с рефрактерностью к проведенной терапии и 4% пациентов умерли в течение 14 дней от начала лечения. Пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ составляла соответственно 56, 61 и 66%. Практически одинаковое количество полных ремиссий было у больных, получавших даунорубицин и митоксантрон в терапии индукции: 90 и 92% соответственно ( $p = 0,3$ ); также не было различий в резистентности к проведенному лечению и ранней смертности в обеих группах. Пятилетняя БРВ была значимо выше в группе детей с ОМЛ, получавших терапию индукции ремиссии с митоксантроном, чем с даунорубицином: 68 и 59% соответственно ( $p = 0,04$ ), а ОВ не различалась: 70 и 64% ( $p = 0,1$ ). Кроме того, не было достоверной разницы в 5-летней ОВ и БРВ между больными, получившими четыре или пять курсов химиотерапии: 81 и 78% ( $p = 0,5$ ); 65 и 66% ( $p = 0,8$ ). Вероятность рецидива также была одинаковой.

АллоТГСК от полностью совместимого родственного донора была проведена только 35 больным, включенным в данное исследование. Пациентов, лечившихся по протоколу MRC AML 10 и MRC AML 12 и подвергшихся аллоТГСК, объединили в одну группу, учитывая небольшое количество больных и одинаковую вероятность рецидива при применении обоих протоколов. Как оказалось, вероятность рецидива после проведения аллоТГСК была достоверно ниже, но этот результат нельзя интерполировать на БРВ и ОВ из-за большого числа неудач при достижении повторных ремиссий.

Следовательно, исследования MRC AML 10 и MRC AML 12 доказали необходимость включения этопозида и митоксантрона в индукционный курс лечения. Также было показано, что пять курсов химиотерапии не улучшали выживаемость больных по сравнению с проведением четырех курсов. Применение аллоТГСК от полностью совместимого родственного донора во время первой ремиссии нецелесообразно [9].

Как группа MRC, так и группа LAME (Франция) для лечения детей с ОМЛ применяла протоколы для взрослых больных ОМЛ до 1989 г. Начиная с 1989 г. был внедрен первый французский протокол для лечения детей с ОМЛ. Протоколы LAME 89 и LAME 91, состоявшие из терапии индукции ремиссии (цитарабин  $200 \text{ мг/м}^2$  в виде 24-часовой инфузии 1–7-й дни и митоксантрон  $12 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$  1–5-й дни), консолидации I (этопозид  $100 \text{ мг/м}^2/$  1–4-й дни, 24-часовой инфузии цитарабина 1–4-й дни и даунорубицина  $40 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$  1–4-й дни), консолидации II (четырёхкратная часовая инфузия цитарабина  $1 \text{ г/м}^2/\text{сут}$  каждые 12 часов 1–2-й дни, аспарагиназа  $6000 \text{ МЕ/м}^2/\text{сут}$  3–10-й дни, амсакрин  $150 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$  4–6-й дни). Поддерживающая терапия назначалась на срок 18 мес. от начала лечения и состояла из ежедневного приема 6-меркаптопурина ( $25 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ ) и ежемесячного подкожного введения цитарабина ( $25 \text{ мг/м}^2$  каждые 12 часов в течение

4 дней). Профилактика лейкозного поражения ЦНС путем 5-кратного эндолумбального введения метотрексата, цитарабина и преднизолона проводилась только детям, имевшим FAB M4 и M5 морфоцитохимические варианты ОМЛ и инициальное количество лейкоцитов более  $50 \cdot 10^9/\text{л}$ . Краниальное облучение в СОД 24 Гр осуществлялось только пациентам с инициальным вовлечением в лейкозный процесс ЦНС. АллоТГСК проводилась всем больным, у которых был полностью совместимый родственный донор, после индукции ремиссии и восстановления костного мозга. В протоколе LAME 91 была поставлена задача решения вопроса о необходимости поддерживающей терапии. В связи с этим в результате рандомизации часть пациентов не получала поддерживающую терапию, а другим больным проводилась поддерживающая терапия на протяжении 22 мес. от начала лечения.

Полная ремиссия была достигнута у 90% детей с ОМЛ при индукционной смертности 5%, БСВ, БРВ и ОВ составили соответственно 48, 53 и 60%. Результаты применения аллоТГСК отличались диаметрально от полученных в исследованиях MRC. У больных, подвергнувшихся аллоТГСК или получавших только химиотерапию, БРВ не отличалась и была соответственно 57 и 52%, ( $p = 0,18$ ). В то же время ОВ существенно различалась и составила 70,5 и 55,4%, ( $p = 0,006$ ) [11]. Следовательно, вероятность рецидива в результате применения аллоТГСК не уменьшалась, но смертность, связанная с аллоТГСК, существенно сократилась.

Не было получено достоверной разницы в БРВ у больных, получавших и не получавших поддерживающую терапию: 51 и 62% соответственно, ( $p = 0,25$ ). Однако ОВ была значительно ниже в группе детей, получавших поддерживающую терапию (59%), чем у пациентов, которым поддерживающая терапия не проводилась: 77,6% ( $p = 0,05$ ). Увеличение ОВ в группе пациентов, которым не проводилась поддерживающая терапия, обусловлено более высоким достижением

повторных ремиссий у больных при развитии рецидива заболевания [11].

Исходя из полученных результатов протоколов ALME 89 и LAME 91, в 1997 г. был предложен новый протокол LAME SP. Так, индукционная химиотерапия стала более интенсивной и состояла из двух частей, при этом вторая часть начиналась с 15–21-го дня от начала первой, несмотря на уровень лейкоцитов в крови. Первая часть индукции ремиссии состояла из 24-часовой инфузии цитарабина (200 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–4-й дни) и митоксантрона (12 мг/м<sup>2</sup>/сут 1–3-й дни), а вторая — также из длительной инфузии цитарабина (1–3-й дни) и митоксантрона (1–2-й дни) в той же дозе. Поддерживающая терапия и аллоТГСК не проводились. Полная ремиссия была достигнута у 84% пациентов, индукционная смертность составила — 3%, БСВ, БРВ и ОВ были 54,8, 61,6 и 71,9% соответственно [11].

Следовательно, исходя из полученных результатов группы LAME, можно сделать вывод об отсутствии преимущества поддерживающей терапии.

С 1979 по 1995 г. группой CCG (США) было проведено три исследования: CCG 251, CCG 213 и CCG 2891. Основной целью в протоколе CCG 251, как и в протоколах LAME 89/91, было определение значения ранней аллоТГСК путем сравнения результатов терапии больных, получавших после индукции ремиссии только химиотерапию в связи с отсутствием полностью совместимого родственного донора, и только аллоТГСК. Постиндукционная терапия у пациентов, которым аллоТГСК не проводилась, состояла из краниального облучения (СОД 18 Гр) с последующими трехнедельными курсами 6-тиогуанина (1–4-й дни), цитарабин (50 мг/м<sup>2</sup>/сут подкожно на 5-й день) и метотрексат эндолюмбально на 5-й день. В дальнейшем проводилась длительная поддерживающая терапия (до 2 лет от ее начала). Полная ремиссия была достигнута у 77% включенных в исследование больных, а индукционная смертность составила 12%. Пятилетняя БСВ, БРВ

и ОВ больных ОМЛ, не подвергнувшихся аллоТГСК, составили 29, 37 и 34% соответственно. У 22% детей (89 из 371) был полностью совместимый донор, из них 84 была проведена аллоТГСК. Восьмилетняя ОВ этой группы пациентов была 47% ( $p < 0,05$ ) [13].

Учитывая недостаточно высокую частоту достижения полных ремиссий в протоколе CCG 251, в протоколе CCG 213 была усилена терапия индукции ремиссии. Кроме того, индукционное лечение было разделено на два «рукава». Один «рукав» состоял из более высокой (по сравнению с CCG 251) дозы цитарабина (200 мг/м<sup>2</sup>/сут) и даунорубицина (45 мг/м<sup>2</sup>/сут) в режиме «7 + 3». Индукция ремиссии в другом «рукаве» состояла из пяти препаратов (DENVER): цитарабин 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–4-й дни), даунорубицин 20 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–3-й дни), эпопозид 150 мг/м<sup>2</sup>/сут (0-й и 3-й дни), 6-тиогуанин 50 мг/м<sup>2</sup> (каждые 12 часов) и дексаметазон 6 мг/м<sup>2</sup>/сут (0–4-й дни) [15]. В зависимости от ответа на первый курс лечения дети получали два-три курса «7 + 3» или DENVER. Больные, достигшие ремиссии и имевшие полностью совместимого или не полностью совместимого по одному локусу родственного донора, подвергались аллоТГСК. Остальным пациентам проводилась консолидирующая терапия, состоявшая из трех курсов: Capizzi II (цитарабин 3 г/м<sup>2</sup> каждые 12 часов 1–2-й дни и L-аспарагиназа 6000 МЕ/м<sup>2</sup> на 24-й час от начала инфузии цитарабина), с 8-го по 11-й день курс повторялся; курса химиотерапии РАТСО (винкристин, преднизолон, цитарабин, 6-тиогуанин и циклофосфан) [10] и курса DENVER. После консолидирующей терапии была вторая рандомизация: согласно одному направлению, больным прекращалось лечение, согласно другому — проводилась поддерживающая терапия РАТСО в течение 18 мес. Количество полных ремиссий не зависело от проводимой химиотерапии и составило в обоих «рукавах» рандомизации 77%. По результатам протокола CCG 213 5-летняя БСВ, БРВ и ОВ составила 29, 37 и 37% соответственно. Полностью совместимого или частично несовмести-

мого родственного донора имели 113 детей, аллоТГСК была проведена 75 больным. Более высокая БРВ и ОВ были у больных, подвергшихся аллоТГСК, чем у больных, не имевших HLA-совместимого донора и не получивших аллоТГСК: 46 и 38%, ( $p = 0,06$ ); 52 и 46% ( $p = 0,13$ ) [13].

В следующем протоколе CCG 2891 индукционная терапия была изменена по составу лекарств: цитарабин 200 мг/м<sup>2</sup>/сут в виде 24-часовой инфузии (1–5-й дни), 6-тиогуанин 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (1–5-й дни), этопозид 100 мг/м<sup>2</sup>/сут (1–5-й дни) и даунорубин 20 мг/м<sup>2</sup>/сут в виде длительной инфузии (1–5-й дни) (DCTER) [17, 18]. При этом больных разделяли на две группы: одна группа (при количестве бластов в пунктате костного мозга менее 5% на 14-й день лечения) получала лечение в стандартном режиме, т.е. второй курс индукции начинался после восстановления кроветворной функции костного мозга; другая группа получала лечение в интенсивном режиме — на 7-й день от окончания первого курса независимо от данных анализа периферической крови и количества бластов в пунктате костного мозга. Интенсивный режим индукции ремиссии применялся также пациентам с количеством бластов в пунктате костного мозга более 5% на 14-й день от начала лечения. Все больные, достигшие ремиссии и имевшие полностью совместимого или частично несовместимого родственного донора, отбирались для проведения аллоТГСК. Остальные пациенты были разделены на две группы: одной группе проводилась аутоТГСК с очисткой костного мозга 4-гидроксициклофосфамидом, а другой — интенсивная консолидирующая терапия. Консолидирующая терапия состояла из курса Capizzi II, двух курсов PATCO и одного курса DENVER. Краниальное облучение не применялось. Профилактика лейкемического поражения ЦНС осуществлялась посредством эндолюмбального введения цитарабина в начале каждого курса DCTER. Пациентам с начальным лейкемическим поражением ЦНС эндолюм-

бальное введение цитарабина производилось дважды в неделю 6 раз. Полная ремиссия была достигнута у 77% больных, при этом частота полных ремиссий у детей, получивших индукцию ремиссии в стандартном режиме, была достоверно ниже, чем у больных, включенных в группу интенсивного режима индукционной химиотерапии: 72 и 80% соответственно ( $p = 0,011$ ). Одновременно высокая 3-летняя БСВ, БРВ (результаты промежуточного исследования) были в группе больных, получивших более интенсивный режим индукционной химиотерапии: 39 и 51% соответственно. Результаты, полученные при промежуточном анализе, дали право отказаться от стандартной (не интенсивной) терапии в этом протоколе. Пятилетняя БСВ, БРВ и ОВ были соответственно 34, 44 и 47% [13]. Из 653 больных, достигших ремиссии, у 181 ребенка был определен HLA совместимый донор. АллоТГСК подверглись 138 больных. Среди пациентов, подвергшихся аллоТГСК, 6-летняя БРВ составила 67% в группе больных, получивших интенсивную терапию, а у больных, получивших стандартное лечение, — 42% ( $p = 0,005$ ).

Следовательно, основным достижением в исследованиях CCG было доказательство необходимости использования интенсивного индукционного режима химиотерапии.

Результаты лечения детей с ОМЛ по протоколам различных исследовательских групп представлены в табл. 6.2.

Таблица 6.2

## Результаты лечения детей с ОМЛ по протоколам различных исследовательских групп

Протокол	Годы	Полная ремиссия, %	Ранняя смертность, %	5-летняя БСВ, %	5-летняя ОВ, %	Эффективный элемент лечения
AML-BFM 83	1983–1987	76,4	11,5	47	52	Доказана эффективность этопозида в индукции ремиссии
AML-BFM 87	1987–1993	74,9	9,4	41	55	Краниальное облучение способствовало уменьшению числа рецидивов с поражением костного мозга
AML-BFM 93	1993–1998	82,2	7,4	50	57	Более быстрая элиминация бластов после индукции ремиссии с идарубицином по сравнению с даунорубицином. Добавление курса НАМ повысило выживаемость больных группы высокого риска
MRC AML 10	1988–1995	93	4	49	58	ТГСК способствовала уменьшению числа рецидивов, но не повысила ОВ больных
MRC AML 12	1995–2002	92	4	56	66	Доказана эффективность режима индукции ремиссии АМЕ по сравнению с АДЕ

Таблица 6.2 (продолжение)

Протокол	Годы	Полная ремиссия, %	Ранняя смертность, %	5-летняя БСВ, %	5-летняя ОВ, %	Эффективный элемент лечения
LAME 89	1988–1991	85,1	10,6	53,3	55,2	Исследование аллоТГСК (у больных, имевших полностью совместимого родственного донора) после двух курсов химиотерапии и четырех курсов химиотерапии
LAME 91	1991–1998	90,4	3,9	47,3	60,6	В рандомизированном исследовании показано отсутствие эффективности поддерживающей терапии
LAME SP	1997–1998	84	3	54,8	71,9	Исследование интенсивного режима химиотерапии индукции и эффективности аллоТГСК
CCG 251	1979–1983	77	12	29	34	Сравнительное исследование аллоТГСК (у больных, имевших полностью совместимого родственного донора) с химиотерапией и только химиотерапией
CCG 213	1985–1989	78	5	29	37	Показана эффективность послеиндукционной терапии Capizzi II и отсутствие эффективности поддерживающей терапии
CCG 2891	1989–1995	77	5	34	45	Доказана эффективность интенсивной двойной терапии индукции ремиссии

Еще одно направление в лечении ОМЛ — применение моноклональных антител анти-CD33 (Nemtuzumab и Myelotarg).

Лечение ОМЛ требует проведения экстраординарной сопроводительной терапии, включающей антибактериальную и противогрибковую, заместительную терапию препаратами компонентов крови и адекватное питание (см. гл. 9).

Из всей группы детей с рефрактерными формами и рецидивами ОМЛ ремиссии удается достичь только у 40–80%. Практически во все протоколы для лечения рецидивов и рефрактерных форм ОМЛ включен цитарабин в высокой дозе.

BFM-группа исследователей провела мониторинг 102 детей, получавших интенсивную терапию по поводу первого рецидива ОМЛ. У 51% этих больных отмечался полный ответ, у 10% — частичный; 5-летняя ОВ составила  $21 \pm 5\%$ , при этом у пациентов с длительностью первой ремиссии более 1,5 лет она была  $40 \pm 10\%$ , менее 1,5 лет —  $10 \pm 5\%$ . АллотГСК были подвергнуты 43 пациента. Общая выживаемость составила 44% у больных, достигших полной ремиссии и получивших ТГСК от полностью совместимого родственного донора; все 7 детей с миелодиспластическим синдромом или резидуальными бластами погибли, а у 5 пациентов, получивших ТГСК от неродственного полностью совместимого донора, ОВ составила 20%.

Такие же результаты были представлены Webb et al. (2001). Из 125 детей с рецидивом ОМЛ, получивших лечение согласно протоколу MRC-10, 38 (30%) не получили интенсивной терапии по поводу рецидива ОМЛ. У остальных больных, лечившихся интенсивно по поводу рецидива ОМЛ с длительностью первой ремиссии более 1 года, повторная ремиссия была достигнута в 75% случаев, а у пациентов с длительностью первой ремиссии менее 1 года — в 36%. Соответственно, и 3-летняя ОВ составила 49 и 11%.

Как видно из результатов лечения детей с ОМЛ этих двух групп, выживаемость больных с рецидивом ОМЛ очень сильно зависит от длительности первой ремиссии.

### 6.5.1. Острый промиелоцитарный лейкоз

Острый промиелоцитарный лейкоз стоит несколько особняком среди всей группы ОМЛ. Это вызвано, в первую очередь, особой хромосомной аномалией  $t(15;17)$ , в результате которой образуется патологический химерный ген *PML/RAR $\alpha$*  (см. гл. 3). Клинически ОПЛ часто проявляется выраженным геморрагическим синдромом без увеличения в размерах паренхиматозных органов, иногда у больных отмечается гиперлейкоцитоз, который усугубляет геморрагический синдром, обусловленный продукцией опухолевыми клетками гликопротеина, относящегося к группе протеолитических ферментов — ингибиторов фибринолиза. При исследовании коагулограммы у больных ОПЛ определяется гипофибриногенемия и повышенное содержание D-димера как одного из продуктов деградации фибрина, что косвенно указывает на повышенную фибринолитическую активность. Очень важно как можно быстрее установить диагноз ОПЛ и начать терапию, включающую третиноин. Острый промиелоцитарный лейкоз должен быть подтвержден не только морфологически, но и генетически. Диагностике помогает иммунофенотипирование. Так, для ОПЛ характерна экспрессия CD13, CD33, реже — CD11b, CD10 и CD7, а также отсутствие экспрессии HLA-DR-антигена (см. гл. 2).

Терапия больных ОПЛ, или M3 морфологическим вариантом, выделяется из всей группы ОМЛ. Продуктом химерного гена, образующегося в результате транслокации  $t(15;17)$ , является химерный белок Pml/Rar $\alpha$ , который обуславливает основные характеристики ОПЛ: блок дифференцировки опухолевых клеток и высокую чувствительность опухолевых кле-

ток к третиноину. Предполагается, что кодируемый им продукт инактивирует функцию  $\alpha$ -рецептора к ретиноевой кислоте, препятствуя нормальному дифференцирующему действию дериватов ретинола. Кроме третиноина, применяется еще один изомер ретиноевой кислоты — 13 цис-ретиноевая кислота. По данным исследований *in vitro*, ее изомеры в культуре клеток способствуют терминальной дифференцировке лейкозных промиелоцитов в гранулоциты и последующему их апоптозу.

Впервые для лечения ОПЛ третиноин был с успехом применен в Китае в середине 1980-х годов. Полная ремиссия при монотерапии третиноином достигалась в 90% случаев в течение 50–60 дней лечения без фазы аплазии. Следовательно, клинически была доказана эффективность третиноина для лечения ОПЛ, причем без аплазии и развития геморрагического синдрома, который развивался у 90–95% пациентов во время или после химиотерапии. Использование третиноина резко (до 10%) сократило количество смертельных исходов во время индукции ремиссии. Рандомизированное исследование, проведенное во Франции в 1991 г., ясно показало преимущество химиотерапии в сочетании с третиноином перед стандартной химиотерапией. Так, полные ремиссии достигались в 90% случаев против 80%, а БСВ составила 75% против 47%. В настоящее время практически во всех протоколах лечения ОПЛ применяется третиноин в дозе 25–45 мг/м<sup>2</sup>/сут.

Несмотря на столь разительный эффект от терапии третиноином при лечении ОПЛ у больных, успешно лечившихся производными ретиноевой кислоты в режиме монотерапии, в дальнейшем отмечалось развитие рецидива заболевания. Современная концепция лечения детей с ОПЛ предполагает сочетание использования препаратов ретиноевой кислоты и цитостатических средств. Обычно в комбинации с третиноином рекомендуется применять классические для лечения ОМЛ химиопрепараты: цитарабин

(100 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 часов с 1-го по 7-й день) и даунорубин (60 мг/м<sup>2</sup>/сут с 1-го по 3-й день). Длительность приема третиноина в период индукции ремиссии не должна быть короче 30 дней (до достижения ремиссии).

Важными компонентами лечения ОПЛ являются консолидирующий и поддерживающий курсы химиотерапии. Как было показано в ряде исследований, для сохранения длительных ремиссий препараты ретиноевой кислоты должны использоваться во время терапии консолидации ремиссии и, что особенно важно, во время поддерживающего лечения. Вообще, поддерживающая терапия при ОПЛ оказалась достаточно эффективной. В 1980-е годы в нескольких протоколах была предложена эффективная поддерживающая терапия, состоящая из 6-меркаптопурина и метотрексата; третиноин также является необходимым компонентом этого этапа лечения. По данным Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), 3-летняя БРВ была значительно выше у больных, принимавших третиноин во время поддерживающей терапии, чем у больных, в поддерживающую терапию которых третиноин не был включен (65 и 40% соответственно). Эти результаты были подтверждены в исследовании European APL 93, в котором было доказано, что невысокие дозы третиноина снижают вероятность развития рецидива заболевания, особенно у пациентов с изначально высоким уровнем лейкоцитов.

Недавно внедренная в клиническую практику липосомальная форма третиноина позволила лечить детей с ОПЛ, у которых нет возможности получать третиноин *per os* из-за малого возраста или нарушения реабсорбции в кишечнике. Максимально переносимая доза липосомальной формы третиноина составила 140 мг/м<sup>2</sup>/сут; последующие исследования показали, что достаточно 90 мг/м<sup>2</sup>/сут для достижения молекулярной ремиссии у больных с впервые выявленным ОПЛ.

Современное лечение ОПЛ у детей с применением изомеров ретиноевой кислоты позволяет отнести ОПЛ у детей к наиболее благоприятным формам ОМЛ. Хотя третиноин, как правило, переносится больными хорошо, при его приеме могут появиться следующие симптомы: лихорадка, боли в мышцах, респираторный дистресс-синдром, инфильтрация интерстиция легочной ткани, выпот в плевральную полость и полость перикарда, инфильтрация кожи, снижение артериального давления, острая почечная недостаточность. Перечисленные симптомы характеризуют синдром ретиноевой кислоты, или АТРА-синдром, который развивается на 3–4-й день от начала лечения или при длительном приеме препарата, а также может сохраняться и после отмены третиноина. Последний не развивается у больных ОПЛ, достигших полной ремиссии. Синдром ретиноевой кислоты, возможно, формируется за счет большого выброса цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6), а также в связи с повышением уровня экспрессии адгезивных молекул CD11b, CDw65, VLA-4 и CD11a и его рецептора CD54, который также может способствовать адгезии злокачественных промиелоцитов к эндотелиальным клеткам. Синдром ретиноевой кислоты встречается от 3 до 30% пациентов и намного чаще, когда третиноин назначается в режиме монотерапии без проведения химиотерапии. В действительности конкурентное назначение третиноина и химиотерапии способствует уменьшению вероятности развития синдрома ретиноевой кислоты. Тем не менее даже при монотерапии третиноином смертность существенно снижается, если симптомы данного синдрома распознаются как можно раньше и назначается адекватная терапия дексаметазоном внутривенно в дозе 20 мг/м<sup>2</sup>/сут. Существуют различные способы предупреждения развития синдрома ретиноевой кислоты: от снижения дозы до 25 мг/м<sup>2</sup>/сут до превентивного назначения дексаметазона. Некоторые исследователи рекомендуют назначать дексаметазон в дозе 40 мг/м<sup>2</sup>/сут при разви-

тии необъяснимого нарушения дыхания, лихорадки или при увеличении массы тела. Тем не менее вероятность смерти вследствие развития синдрома ретиноевой кислоты составляет 1%. Смерть пациента при отсутствии адекватного лечения может наступить очень быстро после появления первых проявлений синдрома ретиноевой кислоты.

Несмотря на высокий уровень достижения ремиссии с применением третиноина и химиотерапии, у некоторых пациентов развивается рецидив ОПЛ. При ОПЛ очень важно проводить мониторинг транскрипта *PML/RAR $\alpha$*  с помощью ПЦР. Во время гематологической ремиссии при возникновении положительной реакции после длительно сохранявшейся отрицательной реакции вероятность развития морфологического рецидива становится очень высокой, а данное состояние называют молекулярным рецидивом. На основании этих результатов достижение молекулярной ремиссии в результате индукционной и консолидирующей терапии крайне важно. При возникновении молекулярного рецидива ОПЛ необходимо возобновить интенсивную терапию с включением третиноина, препаратов триоксида мышьяка ( $As_2O_3$ ), не дожидаясь развития морфологического рецидива. Назначение лечения при молекулярном рецидиве увеличивает вероятность излечения детей с ОПЛ и минимизирует риск тяжелых геморрагических осложнений и синдрома ретиноевой кислоты.

### 6.5.2. Поздние осложнения лечения

Много публикаций посвящено поздним осложнениям лечения детей с ОМЛ. Большинство этих осложнений связано с применением антрациклинов во время химиотерапии, режимом кондиционирования перед ТГСК, выраженностью реакции «трансплантат против хозяина» после аллоТГСК, риском развития бесплодия, нейрофизиологическими дисфункциями, развитием вторых злокачественных

опухолей. При тотальном облучении тела у детей отмечается нарушение роста и развивается половая стерильность. Применение бусульфана и циклофосфана также приводит к задержке полового созревания, к половой стерильности, недостаточности щитовидной железы. По данным J. Sanders et al. (1997), из 618 девочек после аллоТГСК у 25% восстановилась функция яичников и у 5,3% — в дальнейшем была беременность. Из 708 мальчиков функция яичек восстановилась у 15%, но только у 4,5% в дальнейшем родились дети. У женщин репродуктивного возраста, перенесших в детстве тотальное облучение тела, риск спонтанного прерывания беременности был очень высок. Одинаково высокий риск рождения детей с гипотрофией отмечался у женщин, получавших бусульфан и циклофосфан как в комбинации с тотальным облучением тела, так и без него. И наконец, все режимы циторедукции в дальнейшем ассоциировались с повышенным риском повторных опухолевых заболеваний, особенно после тотального облучения тела.

Следовательно, большинство детей с ОМЛ могут быть излечены. Современное лечение обязательно должно быть риск-адаптивным, а для выявления степени риска больного ОМЛ обязательно морфологическое, иммунологическое и генетическое исследование опухолевых клеток костного мозга. Интенсивность лечения детей с ОМЛ в первую очередь зависит от вероятности достижения полной ремиссии и от риска рецидива ОМЛ. Кроме того, у больных с t(15;17) третиноин должна быть обязательно включен в режим химиотерапии. Очень важное направление в развитии лечения ОМЛ у детей — снижение токсичности химиотерапии и смертности во время лечения.

Мониторирование минимальной остаточной болезни необходимо для диагностики молекулярного рецидива ОМЛ.

### Основная литература

1. *Baehner R.J., Bernstein F.I.D., Sather H. et al.* Improved remission induction rate D-ZAPO but unimproved remission duration with addition of immuthery to chemotherapy in previously untreated children with ANLL // *Med. Pediatr. Oncol.* — 1979. — Vol. 7. — P. 127–139.
2. *Berman E., McBride M.* Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug-resistant leukemia cells // *Blood.* — 1992. — Vol. 79. — P. 3267–3273.
3. *Buchner T., Urbanitz D., Hiddemann W. et al.* Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of German AML Cooperative Group // *J. Clin. Oncol.* — 1985. — Vol. 3. — P. 1583–1589.
4. *Chard Jr. R.I., Frankleshtein J.Z., Sonley M.J. et al.* Increased survival in childhood nonlymphocytic leukemia after treatment with prednisone cytosine arabinoside, 6-thioguanine, cyclophosphamide, and oncovin (PATCO) combination chemotherapy // *Med. Pediatr. Oncol.* — 1978. — Vol. 4 — P. 263–273.
5. *Choi S.I., Simone J.V.* Acute nonlymphocytic leukemia in 171 children // *Med. Pediatr. Oncol.* — 1976. — Vol. 2. — P. 119–176.
6. *Creutzig U., Ritter J., Schelong G.* Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in the study AML-BFM-83 as a compared with study AML-BFM-78 // *Blood.* — 1990. — Vol. 75. — P. 1932–1940.
7. *Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M. et al, for the BFM study group.* Idarubicine improves blast cell clearance during induction therapy in children with AML: results of study AML-BFM 93 // *Leukemia.* — 2001. — Vol. 15. — P. 348–354.
8. *Creutzig U., Zimmermann M., Ritter J. et al.* Treatment strategies and long-term in pediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trails // *Leukemia.* — 2005. — Vol. 19. — P. 2039–2042.
9. *Gibson B.E.S., Wheatley K., Hann I.M. et al.* Treatment strategy and long-term results in pediatric patients treated in consecutive UK AML trails // *Leukemia.* — 2005. — Vol. 19. — P. 2130–2138.

10. *Krischer J.P., Steuberg C.P., Vietti T.J.* Long-term results in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a Pediatric Oncology Group study // *Med. Pediatr. Oncol.* — 1989. — Vol. 17. — P. 1401.
11. *Perel Y., Auvrignon A., Leblanc T. et al.* Treatment of childhood acute myeloblastic leukemia: dose intensification improves outcome and maintenance therapy is of no benefit — multicenter studies of the French LAME (Leucemie Aiguë Myeloblastique Enfant) Cooperative Group // *Leukemia.* — 2005. — Vol. 19. — P. 2082–2089.
12. *Riehm H., Gadner H., Welte K.* Die West-Berliner Studie zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindes — Erfahrungsbericht nach 6 Jahren // *Klin. Pediatr.* — 1977. — Vol. 189. — P. 89–102.
13. *Smith O., Alonzo T.A., Gerbing R.B. et al.* Long-term results of children with acute myeloid leukemia: report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 2891 // *Leukemia.* — 2005. — Vol. 19. — P. 2054–2062.
14. *Van Der Does-Van Den Berg A., Van Wering E.R., Van Zanen C.E.* Acute niet-lymfatische leukemieën bij kinderen in Nederland (1972–1977) // *Tijdschr. Kindergeheelkd.* — 1978. — Vol. 46. — P. 146–153.
15. *Wells R.J., Woods W.G., Buckley J.D. et al.* Treatment of newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: a Children's cancer Group study // *J. Clin. Oncol.* — 1994. — Vol. 12. — P. 2367–2377.
16. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues / Edited by Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. — Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. — P. 109–147.
17. *Woods W.G., Kabrinsky N.* Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: A report from the Children's Cancer Group // *Blood.* — 1996. — Vol. 87. — P. 4979.
18. *Woods W.G., Neudorf S., Gold S. et al.* A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation and aggressive chemotherapy in children with AML in remission: A report from Children's Cancer Group // *Blood.* — 2001. — Vol. 97. — P. 56–62.

## Глава 7

## Хронический миелолейкоз

С.А. Маякова

**Х**ронический миелолейкоз в детском возрасте встречается крайне редко, составляя 2–5% случаев лейкозов у детей, в связи с чем данное заболевание относится к менее изученным разделам детской онкогематологии. Ориентировочно можно предсказать один случай ХМЛ на 1 млн детского населения в год. Среднегодовая заболеваемость на 100 000 детского населения составляет 0,12, в то время как у взрослых этот показатель равен 1,2.

С помощью цитогенетических методов Р.С. Nowell и Д.А. Hungerford в 1960 г. впервые выявили специфический хромосомный маркер для ХМЛ — делецию приблизительно половины длинного плеча 22-й пары, который транслоцирован на длинное плечо хромосомы 9 — t(9;22). Измененная хромосома была названа филадельфийской (Ph) в честь города в США, где она была впервые найдена. Ph-хромосома в кариотипе клеток крови и костного мозга обнаруживается

у 85–95% взрослых больных. В 70-х годах прошлого века установлено, что речь идет о транслокации t(9;22) (q34; q11). Помимо Ph-хромосомы, могут наблюдаться и другие хромосомные аномалии. По современным представлениям, ХМЛ возникает в результате соматической мутации в стволовой гемопоэтической клетке, приводящей к образованию хромосомного маркера — Ph-хромосомы. Транслокация t(9;22) наблюдается в миелоидных клетках, эозинофилах, базофилах, эритроблестах, моноцитах, В- и Т-лимфоцитах, мегакариоцитах. Это является свидетельством того, что кроветворение носит клоновый характер. На молекулярном уровне результатом t(9;22) является слияние части проонкогена *ABL*, расположенного на хромосоме 9 (9q34), и участка гена *BCR* (хромосома 22, q11) с формированием химерного гена *BCR-ABL* на перестроенной хромосоме 22. Химерный ген *BCR-ABL* продуцирует белок p-210, обладающий тирозинкиназной активностью, которая и обуславливает характерный для миелолейкоза нарастающий лейкоцитоз. В некоторых случаях при отсутствии у больных Ph-хромосомы заболевание относится к *BCR-ABL*-позитивному ХМЛ.

Биологический эффект химерного гена *BCR-ABL* сводится к следующим нарушениям в жизнедеятельности клетки: 1) увеличению митогенной активности в связи с усилением передачи митотического сигнала путем активации рецепторов гемопоэтических факторов роста; 2) нарушению адгезии клеток в строме; 3) ингибированию апоптоза; 4) возникновению нестабильности генома клетки в связи со снижением функции гена *ABL* [1].

Причина возникновения ХМЛ до конца не выяснена, хотя заболевание относится к числу наиболее изученных в патогенетическом отношении опухолей человека. Не удалось выявить конкордантности в заболеваемости однояйцовых близнецов или других признаков наследования ХМЛ. Однако известны отдельные сообщения о случаях семейного заболева-

ния. Ряд данных позволяет считать, что важное значение могут иметь ионизирующая радиация и некоторые химические агенты (бензол). Имеются сведения об увеличении заболеваемости по сравнению с популяционной частотой ХМЛ у переживших атомную катастрофу в Хиросиме и Нагасаки, а также среди больных, страдавших спондилоартритом и получивших по этому поводу рентгенотерапию.

У детей цитогенетические исследования подтверждают наличие двух вариантов заболевания — с Ph-хромосомой в кариотипе и без нее. Выявление Ph-хромосомы определяет «взрослый», или Ph-позитивный вариант заболевания у детей, в остальных случаях это ювенильный, или Ph-негативный вариант ХМЛ, имеющий совершенно иную клинико-гематологическую характеристику. Последний вариант встречается редко.

## 7.1. Клиника

Течение ХМЛ у взрослых и детей носит прогрессирующий характер, и в динамике принято выделять три стадии в зависимости от степени зрелости клеточного состава опухоли: хроническую; продвинутую, или стадию акселерации; острую, или терминальную.

### Стадии хронического миелолейкоза\*

#### Хроническая стадия

Отсутствие выраженных симптомов

Нет признаков стадии акселерации и острой стадии

#### Стадия акселерации

Трудно контролируемый лейкоцитоз

(> 50 · 10<sup>9</sup>/л)

Быстрое удвоение числа лейкоцитов (< 5 дней)

≥ 10% бластов в периферической крови и костном мозге

\* Критерии, установленные Международным регистром трансплантации костного мозга.

≥ 20% бластов + промиелоцитов в периферической крови и костном мозге

≥ 20% базофилов + эозинофилов в периферической крови

Анемия и тромбоцитопения, не корригируемая стандартным лечением

Персистирующий тромбоцитоз ( $> 1000 \cdot 10^9/\text{л}$ )

Клональные цитогенетические изменения при наличии Ph-хромосомы

Нарастание спленомегалии

Развитие хлоромы

Развитие фиброза костного мозга

#### **Острая (бластная) стадия**

≥ 30% бластов + промиелоцитов в периферической крови и костном мозге

Клинико-гематологические проявления хронической стадии «взрослого» варианта ХМЛ у детей мало отличаются от таковых у взрослых. Заболевание встречается в любом возрасте и имеет определенную характеристику в зависимости от стадии болезни [12].

Начало заболевания установить трудно. Клиническая симптоматика вначале не отличается яркостью — такие симптомы, как слабость, потливость, носят преходящий характер. И лишь случайное исследование периферической крови (при оформлении в детский сад, школу, при травме, при обследовании по поводу других заболеваний) дает возможность установить диагноз. Старшие дети иногда сами замечают увеличение размеров живота, изменения со стороны костей и суставов (оссалгии). Увеличение лимфатических узлов для этой формы не характерно.

Наиболее частые проявления ХМЛ — спленомегалия и гиперлейкоцитоз. В связи с постепенно нарастающей интоксикацией дети старшего возраста начинают отмечать общую слабость, утомляемость, повышение температуры тела, похудание. Могут развиваться потеря аппетита, боли в животе и в костях. Пальпируется плотная селезенка — от 2 до 10–12 см

ниже края реберной дуги, печень увеличена меньше и определяется на 2–5 см из-под реберного края.

Для периферической крови характерен гиперлейкоцитоз (небольшой в начале заболевания — до  $10,0 \div 15,0 \cdot 10^9/\text{л}$ , и по мере развития ХМЛ достигающий больших цифр — до  $200,0 \div 400,0 \cdot 10^9/\text{л}$  и более) с увеличением содержания гранулоцитов до 85–95% и преобладанием незрелых клеток гранулоцитарного ряда: промиелоцитов и миелоцитов, метамиелоцитов, единичных миелобластов, а также базофилов (до 5–10%) и эозинофилов (до 5–8%) («эозинофильно-базофильная ассоциация»), ускорена СОЭ.

Почти у всех больных детей отмечается умеренная нормохромная анемия, которая наиболее выражена при очень высоком лейкоцитозе. Уровень тромбоцитов у большинства не понижен, у некоторых выявляется гипертромбоцитоз — до  $400,0 \div 600,0 \cdot 10^9/\text{л}$  и более.

В пунктате костного мозга имеется выраженное увеличение числа миелокариоцитов за счет пролиферирующего пула клеток гранулоцитарного ряда с увеличением базофилов и эозинофилов. Как правило, возрастает количество фигур митоза. Число мегакариоцитов обычно увеличено, и они имеют признаки дисплазии. На более поздних стадиях наблюдается угнетение эритронормобластического и мегакариоцитарного ростков кроветворения.

Несмотря на то, что при морфологическом исследовании не отмечается каких-либо изменений в строении клеток гранулоцитарного ряда при ХМЛ по сравнению с нормальными, электронномикроскопически наблюдается асинхронизм в созревании ядра и цитоплазмы. При трепанобиопсии выявляется выраженная гиперплазия миелоидного ростка и резкое уменьшение содержания жира.

Немаловажное значение в комплексной диагностике ХМЛ имеет определение активности ЩФ нейтрофилов, которая резко снижена или равна нулю в хронической стадии заболевания, что является важным диагностическим признаком атипичных и слож-

ных случаев ХМЛ, а также на ранних этапах его развития.

При сопутствующих заболеваниях и в результате успешного лечения уровень активности фермента обычно нормализуется или даже повышается, что, по мнению некоторых авторов, является хорошим прогностическим признаком. Во время бластного криза отмечается резкое увеличение активности ЩФ нейтрофилов.

Из биохимических изменений выявляется увеличение содержания витамина  $B_{12}$ , мочевой кислоты и ЛДГ в сыворотке крови.

Переход в острую, или терминальную, стадию с увеличением содержания бластных клеток обычно происходит в процессе развития болезни, однако часто ХМЛ у детей диагностируется уже в тот момент, когда в периферической крови и/или костномозговом пунктате имеется увеличение содержания бластных клеток. Обычно принято считать пограничным для определения бластного криза увеличение содержания бластных клеток в периферической крови и/или в костномозговом пунктате более 20%.

Если период до появления бластных клеток в периферической крови и/или костном мозге может продолжаться длительно, то наступление бластного криза резко ухудшает прогноз заболевания.

В продвинутую стадию, или стадию акселерации, между хронической и острой стадиями в анализах периферической крови наблюдается нарастание количества незрелых гранулоцитов (чаще промиелоцитов), базофилов, рост лейкоцитоза, несмотря на увеличение дозы химиопрепаратов. Отмечается снижение уровня эритроцитов и гемоглобина, а также тромбоцитопения.

Клинико-гематологическая картина острой стадии (бластного криза) зависит от цитологического типа бластных клеток и не отличается от острого лейкоза.

Процесс характеризуется трансформацией (метаморфозом), в результате чего приобретаются вто-

ричные мутации, в большинстве случаев характеризующиеся дополнительными цитогенетическими изменениями (типичные, дупликация Ph-хромосомы, трисомия 8 и изохромосома 17). Это ведет к нарушению процессов дифференцировки бластных клеток. Иммунофенотипические данные могут указывать на миелоидную (наиболее часто), лимфоидную, смешанную или недифференцированную природу. Очень редко встречается эритробластная, мегакариобластная и Т-лимфобластная трансформация. Бластная, или острая, стадия может развиваться внезапно или после стадии акселерации, имеющей различную продолжительность.

В настоящее время принято типирование опухолевых клеток при острой стадии ХМЛ по принципам, аналогичным острому лейкозу, т.е. с использованием морфологического, цитохимического, иммунологического и цитогенетического методов исследования.

Согласно последней классификации опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани ВОЗ (2008) в группе миелодиспластических/миелопролиферативных заболеваний выделены хронический миеломиелоцитарный лейкоз (ХММЛ), атипичный хронический миелолейкоз (аХМЛ) и ювенильный миеломиелоцитарный лейкоз (ЮММЛ) [14].

**Диагностические критерии хронического миеломиелоцитарного лейкоза** включают:

- Персистирующий моноцитоз в периферической крови  $> 1 \cdot 10^9/\text{л}$
- Отсутствие Ph-хромосомы или продукта гена *BCR-ABL1*
- Отсутствие реаранжировки *PDGFRA* или *PDGFRB*
- Менее 20% бластов (в том числе миелобласты, монобласты и промиелоциты) в периферической крови и костном мозге
- Дисплазия в одной или более линиях миелоидного ростка. Если миелодисплазия отсутству-

ет или минимальна, диагноз ХММЛ все же возможен, если присутствует:

1. Приобретенные клональные цитогенетические аномалии в клетках костного мозга
2. В течение минимум 3 мес. персистирует моноцитоз, другие причины которого исключены

#### Атипичный хронический миелолейкоз, BCR-ABL1 негативный (аХМЛ)

Заболевание характеризуется:

- Лейкоцитоз в периферической крови  $13 \cdot 10^9/\text{л}$  за счет увеличения количества нейтрофилов и их предшественников на фоне дисгранулопоэза.
- Отсутствие Ph-хромосомы или продукта гена *BCR-ABL1*
- Отсутствие реаранжировки *PDGFRA* или *PDGFRB*
- Предшественники нейтрофилов (промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты)  $\geq 10\%$  от числа лейкоцитов
- Минимальная абсолютная базофилия (базофилы  $< 2\%$  от числа лейкоцитов)
- Нет или минимальный абсолютный моноцитоз (моноциты  $< 10\%$  от числа лейкоцитов)
- Гипоклеточный костный мозг с пролиферацией гранулоцитов и явлениями гранулоцитарной дисплазии с/без дисплазией эритроидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения
- Менее 20% бластов в периферической крови и костном мозге

Для ювенильного миеломоноцитарного лейкоза характерно:

- Моноцитоз в периферической крови  $> 1 \cdot 10^9/\text{л}$
- Бласты (в том числе промоноциты)  $< 20\%$  лейкоцитов в периферической крови и ядродержащих элементов костного мозга

- Отсутствие Ph-хромосомы или продукта гена *BCR-ABL1*
- Наличие двух или более представленных ниже признаков:
  1. Повышенный фетальный гемоглобин
  2. Незрелые формы гранулоцитов в периферической крови
  3. Число лейкоцитов  $> 10 \cdot 10^9/\text{л}$
  4. Клональные хромосомные перестройки (моносомия 7)
  5. Гиперчувствительность миелоидных предшественников к ГМ-КСФ *in vitro*

Все эти заболевания (ХММЛ, аХМЛ и ЮММЛ) характеризуются полной неэффективностью терапии и короткой продолжительностью жизни больных. Единственный метод лечения, дающий возможность увеличить выживаемость пациентов — это аллоТГСК/ПСК.

У детей раннего возраста чаще встречается Ph-негативный вариант. Однако описаны единичные случаи ХМЛ с наличием в кариотипе Ph-хромосомы. К клинико-гематологическим особенностям можно отнести более выраженную лимфаденопатию, специфическую инфильтрацию кожи, анемию и тромбоцитопению, наблюдаемые уже в начале заболевания, моноцитоз в периферической крови.

Клинико-гематологические данные Ph-позитивного варианта у детей раннего возраста схожи с ХМЛ в старшей возрастной группе, однако иногда отмечается более выраженное увеличение селезенки и гиперлейкоцитоз.

При ХМЛ в группу врожденных форм заболевания относят детей, заболевших в возрасте до 1 года. У них заболевание часто сочетается с врожденными аномалиями развития. В этой возрастной группе ХМЛ трудно дифференцировать по клиническим и гематологическим данным от реактивных изменений, связанных с соматическими процессами, пневмониями и т.д. В этих случаях необходимо комплекс-

ное клинико-цитологическое и цитогенетическое обследование для исключения диагноза ХМЛ.

При врожденных формах заболевания обращает на себя внимание быстрая генерализация с вовлечением в процесс не только лимфатических узлов, селезенки, печени и костного мозга, но и кожи, мягких тканей, костной системы. Продолжительность жизни этих детей крайне мала.

## 7.2. Прогноз

В последние годы разрабатываются прогностические факторы в течении ХМЛ. Наиболее важными для прогноза заболевания являются данные цитогенетического исследования.

Прогностические факторы у взрослых больных наиболее разработаны J. Sokal et al. [13] и включают возраст, количество бластных клеток, размеры селезенки и количество тромбоцитов. Больные были разделены на три группы — низкого, промежуточного и высокого риска, что позволяло прогнозировать продолжительность жизни у больных, получавших бусульфан. Оказалось, что критерии J. Sokal менее приемлемы для прогноза при лечении препаратами интерферона. Новая система прогнозирования и стадирования была предложена Н. Kantarjian et al. (1998) [11], но и она не нашла широкого распространения. У детей наиболее неблагоприятным для исхода является возраст до 2 лет (особенно до 1 года) в начале заболевания.

Влияет на прогноз болезни количество бластных клеток и базофилов. Существует мнение, что увеличение количества базофилов более 20% является достоверным предвестником бластного криза. Эти данные дали основание некоторым авторам провести параллель между бластными клетками и базофилами в плане прогностической значимости.

В настоящее время наиболее достоверным прогностическим фактором у больных ХМЛ считается

ответ на первоначальное лечение. В случае получения гематологического ответа больные живут дольше, и наибольшая выживаемость при ХМЛ наблюдается при наступлении цитогенетической ремиссии.

## 7.3. Лечение

Задачей лечения ХМЛ является максимально возможное увеличение продолжительности жизни больных, которая, как правило, прямо коррелирует с длительностью хронической стадии заболевания, поскольку продолжительность стадии акселерации и терминальной стадии болезни, за редким исключением, исчисляется месяцами.

Прогресс в терапии ХМЛ был медленным в течение последних лет. Сведения, касающиеся сравнительных результатов лечения больных ХМЛ, в основном относятся к взрослому контингенту.

В 1953 г. для лечения ХМЛ был предложен препаратом для терапии данного заболевания в течение 40 лет. Цитостатическое действие бусульфана осуществляется путем воздействия на ДНК клетки и, возможно, на другие клеточные структуры.

Развитие плохо контролируемой аплазии костного мозга, миелофиброза, фиброза легочной ткани и гипокортицизма при длительном применении бусульфана значительно ухудшают течение болезни и результаты ТГСК, если таковая предпринимается после этого лечения.

**Гидроксимочевина** стала применяться для лечения ХМЛ с 60-х годов прошлого века и к середине 80-х годов стало очевидно, что она не имеет вышеперечисленных побочных явлений, вызываемых бусульфаном. Терапия гидроксимочевиной улучшала выживаемость больных, а также не ухудшала результатов ТГСК, если она осуществлялась после курса лечения данным препаратом. Кроме того, при терапии гидроксимочевиной отмечалось достижение малого цитоген-

нетического ответа, который, однако, был транзиторным.

Гидроксимочевина по химическому составу принадлежит к гидроксиламинам, является производным мочевины. Препарат тормозит синтез ДНК за счет угнетения синтеза фермента рибонуклеозиддифосфатредуктазы. Этот фермент катализирует превращение рибонуклеотида в дезоксирибонуклеотид и поражает клетки только в S-фазе. Препарат обеспечивает быстрое, но кратковременное снижение количества лейкоцитов. Рекомендуемая начальная доза — 10–20 мг/кг/сут, которая должна регулироваться в зависимости от гематологических данных. Препарат назначается с целью снижения лейкоцитоза (и тромбоцитоза) и нормализации клинической симптоматики.

В начале лечения, особенно у больных с высоким лейкоцитозом, когда назначаются сравнительно большие дозы препарата, так же как и при лечении бусульфаном, необходимо применение аллопуринола.

К сожалению, ни бусульфан, ни гидроксимочевина не приводят к длительному и выраженному подавлению содержащих Rh-хромосом клеток и значительному увеличению продолжительности жизни больных ХМЛ, не говоря уже о выздоровлении.

С начала 80-х годов прошлого века в терапии ХМЛ активно стали применять препараты  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ), такие как Интрон А, Роферон-А, Реаферон и др. Было показано, что IFN- $\alpha$  является уникальным препаратом, позволяющим получить не только гематологическую ремиссию, но и вызвать уменьшение количества Rh-положительных клеток. При применении адекватных доз IFN- $\alpha$  у некоторых больных не определяются Rh-положительные клетки не только цитогенетическими методами, но и с помощью ПЦР [4,10].

Механизм противоопухолевого действия IFN- $\alpha$  при ХМЛ выяснен не до конца. Придается значение восстановлению с помощью препарата интегринзависимой адгезии клеток и восстановлению

сигнала, обеспечивающего ингибирование пролиферации клеток, связанной с адгезией. Предполагают, что положительный эффект при ХМЛ связан не с элиминацией Rh-положительных клеток, а с восстановлением нормальных взаимоотношений между клетками-предшественниками и микроокружением, что приводит к подавлению пролиферирующего Rh-положительного клона клеток.

Есть данные о наличии опосредованного через иммунную систему действия IFN- $\alpha$ . Последний повышает цитотоксичность NK-клеток, спонтанную T-клеточную цитотоксичность, стимулирует макрофаги и регулирует выработку антител B-клетками.

Первое сообщение о результатах применения IFN- $\alpha$  было сделано М. Talpaz et al. (1986). У 71% больных была достигнута полная гематологическая ремиссия и у 39% — цитогенетический ответ.

Дальнейшие исследования с использованием рекомбинантного IFN- $\alpha$  в виде монотерапии и в комбинации с другими препаратами (гидроксимочевина, цитарабин) подтвердили его эффективность.

В связи с тем, что при монотерапии IFN- $\alpha$  гематологическая ремиссия, цитогенетический ответ развиваются достаточно медленно и полные цитогенетические ремиссии (0% Rh-положительных клеток в костном мозге) возможны только у 10–20% больных, были использованы различные терапевтические подходы. Так, комбинация IFN- $\alpha$  с гидроксимочевинной позволяет достичь более быстрой нормализации гематологических показателей. Принципиальная возможность улучшения терапии ХМЛ появилась с внедрением в клиническую практику комбинированной терапии IFN- $\alpha$  и малыми дозами цитарабина, так как последний сам обладает способностью супрессировать пролиферацию Rh-положительных клеток, а интерферон потенцирует его действие.

Был выявлен большой лечебный эффект при применении цитарабина в небольших дозах, но не-

прерывно, по сравнению с прерывистым введением препарата (7–10 дней каждого месяца).

Изучается пероральная форма цитарабина (YNC01, SPAC). Было показано, что препарат эффективен и хорошо переносится больными при комбинированном лечении с IFN- $\alpha$ .

Критериями эффективности терапии ХМЛ являются гематологическая и цитогенетическая ремиссии. Гематологическая ремиссия оценивается по количеству лейкоцитов и спленомегалии, а цитогенетическая — по проценту Ph-позитивных клеток в костномозговом пунктате (0% — полная, 35% — частичная, 35–95% — малая, 100% — отсутствует).

Подтверждением патогенетической обоснованности использования IFN- $\alpha$  при ХМЛ являются случаи, при которых достигалась полная элиминация опухолевого клона. Процент полных гематологических ремиссий и большого цитогенетического ответа (сумма полных и частичных цитогенетических ремиссий) был наиболее высоким у больных, которым лечение IFN- $\alpha$  было начато в ранней хронической стадии (менее 12 мес. с момента постановки диагноза).

При применении IFN- $\alpha$  в большинстве случаев отмечаются побочные реакции (гриппоподобный синдром с повышением температуры тела, тошнота, рвота и др.), требующие назначения жаропонижающих средств. При каждой следующей инъекции побочные симптомы проявляются все более слабо и, как правило, постепенно стихают на протяжении первых 1–2 нед. лечения. Наряду со снижением числа лейкоцитов может наблюдаться тромбоцитопения. К поздним побочным явлениям можно отнести снижение массы тела, редко — выпадение волос, депрессии и др. В некоторых случаях наблюдается образование антител к интерферону, делая его неэффективным.

При переходе заболевания в стадию акселерации, наряду с гидроксимочевинной и IFN- $\alpha$  может назначаться 6-меркаптопурин и метотрексат, вплоть до проведения курсов более интенсивной терапии: цита-

рабин в сочетании с антрациклиновыми антибиотиками (схема «3 + 7») с интервалом в 1,5–2 мес.

Лечение больных ХМЛ в острой стадии — сложная задача. Как правило, применение программ лечения острого лейкоза, соответствующих морфологическому варианту бластного криза, не дает желаемого терапевтического эффекта.

В настоящее время доказано, что так же, как и для взрослых, пока единственным методом полного излечения ХМЛ у детей, позволяющим эрадикаровать клон быстро и полно, является аллоТГСК, которая должна быть проведена в течение 6 мес. после установления диагноза, если идентифицирован совместимый сиблинг, т.е. родной брат или сестра, и в течение года при наличии совместимого неродственного донора.

Особенностью терапевтической тактики при ХМЛ в детском возрасте является проведение ТГСК (родственной и неродственной) всем больным, если к этому нет особых противопоказаний. Детям с массой тела до 40 кг возможна ТГСК пуповинной крови.

Работы, проведенные в Сизтле (США) [8], показали, что вероятность 5–9-летней выживаемости больных в ранней хронической стадии ХМЛ, кому была проведена аллоТГСК, равняется приблизительно 60%. Аналогичные сведения представляет и U. Creutzig et al. (1996) [9]. Однако возможности применения миелотрансплантации ограничены в связи с отсутствием родственного донора у 70% больных и с необходимостью длительного поиска HLA-совместимого донора. Результаты ТГСК при ХМЛ существенно зависят от стадии заболевания. Длительная выживаемость без признаков болезни достигается у 50–80% больных, которым ТГСК проведена в хронической стадии болезни, у 35–40% — в стадии акселерации и лишь у 10–20% — в острой стадии.

В настоящее время изучается возможность эффективного применения ТГСК от неродственных до-

норов (включая стволовые клетки пуповинной крови) (см. гл. 8).

До сих пор четко не определено значение спленэктомии в комплексном лечении ХМЛ. Имеется мнение, что ее роль сводится к устранению абдоминального дискомфорта, что облегчает течение заболевания, не отражаясь на его продолжительности. В отдельных случаях удаление селезенки способствует снятию явлений гиперспленизма и еще реже — купированию аутоиммунных нарушений. В то же время, допустима и вероятность дополнительной клональной селекции более злокачественных клеток в этом органе.

В современном лечении ХМЛ может использоваться лейкаферез, способный при проведении 1–6 процедур уменьшить содержание патологических клеток в 20 раз. Показанием к назначению лейкафереза является наличие гиперлейкоцитоза и/или выраженной интоксикации. Лейкаферез и спленэктомия обычно сочетаются с полихимиотерапией.

В начале XXI века в практику стали внедряться препараты нового поколения — ингибиторы тирозинкиназы, которые специфически блокируют активность онкобелка Bcr-Abl, вызывающего трансформацию нормальных стволовых клеток в лейкемические. Первым препаратом из этой группы, доступным для клинического применения, стал **иматиниба мезилат** (Гливек).

Иматиниба мезилат назначается в дозе 400 мг/сут. Эта доза сегодня считается стандартной для начала терапии, хотя уже проводятся клинические испытания, в которых лечение начинается с больших доз (800 мг/сут и выше).

При сравнении особенно большой была разница в получении полного цитогенетического ответа: 76,2% в группе получавших иматиниба мезилат и 14,5% среди леченных IFN- $\alpha$  и цитарабином. Общая расчетная выживаемость у получавших иматиниба мезилат составила 89,4%, расчетная выживаемость без прогрес-

сии — 84%. Общая частота прогрессирования болезни была наибольшей на втором году терапии (7,6%), в то время как частота перехода в поздние стадии болезни была сравнительно постоянна и составила около 2% в год.

Токсичность иматиниба мезилата сравнительно низкая. Чаще всего встречались желудочно-кишечные расстройства, сыпь, отеки, миалгии и артралгии. Обычно они были мало выраженными и редко служили причиной отмены препарата. Сравнительно часто встречалась гематологическая токсичность 3–4-й степени, требовавшая снижения дозы или даже отмены иматиниба мезилата [5].

В соответствии с рекомендациями European Leukemia Net (2006) контрольные стандартные цитогенетические исследования или FISH-анализ (в случае отсутствия митозов клеток костного мозга) при лечении ХМЛ иматиниба мезилатом проводятся 1 раз в 6 мес. до достижения полного цитогенетического ответа, а затем 1 раз в год.

Мониторинг терапии ХМЛ для выявления минимальной остаточной болезни осуществляется с помощью молекулярно-генетических технологий (методом количественной ПЦР в реальном времени), определяющих уровень экспрессии BCR-ABL-транскрипта до начала терапии и затем каждые 3 мес. в процессе лечения иматиниба мезилатом в дозе 400 мг/сут. Больные рассматриваются как резистентные при отсутствии гематологического ответа после 3 мес., цитогенетического ответа — после 6 мес., частичного цитогенетического ответа — после 12 мес., полного цитогенетического ответа — после 18 мес. терапии, потеря уже достигнутого гематологического, цитогенетического или молекулярного ответа, прогрессирование заболевания с переходом в стадию акселерации и бластного криза (острую стадию) [3,7].

Учитывая наличие резистентности к иматиниба мезилату у ряда больных, в практику лечения ХМЛ внедряются новые препараты — ингибиторы тирозин-

киназы II поколения, к которым относятся нилотиниб, и дазатиниб, изучаются новые лекарственные препараты уже III поколения [2].

**Нилотиниб** (Tasigna) — фениламинопиримидиновое производное иматиниба мезилата, примерно в 20–30 раз более активное против Bcr-Abl. Переносимость нилотиниба в дозе 1200 мг/сут (600 мг 2 раза в сутки) хорошая. Наиболее частыми побочными эффектами являются гематологические, поражение желудочно-кишечного тракта и кожи.

**Дазатиниб** (Sprycel) — ингибитор BCR-ABL-киназы, семейства SRC-киназ (с дополнительным действием на иные киназы), который в 100–300 раз активнее в отношении Bcr-Abl по сравнению с иматиниба мезилатом. Частота полного цитогенетического ответа у больных ХМЛ в хронической стадии составила 44% на поздних стадиях ХМЛ. Частота большого цитогенетического ответа колебалась в пределах от 46 до 66%. Препарат хорошо переносится больными, лишь у некоторых пациентов отмечаются осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта и цитопения.

Для преодоления резистентности одним из подходов является создание вакцин, вызывающих иммунный ответ против специфических антигенов лейкозных клеток при ХМЛ. По данным первых опытов применения пептидов из места слияния Bcr-Abl, возможно, пептидные вакцины могут сыграть роль в лечении минимальной остаточной болезни при ХМЛ.

#### Основная литература

1. Волкова М.А. Хронический миелолейкоз: Клиническая онкогематология / Под ред. Волковой М.А. — М., 2007. — С. 552–586.
2. Кузнецов С.В. Новые подходы к лечению хронического миелолейкоза // Гематология и трансфузиология. — 2007. — №2. — С. 41–45.
3. Куцев С.И., Вельченко М.В., Зельцер А.Н. Молекулярно-генетический мониторинг терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ // Онкогематология. — 2008. — №4. — С. 17–26.

4. Никитин Д.О., Маякова С.А. Хронический миелолейкоз у детей: открытые вопросы // Гематология и трансфузиология. — 1999. — №4. — С. 40–43.
5. Туркина А.Г., Виноградова О.Ю., Хорошко А.Д., Воробьев А.Н. Российский регистр больных хроническим миелолейкозом // Гематология и трансфузиология. — 2007. — №2. — С. 7–11.
6. Barnes D., Palaiologou D., Panousopoulou E. et al. BCR-ABL expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65. — P. 8912–8919.
7. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net // Blood. — 2006. — Vol. 108. — P. 1809–1820.
8. Clift R.A., Appelbaum F.R., Thomas E.D. Treatment of Chronic myeloid leukemia by marrow transplantation // Blood. — 1993. — Vol. 82. — P. 1954.
9. Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M. et al. Prognosis of children with chronic myeloid leukemia: a retrospective analysis of 75 patients // Klin. Padiatr. — 1996. — Vol. 208, №4. — P. 236–241.
10. Goldman J. Management of chronic myeloid leukemia // Semin Hematol. — 2003. — Vol. 40. — P. 1–103.
11. Kantarjian H.M., Giles F.J., O'Brien S.M., Talpaz M. // Hemat. Oncol. Clin. N. Amer. — 1998. — Vol. 12. — P. 31–80.
12. Niemeyer C.M., Arico M., Biondi G. et al. Chronic myelomonocytic Leukemia in Childhood: A Retrospective Analysis of 110 cases // Blood. — 1997. — Vol. 89, №10. — P. 3534–3543.
13. Sokal J.E., Cox E.B., Baccarani M. et al. Prognostic discrimination in «good — risk» chronic granulocytic leukemia // Blood. — 1984. — Vol. 63, №4. — P. 789–799.
14. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues / Edited by Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. — Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. — P. 75–87.

## Глава 8

### Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

*Г.Л. Менткевич*

**Т**рансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является апробированной методикой в лечении целого ряда гематологических, онкологических и иммунологических заболеваний. Первые попытки провести ТГСК у человека были предприняты в 1957 г. Эти попытки были неуспешными, однако показали принципиальную возможность инфузий большого количества клеток костного мозга без развития тяжелых непосредственных осложнений. В 1959 г. двум больным ОЛЛ была проведена ТГСК от идентичных близнецов после тотального облучения тела. У обоих пациентов произошло восстановление кроветворения, однако болезнь рецидивировала. Более активно ТГСК в лечении лейкозов стали использоваться с 1969 г., и в течение нескольких последующих лет было показано, что некоторые больные с рецидивами острого лейкоза могут быть излечены после

терапии высокими дозами циклофосфана и тотального облучения тела.

Важными для развития этого метода лечения на ранних этапах были следующие факторы: разработка технологий ведения больных с отсутствием функции костного мозга, определение понятия системы гистосовместимости и демонстрация значения главного комплекса гистосовместимости в успехе аллоТГСК. Практические проблемы трансфузий компонентов крови и антибиотиков, парентерального питания, жидкостей и электролитов были решены с введением в практику многоканальных центральных венозных катетеров. Представление, что трансплантированный костный мозг может атаковать «чужеродного» хозяина с развитием реакции «трансплантат против хозяина», привело к попыткам контролировать данное осложнение путем разработки подходов, основанных на применении иммуносупрессивной терапии. Использовались малые дозы метотрексата, кортикостероиды, циклофосфан, циклоспорин, Т-клеточная деплеция, FK-506, а также комбинации, включающие в себя короткий курс метотрексата в сочетании с циклоспорином, назначаемыми на 6 мес. Выявление хронической реакции «трансплантат против хозяина» привело к необходимости в целом ряде случаев использовать более длительную иммуносупрессию с применением кортикостероидов и циклоспорина. Пролонгированная иммуносупрессия явилась стимулом для развития методов профилактики оппортунистических инфекций. Было показано, что В-клеточные злокачественные заболевания, ассоциированные с вирусом Эпштейна—Барр, могут быть излечены инфузией донорских лимфоцитов. Расширение показаний к аллоТГСК привело к развитию таких новых направлений, как использование пуповинной крови в качестве источника стволовых клеток, применение немиелоаблативных режимов и трансплантации от частично совместимых доноров.

### 8.1. Показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Трансплантация ГСК может быть предложена пациенту тогда, когда имеются биологические предпосылки для применения этого метода и когда альтернативные методы лечения дают меньшие шансы на длительное безрецидивное течение болезни. Риск данного лечения весьма высок и его нельзя недооценивать. Источник ГСК (донорских или аутологичных) должен быть доступен в соответствующее время применительно к течению заболевания.

В табл. 8.1 суммированы общепринятые показания к ТГСК у больных гемобластозами.

### 8.2. Высокодозная химиотерапия

Теоретической базой для развития высокодозной химиотерапии послужили работы Frei и Canellos, которые установили существование феномена «доза-эффект» в опытах *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека.

На экспериментальных биологических моделях, опухоли которых чувствительны к вводимым химиопрепаратам, а фракция роста в опухоли приближается к 100%, увеличение дозы циклофосфана в 2 раза приводит к усилению эффекта в 10 раз. И наоборот, уменьшение дозы на  $1/5$  ведет к сокращению эффекта наполовину. Клиническое значение феномена «доза-эффект» в режимах высокодозной химиотерапии было показано в клинических исследованиях II фазы. Однако высокий процент положительных ответов сочетался с наличием выраженной токсичности и высокой летальности.

Таблица 8.1  
Показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с гемобластозами

Заболевание	Стадия болезни	Совместимый и несовместимый по I антигену родственный донор	Неродственный вейный донор	Гаплоидентичный родственный донор	АутоГСК
ОЛЛ	Ремиссия 1	+	+	-	+
	Ремиссия 2	+	+	+	+
	Ремиссия > 3	+	+	+	-
	Рецидив	+	+	+	-
ОМЛ	Ремиссия 1	+	-	-	+
	Рецидив 1	+	-	+	+
	Ремиссия 2	+	+	+	+
Rh-положительный ХМЛ	Прогрессия	+	-	+	-
	Хроническая стадия	+	+	-	-
Ювенильный ХМЛ	Любая	+	+	+	-
	Чувствительный рецидив	+	-	+	+
Лимфомы					

\* При наличии утвержденного научного протокола.

### 8.3. Донорство гемопоэтических стволовых клеток

Гемопоэтические клетки-предшественники могут быть получены из костного мозга, периферической крови и пуповинной крови. Их источником может быть сам больной (аутологичные стволовые клетки), идентичный близнец (сингенные стволовые клетки), гистосовместимый или гистонесовместимый донор (аллогенные стволовые клетки).

Значительный прогресс в понимании механизмов возникновения иммунологического конфликта связан с развитием представления о генетической карте человеческого главного комплекса гистосовместимости (HLA).

Большинство ТГСК сделано от HLA-идентичных сиблингов. Однако улучшение результатов трансплантаций привело к тому, что в качестве донора стали использоваться частично совместимые родственные доноры, а также совместимые и частично совместимые неродственные доноры.

Все потенциальные доноры проходят медицинское обследование, которое кроме осмотра включает в себя общий и биохимический анализ крови, исследование на наличие вирусов гепатитов, сифилис, цитомегаловирус, СПИД. Практика показывает, что до 20% потенциальных доноров имеют проблемы со здоровьем, которые должны быть детально изучены. Часто встречающимися медицинскими проблемами являются ожирение, бронхиальная астма и сахарный диабет. У доноров моложе 3 лет встречается железодефицитная анемия и нейробластома. Неродственными донорами могут быть здоровые люди в возрасте от 18 до 55 лет, которые обследуются так же, как и доноры крови. Доноры с признаками активного гепатита и СПИДа отбраковываются. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ) от донора может передаваться ЦМВ-негативному реципиенту. Если реципиент

ЦМВ-негативен, то идеальным для него будет совместимый, ЦМВ-негативный донор.

Забор костного мозга производится в операционной с соблюдением правил асептики и при адекватном анестезиологическом пособии. Обычно костный мозг эксфузируется из задних гребней подвздошных костей, но когда реципиент весит значительно больше донора и необходимо собрать большой объем материала, костный мозг собирается также и из передних гребней. Обычно собирается от 10 до 20 мл/кг массы тела донора или реципиента, в зависимости от того, кто меньше весит. Костный мозг детей, особенно маленьких, содержит большее количество ядродержащих клеток и больше стволовых клеток, чем костный мозг взрослых. Успешные трансплантации проводились от донора с массой тела 6 кг реципиенту с массой тела 36 кг.

Периферические стволовые клетки (ПСК) собирают, как правило, у больных для ауто трансплантации и у здоровых доноров старше 12 лет. В качестве наиболее популярных и проверенных аппаратов для забора ПСК можно отметить сепараторы «Кобе Спектра» и «Бакстер». Сравнительно безопасно можно собирать клетки, используя сепаратор крови, у больных детей с массой тела более 8 кг. Для получения адекватного количества ПСК с меньшими затратами и за меньшее количество сеансов у больных используется сочетание опухоль-адаптированной химиотерапии с последующим применением Г-КСФ. На значительном числе пациентов с различными злокачественными заболеваниями нами не показано разницы в результатах сбора клеток у больных с массой тела более и менее 20 кг (табл. 8.2), в зависимости от основных режимов химиотерапии (табл. 8.3). Наиболее адекватным, с нашей точки зрения, является назначение Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг при появлении первых признаков восстановления кроветворения после химиотерапии (в среднем на 11-й день от окончания химиотерапии). Это позволяет экономить на стимуляции до 800 мкг Г-КСФ.

Таблица 8.2  
Характеристика групп детей с массой тела менее и более 20 кг и результаты сепарации ПСК

	< 20 кг	> 20 кг	<i>p</i>
Количество больных	17	54	
Количество лейкаферезов	42	129	
Число курсов химиотерапии	6 (1–11)	6 (2–19)	0,97
Средняя масса тела, кг	13,4 (10–19)	33,6 (20–62)	
Средний возраст, лет	3,4 (1,1–8)	11,3 (5–28)	
Количество сеансов на 1 больного	2 (1–5)	2 (1–5)	
Обработанный объем крови, мл/кг	205 (184–384)	139 (38–300)	< 0,0001
Скорость сеанса, мл/мин	28 (10–41)	36 (20–70)	< 0,0001
Тромбоциты на день начала первого сеанса, $10^9/л$	87 (18–256)	100 (16–338)	0,4
Лейкоциты на день начала первого сеанса, $10^9/л$	10,7 (0,9–33,0)	11,9 (0,9–45,0)	0,52
ЯК · $10^8/кг$ за сеанс	2,0 (0,33–8,0)	1,4 (0,1–4,4)	0,06
CD34 <sup>+</sup> · $10^6/кг$ за сеанс	2,8 (0,16–16,8)	3,0 (0,005–33,7)	0,74
CD34 <sup>+</sup> · $10^6/кг/1$ ОЦК за сеанс	1,1 (0,07–4,0)	1,7 (0,005–13,3)	0,04
Сеансы с заполнением контура кровезаменителями, %	90	–	

Принятые обозначения: ЯК — ядросодержащие клетки; ОЦК — объем циркулирующей крови.

Таблица 8.3

## Влияние различных химиотерапевтических режимов мобилизации на результаты сепарации ПСК

Режим	Больные ( <i>n</i> )	Лейкаферез ( <i>n</i> )	Периферическая кровь в день первого сеанса серии		CD34 <sup>+</sup> за сеанс	
			Лейкоциты ( $10^9/л$ )	Тромбоциты ( $10^9/л$ )	( $10^6/кг$ )	( $10^6/кг/1$ ОЦК)
ИВК/ЦВК	18	43 (25%)	7,5 (1,4–27,5)	93 (19–479)	4,6 (0,0–33,7)	2,2 (0,0–13,3)
Ц3000	5	11(6%)	10,1 (1,6–27,5)	63 (18–121)	3,2 (0,28–16,8)	1,3 (0,07–4,0)
CAV	8	17 (10%)	8,4 (0,9–34,7)	123 (25–341)	1,6 (0,005–5,7)	1,0 (0,006–4,6)
ИВ	22	47 (28%)	16,3 (1,2–45,0)	148 (30–338)	3,3 (0,05–18)	1,9 (0,015–7,8)
Другие	21	53 (31%)	12,5 (0,9–34,5)	117 (13–381)	1,7 (0,03–7)	0,9 (0,015–7,8)
Всего	71	171 (100%)	11,6 (0,9–45,0)	116 (13–479)	3,0 (0,0–33,7)	1,6 (0,0–13,3)

Принятые обозначения: ИВК/ЦВК — вепезид  $500 \text{ мг/м}^2$  + карбоплатина  $500 \text{ мг/м}^2$  + ифосфамид  $9 \text{ г/м}^2$  или циклофосфан  $2 \text{ г/м}^2$ ; Ц3000 — циклофосфан  $3 \text{ г/м}^2$ ; CAV — циклофосфан  $4,2 \text{ г/м}^2$  + винкристин  $1,5 \text{ мг/м}^2$  + адриамицин  $60 \text{ мг/м}^2$ ; ИВ — ифосфамид  $12 \text{ г/м}^2$  + вепезид  $500 \text{ мг/м}^2$ ; ОЦК — объем циркулирующей крови.

Для стимуляции выброса ПСК у доноров используется только КСФ, как правило, Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 5–7 дней под контролем показателей крови и иногда и исследования концентрации CD34<sup>+</sup>-клеток. Количество клеток, необходимых для успешного восстановления кроветворения после миелоаблативных режимов, окончательно не установлено, однако имеется прямая корреляция между количеством CD34<sup>+</sup>-клеток, перелитых пациенту, и скоростью восстановления показателей крови. Если пациенту переливается более  $5 \cdot 10^6$  CD34<sup>+</sup>-аутологичных клеток/кг или от 6,9 до  $20 \cdot 10^6$  CD34<sup>+</sup>-клеток/кг от донора, то восстановление нейтрофилов более  $0,5 \cdot 10^9/л$  и тромбоцитов более  $20 \cdot 10^9/л$  происходит в среднем на 11-й и 18-й день соответственно.

Исторически пуповинную кровь собирали, замораживали и использовали как источник полипотентных клеток, когда родственные или неродственные источники стволовых клеток отсутствовали. Средний объем пуповинной крови составляет 100 мл (от 40 до 280 мл), в нем содержится в среднем  $7,8 \cdot 10^7$  мононуклеарных клеток/кг массы реципиента. Следует отметить, что сравнительно небольшой объем взвеси накладывает определенные ограничения на возраст и, соответственно, массу тела реципиента. С другой стороны, лабораторные исследования и клинический опыт указывают на более высокую пролиферативную активность клеток, находящихся в пуповинной крови. Это качество, а также отсутствие какого-либо риска для донора являются потенциальными преимуществами пуповинной крови.

Независимо от источника ПСК способ переливания одинаков. Материал инфузируется внутривенно. Аутологичные ПСК и костный мозг, а также пуповинную кровь замораживают и переливают непосредственно после разморозки через 24–72 ч после окончания режима кондиционирования.

AB0-несовместимость между донором и реципиентом встречается в 30% случаев при аллогенной

трансплантации. Более выраженная несовместимость отмечается в случаях, когда плазма реципиента содержит изогемагглютинины, направленные против донорских эритроцитарных антигенов (например, реципиент группы 0, донор группы А). Меньшая несовместимость отмечается, когда плазма донора содержит изогемагглютинины, направленные против эритроцитарных антигенов реципиента (например, реципиент группы А и донора группы 0). В обоих случаях перед инфузией костного мозга показано определение титров анти-А и анти-В изогемагглютининов. Существуют тактические подходы по уменьшению последствий групповой несовместимости между донором и реципиентом. Они суммированы в табл. 8.4

Таблица 8.4

#### Трансфузионная тактика при групповой несовместимости донора и реципиента

Большая AB0-несовместимость	Малая AB0-несовместимость	Большая и малая AB0-несовместимость
Эритроциты реципиента	Эритроциты 0 группы	Эритроциты 0 группы
Тромбоциты и плазма донора	Тромбоциты и плазма реципиента	Тромбоциты и плазма АВ-группы
<b>Пример:</b> Пациент группы 0, Донор группы А Эритроциты — 0 Тромбоциты и плазма — А или АВ	<b>Пример:</b> Пациент группы В, Донор группы 0 Эритроциты — 0 Тромбоциты и плазма — В или АВ	<b>Пример:</b> Пациент группы А, Донор группы В Эритроциты — 0 Тромбоциты и плазма — АВ

После ТГСК все пациенты должны проходить периодическое иммунологическое тестирование для выявления эритроцитов донора и изменений в титрах изогемагглютининов реципиента. Все компоненты крови облучаются в дозе 15 Гр с целью профилактики

реакции «трансплантат против хозяина», обусловленной содержащимися в них лимфоцитами.

Во многих случаях ГСК проходят различные процедуры в процессе подготовки к трансплантации. Наиболее часто проводится удаление Т-лимфоцитов из аллогенного материала для того, чтобы уменьшить риск реакции «трансплантат против хозяина». Во многих случаях пытаются провести очистку аутологичного костного мозга от контаминирующих его злокачественных клеток. Для этой цели используются моноклональные антитела, связанные или с комплементом, или с токсинами, и различные цитостатики такие, как VP-16, кортикостероиды, 4-гидропероксициклофосфамид, винкристин.

#### 8.4. Профилактика реакции «трансплантат против хозяина»

После аллогенной трансплантации у больных высок риск реакции «трансплантат против хозяина», обусловленной наличием иммунокомпетентных клеток в трансплантате.

Многочисленные данные, полученные на животных, свидетельствуют, что Т-лимфоциты донорского костного мозга пролиферируют и дифференцируются в ответ на чужеродные антигены хозяина, что приводит к развитию симптомов острой реакции «трансплантат против хозяина». Аfferентная фаза состоит из следующей цепочки: представление антигенов, активация Т-клеток, клональная пролиферация и дифференцировка. Эfferентная фаза включает в себя выделение лимфокинов активированными лимфоцитами. Результатом каскада иммунологических реакций является развитие апоптоза.

В связи с тем, что детальное определение малых трансплантационных антигенов невозможно, все реципиенты аллогенных ГСК имеют высокий риск ре-

акции «трансплантат против хозяина» после переливания им от  $1,0$  до  $2,0 \cdot 10^7$  ТЗ-клеток/кг массы тела. Поскольку реакция «трансплантат против хозяина» часто приводит к тяжелейшим последствиям, значительные усилия были направлены на разработку методик предотвращения их развития, включая иммуносупрессию, Т-клеточную деплецию и сочетание этих двух подходов. Стандартными иммуносупрессивными препаратами, применявшимися в этой ситуации, были метотрексат, циклоспорин, антитимоцитарный гаммаглобулин и преднизолон. Исследования достоверно продемонстрировали, что более предпочтительным является сочетание двух агентов. К другим веществам, которые изучаются в последние годы, относятся FK-506, триметрексат, анти-CD5 иммуноконъюгат и анти-CD3 моноклональные антитела. Для деплеции Т-клеток также применяются различные методики. Они основаны на использовании моноклональных антител в сочетании с комплементом, иммунотоксинами или магнитными сорбентами. В настоящее время ни один из методов профилактики реакции «трансплантат против хозяина» не является идеальным.

Несмотря на то, что большая часть детей с лейкозами может быть излечена или в течении их заболевания достигается длительная ремиссия с приемлемым качеством жизни (например, применение иматиниба мезилата при ХМЛ), около 25% этих больных нуждаются в альтернативных методах терапии. Продолжается изучение новых препаратов и схем химиотерапии. В этом аспекте наиболее перспективными на ближайшее время являются такие цитостатики, как клофарабин и nelарабин, показавшие свою активность у пациентов с рецидивами, и иммунотоксин гемтузумаб. Вместе с тем трансплантация стволовых клеток в целом ряде ситуаций является единственным методом лечения, дающим больным шанс на выздоровление.

## 8.5. Острые лимфобластные лейкозы

При данном заболевании БРВ достигает 90% при использовании программной терапии. Вместе с тем существует когорта больных, относящихся к группе высокого риска. К ним относятся больные с Rh-хромосомой, мутациями в *MLL*-гене у детей младшей возрастной группы, гипоплоидным ОЛЛ. Прогноз заболевания также неблагоприятный, если пациент медленно выходит в ремиссию, или у него развивается прогрессирование процесса на фоне проводимой терапии.

У больных с Rh-позитивным ОЛЛ на стандартной химиотерапии БРВ составляет 25% и 70% — после проведения им родственной гистосовместимой трансплантации стволовых клеток. Выживаемость больных с этим вариантом ОЛЛ после совместимой неродственной трансплантации (по данным международных регистров) хуже, хотя некоторые центры, такие как тexasский детский госпиталь (США) сообщают о 60% БРВ детей, которым проведена трансплантация в первой ремиссии.

Безрецидивная выживаемость у детей младшей возрастной группы с мутациями в *MLL*-гене —  $t(4;11)$  составляет от 0 до 23%. Данные о роли трансплантации у этого контингента больных противоречивы, однако последние данные из Сизтла, основанные на результатах трансплантации стволовых клеток у 40 больных, большинство из которых имели мутацию  $11q23$ , говорят о 73% 5-летней БРВ после проведения трансплантации стволовых клеток от родственных и неродственных доноров.

Как уже говорилось выше, больные с гипоплоидией (менее 45 хромосом) имеют худший прогноз заболевания. Бессобытийная выживаемость пациентов в этой группе не превышает 25% против 75% у больных с пloidностью более 45 хромосом. Несмотря на то, что количество пациентов, которым проведена трансплантация, невелико, считается, что трансплантация

стволовых клеток дает этим больным существенные шансы на выздоровление.

Следующая группа пациентов — это больные с рецидивами ОЛЛ. Большое исследование, посвященное сравнению эффективности химиотерапии, аутоТГСК и аллоТГСК, показало, что после аллоТГСК (проведенной в полной второй ремиссии и более) от родственных и неродственных доноров БСВ составила 42%. В группах больных, которым проводилась только химиотерапия или консолидация с аутоТГСК, она не превышала 28%. Это исследование доказывает, что аутоТГСК у детей не дает дополнительного улучшения результатов лечения при рецидивах ОЛЛ.

Роль ТГСК у больных с рецидивами ОЛЛ, развившимися через 12 мес. после окончания терапии, по-разному оценивается в литературе, однако, по всей видимости, можно говорить, что в случае наличия гистосовместимого родственного донора вероятность развития повторного рецидива снижается.

При использовании миелоаблативных режимов установлено, что включение тотального облучения тела в программу положительно влияет на процент излеченных пациентов и поэтому рекомендуется Европейским трансплантационным сообществом у детей старше 3 лет. Вместе с тем изучается использование режимов кондиционирования со сниженной токсичностью у больных с органной недостаточностью. Интенсивность и направленность этих режимов (миелоаблативная, иммуносупрессивная, противоопухолевая) варьируют. Противоопухолевая активность, как правило, формируется за счет эффекта «трансплантат против лейкоза», что недостаточно выражено при ОЛЛ у детей по сравнению с ОМЛ и ХМЛ, и нуждается в дополнительном изучении.

Нерешенной проблемой является лечение больных с резистентным ОЛЛ. Возможно включение в программу кондиционирования таргетных протеи-

нов, если они определяются в большом количестве на лейкозной клетке. К таким молекулам могут относиться анти-CD45 моноклональные антитела.

### 8.6. Острые миелоидные лейкозы

В 1977 г. D. Thomas опубликовал данные о выживаемости 54 больных ОМЛ, которым была проведена аллоТГСК. На момент публикации были живы 7 пациентов, находившихся в полной ремиссии от 11 мес. до 4,5 лет. Всем больным было проведено кондиционирование на основе тотального облучения тела в СОД 10 Гр в сочетании с химиотерапией. К 1990 г. были живы 6 пациентов, что явилось доказательством возможности длительного сохранения полной ремиссии при этом заболевании.

К настоящему времени накоплено много данных по эффективности ТГСК при ОМЛ у детей. Доступны результаты больших рандомизированных исследований, свидетельствующие о высокой эффективности такого подхода к лечению. Большинство авторов подчеркивают более высокую роль аутоТГСК при этом заболевании, в отличие от ОЛЛ. Во второй же ремиссии ТГСК, по-видимому, является единственной возможностью для достижения длительного безрецидивного течения болезни.

Недавно опубликованы результаты многоцентрового исследования CCG-2891. Это исследование, в которое было включено более 490 детей, было предпринято для того, чтобы сравнить эффективность аллоТГСК, аутоТГСК и стандартной химиотерапии на этапе консолидации. Оказалось, и это не стало сюрпризом, что на результаты лечения оказывает влияние интенсивность индукционной терапии. Чем более агрессивна индукционная химиотерапия, тем лучше результаты лечения. Таким образом, в группе пациентов, получавших интенсивную индукционную химиотерапию в сочетании с аллоТГСК (в случае наличия HLA-идентичного сиблинга), на

этапе консолидации были получены наилучшие результаты: 3-летняя выживаемость составила 70%. В группах больных, которым проводилась аутоТГСК и стандартная химиотерапия, она составила соответственно 45 и 62% (Study committee progress report, CCG, April 1996). К настоящему времени достигнут консенсус, заключающийся в признании факта, что аллоТГСК может считаться стандартом лечения, обеспечивающим более чем у 50% пациентов БРВ более 5 лет. В последние годы и другие авторы сообщают о больших группах больных ОМЛ, которые получали лечение, включающее ТГСК. Так, были доложены данные совместного итальянского, австрийского и немецкого регистров о 424 ТГСК при ОМЛ. 186 пациентам была произведена аллоТГСК, 203 — аутоТГСК. Безрецидивное течение болезни составило 62%, если аллоТГСК была сделана в первой ремиссии, и 37% — если во второй. Для аутоТГСК результаты были соответственно 48 и 43%, что свидетельствует о достаточно высокой эффективности обоих подходов. В некоторых исследованиях показана высокая роль аутоТГСК. Так, группа ученых из Австралии сообщает о хороших результатах лечения больных ОМЛ, которым после индукционной химиотерапии проводилась аутоТГСК с использованием кондиционирования только мелфаланом. Выход в ремиссию среди 31 пациента ОМЛ составил 90%, а 5-летнюю БРВ от момента установления диагноза составило 68% (87% от момента проведения аутоТГСК. Очистка костного мозга в данном исследовании не производилась. По-видимому, очень эффективная и, соответственно, интенсивная индукционная химиотерапия в сочетании с аутоТГСК может быть признана одним из стандартных способов лечения ОМЛ в дебюте заболевания.

В настоящее время существует целый ряд режимов кондиционирования: тотальное облучение тела + циклофосфан, тотальное облучение тела + VP-16, тотальное облучение тела + мелфалан, бусульфан + ци-

клофосфан. Все эти режимы обладают приблизительно одинаковой эффективностью и токсичностью.

В отношении реакции «трансплантат против опухоли» при ОМЛ можно сказать, что он существует при этом заболевании. Данные исследований, суммированных из шести различных центров, показывают, что вероятность рецидива составила 18% после аллоТГСК по сравнению с 59% после сингенной ТГСК.

Результаты некоторых исследований указывают также на возможность проведения аутоТГСК во второй ремиссии с достаточно высокими шансами на длительное БРВ. В этих обстоятельствах особое значение приобретает возможность моделирования реакции «трансплантат против опухоли». Группой из Сиэтла (США) была показана возможность использования ИЛ-2 после аутоТГСК. Правда, количество пациентов было не очень большим (всего 14, из которых 9 были в первом рецидиве, 3 — во второй ремиссии и 2 — во втором рецидиве), но вероятность безрецидивного течения у этих больных составила 71%. Авторами также показано, что использование аутологических лимфокинактивированных НК-клеток у этих больных сопровождается большими техническими трудностями, так как повторные сеансы цитафереза, которые следует проводить при интенсивной химиотерапии и тромбоцитопении, являются для них тяжелой процедурой. Тем не менее эти исследования послужили толчком для дальнейшего изучения возможности моделирования данного состояния.

Существенным моментом, который вызывает большие споры и сомнения в осуществлении аутоТГСК при ОМЛ, является целесообразность очистки костного мозга. Несмотря на то, что, по-видимому, основной процент рецидивов обусловлен недостаточной эффективностью режима кондиционирования (данные о проценте рецидивов после аллоТГСК подтверждают это), нельзя исключить, что злокачественные клетки, находящиеся в аутотрансплантате, могут стать причиной рецидива в некотором проценте

случаев. Несколько методик очистки костного мозга были разработаны и внедрены в широкую практику при ОМЛ. Из химиотерапевтических агентов, изучаемых и используемых для очистки костного мозга, наибольшее распространение получили два производных циклофосфида: мафосфамид (4-сульфоэтилтиоциклофосфамид) и 4НС (4-гидропероксициклофосфамид). Ранние преклинические исследования показали, что при инкубации смеси лейкозных и нормальных клеток костного мозга с 4НС первые погибают, а вторые выживают и сохраняют свою жизнеспособность. Несмотря на дальнейшие попытки ряда исследовательских групп использовать различные комбинации цитостатиков, именно эти два получили наибольшее практическое применение — мафосфамид в Европе, 4НС в Америке. Иммунологическая очистка костного мозга при ОМЛ стала возможной после создания специфических антител, которые реагируют с CD14-, CD15- и CD33-миелоидными антигенами и не реагируют с нормальными примитивными гемопоэтическими клетками. Мультицентровое исследование, суммирующее данные по 55 аутотрансплантатам, прошедшим двойную иммунологическую очистку (анти-CD15 и -CD14 моноклональными антителами), было опубликовано в 1992 г. Безрецидивная выживаемость и вероятность развития рецидива составили 51 и 49% соответственно, если ТГСК была произведена в первой ремиссии. Во второй и третьей ремиссиях вероятность безрецидивного течения болезни составила 30%.

К настоящему времени не проведено ни одного рандомизированного исследования, дающего ответы на вопросы, какой метод очистки наиболее эффективен, и имеет ли очистка костного мозга преимущества перед костным мозгом, не «очищенным» вообще. В последние годы наряду с методом негативной селекции, упомянутым выше, при ОМЛ начинает развиваться позитивная селекция стволовых клеток, однако уже на первом этапе появились сообщения, что стволово-

клеточный антиген CD34 экспрессируется на злокачественных клетках некоторых пациентов.

### 8.7. Хронический миелолейкоз

Хронический миелолейкоз у детей может быть разделен на Rh-положительный (взрослый) и ювенильный типы. Биология и естественное течение Rh-положительного ХМЛ у детей практически не отличаются от таковых у взрослых. Медиана выживаемости, как правило, составляет 3–4 года при обычно неотвратимом фатальном исходе при стандартной терапии. Ювенильный вариант ХМЛ отличается более злокачественным течением с пиком развития заболевания, приходящимся на возрастную группу до 2 лет. Практически у  $\frac{1}{3}$  больных развивается бластный криз, остальные погибают от инфекций или кровотечения. Медиана выживаемости составляет 1 год при стандартной терапии. Общим для обоих вариантов ХМЛ является то, что химиотерапия в большинстве случаев носит паллиативный характер. В настоящее время аллоТГСК представляет собой единственный метод лечения, дающий шанс на выздоровление.

Анализ эффективности лечения более 4000 пациентов с ХМЛ, которым была произведена аллоТГСК от HLA идентичного сиблинга, показал, что хотя у большинства этих больных были получены полная гематологическая и цитогенетическая ремиссии, общие результаты лечения зависят от фазы заболевания и срока проведения трансплантации. Около 50–60% больных, которым аллоТГСК проводилась в хронической фазе, имели безрецидивное течение болезни, в фазе акселерации — только 35–40%. Даже в острой бластной стадии 20% больных имеют шанс на достижение длительного безрецидивного течения болезни. При ювенильном варианте ХМЛ также имеется преимущество аллоТГСК перед стандартной химиотерапией.

Основная причина ухудшения результатов ТГСК по мере прогрессирования заболевания лежит в по-

вышении процента рецидивов болезни (с 20% в хронической стадии до 60% в острой бластной стадии). Подготовительный режим, состоящий из комбинации бусульфана и циклофосфана, оказался столь же эффективным, что и режим, включающий в себя циклофосфан и тотальное облучение тела. Установлены оптимальные сроки проведения ТГСК. Лучшие результаты достигаются, если аллоТГСК произведена в течение первого года от момента постановки диагноза.

Определение минимальной остаточной болезни с помощью ПЦР показывает, что высокодозная терапия не приводит к полному уничтожению злокачественных клеток. Приблизительно у 50% больных сохраняется небольшое количество Rh-положительных клеток. Это не обязательно является фактором, предсказывающим развитие рецидива болезни. В некоторых случаях эти клетки исчезают позже в посттрансплантационном периоде. Однако, если Rh-положительные клетки определяются постоянно и длительное время в крови больного после ТГСК, это ассоциируется с высоким риском рецидива. Если же данное состояние сохраняется после проведения ТГСК перенесшим Т-клеточную деплецию, то прогрессирование процесса возникает в 90% случаев.

В связи с тем, что ТГСК при ХМЛ является единственным методом лечения, способным привести к выздоровлению больного, а наличие гистосовместимого родственного донора или подходящего частично несовместимого донора встречается менее чем в 40% случаев, исследователи считают это заболевание идеальным для изучения эффективности неродственной ТГСК.

Несколькими исследованиями продемонстрировано, что неродственная трансплантация в значительном проценте случаев приводит к полноценному восстановлению кроветворения и исчезновению Rh-хромосомы. В этих же исследованиях отражено, что этот тип ТГСК сопровождается более высокой ранней смертностью, более частым отторжением трансплантата (5% по сравнению с 1%), высоким риском разви-

тия тяжелой острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» (70% по сравнению с 35% при трансплантации от HLA-идентичных сиблингов), длительным периодом общего восстановления и развитием лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна—Барр. На результаты ТГСК влияют также степень совместимости донора и реципиента и возраст последнего (чем моложе пациент, тем результаты лечения лучше). К проблемам, не решенным к настоящему времени при проведении неродственной трансплантации, относится реакция «трансплантат против хозяина», которая достигает III—IV степени практически в 55% случаев. При T-деплеции вероятность возникновения тяжелой формы острой реакции «трансплантат против хозяина» снижается до 20%, а хронической — до 22%. Однако длительное наблюдение за больными, которым была произведена ТГСК после T-деплеции, показало, что у них чаще развивается рецидив болезни, отторжение трансплантата и повышен риск развития лимфом.

### 8.8. Частично-совместимые трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Следует отметить, что более широкому использованию аутоТГСК при злокачественных заболеваниях кроветворной и лимфоидной ткани препятствует наличие злокачественных клеток в материале в значительном проценте случаев, когда имеются показания к данному методу лечения, а также отсутствие эффекта «трансплантат против опухоли», что сопровождается значительным количеством рецидивов болезни. Широкому внедрению аллоТГСК препятствует проблема наличия совместимых доноров у большинства больных. В связи с этим большой интерес представляют работы Клингбея с соавт., в которых со-

общается о возможности аллогенной трансплантации от родственного донора со степенью совместимости 3 из 6, 4 из 6, если проводилась обработка материала путем выделения «чистой» популяции CD34<sup>+</sup>-клеток. Трансплантация таким материалом была произведена 14 больным различными заболеваниями. У большинства пациентов процедура обогащения материала CD34<sup>+</sup>-клетками была единственным мероприятием, направленным на профилактику реакции «трансплантат против хозяина», и в подавляющем большинстве случаев этого было достаточно. Этот и некоторые другие подходы открывают новые перспективы использования ТГСК в детской онкогематологии.

## 8.9. Посттрансплантационные осложнения

### 8.9.1. Острая реакция «трансплантат против хозяина»

Несмотря на использование различных методов профилактики реакции «трансплантат против хозяина», часто у больных после аллоТГСК развиваются ее клинические проявления. Острая реакция «трансплантат против хозяина» — клинико-патологический синдром, включающий в себя поражение кожи, печени и кишечника.

Кожные проявления отмечаются в виде пятнисто-папулезной сыпи красного цвета с зудом и болезненностью. В тяжелых случаях отмечается десквамация и образование булл. В плане дифференциального диагноза следует рассматривать сыпь, индуцированную химиотерапией, лекарственную аллергию и вирусную экзантему. Биопсия кожи, как правило, информативна начиная с 21-го дня от ТГСК. К гистологическим находкам, подтверждающим реакцию «трансплантат против хозяина», относятся базальноклеточная вакуолярная дегенерация с некрозом клеток эпидермиса и расслоение дерма-эпидермального слоев.

Со стороны печени определяется холестатическая желтуха. Для реакции «трансплантат против хозяина» не характерна печеночная недостаточность с развитием энцефалопатии. Точная диагностика характера печеночного процесса часто затруднена в связи с необходимостью дифференцировать реакцию «трансплантат против хозяина» от вено-окклюзионной болезни, инфекций и лекарственной токсичности. Биопсия печени не всегда возможна в раннем посттрансплантационном периоде.

Гастроинтестинальная форма реакции «трансплантат против хозяина» проявляется диареей со спастическими болями. Стул — зеленого цвета с наличием слизи, водянистый. При рентгеноконтрастном исследовании кишечника отмечается отек слизистой и подслизистой слоев, ускоренный пассаж бария и сложенность складок. Как вариант клинической картины реакции «трансплантат против хозяина», у 13% больных отмечается анорексия и диспепсия. Иногда гастроинтестинальные проявления не ассоциируются с поражением нижних отделов желудочно-кишечного тракта. При симптомах неблагополучия со стороны верхних отделов желудочно-кишечного тракта обязательно эндоскопическое обследование с биопсией. Поражение нижних отделов желудочно-кишечного тракта подтверждается биопсией прямой кишки, при которой выявляется некроз отдельных клеток вплоть до гибели всей крипты и потери эпителия.

К другим проявлениям реакции «трансплантат против хозяина» относятся анемия и тромбоцитопения. Встречаются также симптомы поражения аппарата зрения в виде фотофобии, геморрагических конъюнктивитов и псевдомембранозных формирований.

Для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» применяют цитостатики и глюкокортикоиды. Наиболее распространенный режим включает в себя метилпреднизолон в дозе 2 мг/кг/сут в течение 2 недель с постепенной отменой. Не выявлено разли-

чий при сравнении эффективности лечения метилпреднизолоном и антитимоцитарным гаммаглобулином. Добавление циклоспорина также не показало его большей эффективности по сравнению с метилпреднизолоном. Больные, получавшие в качестве профилактики реакции «трансплантат против хозяина» метотрексат в сочетании циклоспорином, реже оказываются нечувствительными к лечению. Добавление метилпреднизолона для них, по всей видимости, наиболее эффективный начальный вариант лечения. Исход болезни коррелирует с эффектом лечения. Смертность больных со II–IV стадиями реакции «трансплантат против хозяина» меньше у тех пациентов, у которых имелся полный эффект терапии.

### 8.9.2. Хроническая реакция «трансплантат против хозяина»

Представляет собой клинко-патологический синдром с вовлечением в процесс кожи, печени, глаз, слизистой полости рта, желудочно-кишечного тракта, легких и нейромышечной системы. У детей моложе 10 лет, которым производилась трансплантация от гистосовместимого родственного донора, частота встречаемости хронической реакции «трансплантат против хозяина» составляет 13%, в возрасте от 10 до 19 лет — 28%. Среди реципиентов, у которых в качестве донора использовался частично совместимый родственный донор или неродственный донор, реакция «трансплантат против хозяина» встречается в 42–56% случаев во всех возрастных группах. Наиболее существенным прогностическим фактором является степень HLA-совместимости между донором и реципиентом.

Кожные проявления напоминают плоский лишай. При гистологическом исследовании выявляют атрофию эпидермиса и фиброз дермы без признаков воспаления. Реже наблюдается генерализованная склеродермия. Выраженность поражения кожных по-

кровов варьирует в широких пределах. У некоторых больных быстро развивается эритема, гиперкератоз и десквамация, у других — развитие поражений носит торпидный характер. Часто встречается алопеция и «потеря» ногтей. Восстановление волосяного покрова и функции потовых желез — ранний клинический симптом улучшения, а биопсия кожи — важный момент для уточнения диагноза и оценки эффекта терапии.

Печеночные тесты указывают в основном на холестатические проявления. Степень гипербилирубинемии не коррелирует с клиническим исходом. Дифференциальный диагноз следует проводить с вирусными гепатитами и гепатотоксическим воздействием химиопрепаратов. Уточнить диагноз позволяет биопсия печени.

Глазные симптомы включают в себя жжение, фотофобию и боль, обусловленные развитием сухого кератоконъюнктивита. Функция слезных желез оценивается при помощи теста Ширмера и микроскопии роговицы. Даже в случае отсутствия симптомов больные должны быть обследованы на предмет сухости роговицы, и если последнее обнаружено, то им должна быть рекомендована искусственная слеза.

Сухость во рту, повышенная чувствительность к кислой и перченой пище, появление болевых ощущений после 100-го дня от трансплантации должны настораживать в плане развития хронической реакции «трансплантат против хозяина». Атрофия слизистой полости рта, эритема и лишаеподобные поражения на ней также коррелируют с наличием хронической реакции «трансплантат против хозяина». К гастроинтестинальным симптомам могут относиться дисфагия, боли, постепенное снижение массы тела. У девочек могут развиваться вагиниты и стриктуры влагалища.

Более тяжелое течение хроническая реакция «трансплантат против хозяина» имеет в случае, если она развивается, непосредственно сменяя острую.

Прогноз заболевания более благоприятный, если болезнь диагностируется впервые. Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» развивается в среднем на 200-й день у реципиентов родственного гистосовместимого материала и на 145-е сутки, если производилась частично совместимая или неродственная трансплантация. Обследование больных на 100-й день, включающее осмотр кожи с биопсией, офтальмологическое обследование с тестом Ширмера, определение функции печени, может быть информативным в плане прогноза развития хронической реакции «трансплантат против хозяина». Даже при отсутствии симптомов позитивные данные кожной биопсии или наличие в анамнезе острой реакции «трансплантат против хозяина» в 3 раза увеличивает риск хронической реакции.

Лечение должно быть начато как можно в более ранние сроки. Применяются кортикостероиды, циклоспорин, селлсепт, их комбинации, а также моноклональные антитела ОКТ3, анти-CD25, анти-ФНО и их комбинации. Лечение должно проводиться как минимум 9 мес. или до момента исчезновения клинических симптомов и нормализации биоптата кожи и слизистых.

### 8.9.3. Инфекционные осложнения

Восприимчивость к инфекционным заболеваниям — одна из центральных проблем у больных после трансплантации. Циторедуктивные режимы приводят к глубокой миелосупрессии и иммунодефицитам, которые длятся месяцами. Если развивается хроническая реакция «трансплантат против хозяина», то недостаточность иммунитета может сохраняться сколь угодно долго. Посттрансплантационный период условно делат на три этапа: раннее восстановление, середина, обычно 2–3 мес. после трансплантации, и поздняя фаза, которая, как правило, начинается после 3 мес. На первом этапе во время фазы нейтропении чаще от-

мечаются бактериальные или грибковые инфекции. В этом периоде грамотрицательная флора долгое время являлась основной причиной летальности. В последние годы значительно чаще стали встречаться грамположительные микроорганизмы. Использование антибиотиков широкого спектра действия лишь частично решает эту проблему. Профилактическое применение флуконазола способствует снижению числа кандидозов. Обычно после восстановления лейкоцитов антибактериальная терапия может быть прекращена. В это время наиболее частыми причинами лихорадки являются ЦМВ-инфекция, инфицирование центрального катетера, синуситы и аспергиллез.

В позднем периоде риск инфекционных осложнений прогрессивно снижается. В случаях использования аутологичных ГСК инфекционных эпизодов меньше. Если у больных нет хронической реакции «трансплантат против хозяина», то инфекции также встречаются нечасто. Если же у больного выражена хроническая реакция «трансплантат против хозяина», пациент чрезвычайно подвержен рецидивирующим бактериальным эпизодам, особенно вызванным инкапсулированными микроорганизмами. Если у таких больных выражена недостаточность иммуноглобулина G, может быть полезным его применение. ЦМВ-инфекция развивается у 70–80% больных после аллотГСК в сроки от 28 до 72 дней. Наиболее опасна ЦМВ-инфекция, дающая высокий уровень летальности. Исследования, проведенные у серонегативных реципиентов, доказали, что использование в трансфузионной практике серонегативных препаратов крови или лейкоцитарных фильтров существенно снижает риск ЦМВ-инфекции. Однако убедительных данных, что серонегативные препараты крови снижают риск ЦМВ-инфекции у серопозитивных пациентов, нет. Среди противовирусных агентов, применяющихся для профилактики и лечения ЦМВ-инфекции, наибольшее распространение получил ганцикловир. Когда этот препарат применяется при наличии серо-

позитивности или с целью профилактики, отмечается существенное снижение частоты развития ЦМВ-инфекции. Однако следует иметь в виду, что одним из побочных эффектов применения ганцикловира является развитие нейтропении. Вместе с тем отмечается, что ганцикловир неэффективен в случаях развития ЦМВ-энтерита. Сочетание же ганцикловира с иммуноглобулином дает лучшие результаты при лечении интерстициальной пневмонии по сравнению с другими методами лечения. Среди наиболее часто встречающихся вирусных инфекций следует отметить аденовирусы, герпетические инфекции, ветряную оспу и респираторно-синтициальный вирус. Стандартной стратегией является профилактическое применение ацикловира в дозе 250 мг/м<sup>2</sup> каждые 12 ч в первые 30 дней после трансплантации. В случаях развития ветряной оспы на первом году после трансплантации рекомендуется терапия ацикловиром.

#### 8.9.4. Отдаленные последствия

Они могут быть обусловлены как непосредственно ТГСК, режимом кондиционирования, так и особенностями течения основного заболевания.

##### Недостаточность иммунитета

Характеризуется неадекватным функционированием донорских Т- и В-лимфоцитов, что обусловлено, в частности, эффектами острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» и лечением, которое применяется для коррекции этого состояния. Адекватный предтрансплантационный режим сопровождается уничтожением гемопоэза реципиента, его Т-клеточного звена иммунитета и депрессией В-лимфоцитарного иммунитета. В посттрансплантационном периоде должно происходить восстановление Т- и В-лимфоцитов из донорского пула. Трансформация системы иммунитета из реципиента в донора доказана. Если больным при отсутствии аллергии в

анамнезе трансплантируется костный мозг аллергиков, то в последующем у 80% из них при длительном периоде наблюдения развивается кожная аллергия, у 70% — аллергический ринит и у 20% — бронхиальная астма. Следовательно, можно говорить о трансмиссии IgE-зависимой гиперчувствительности. Примером функционирования Т-клеточного иммунитета донора может служить появление у больных титров дифтерийных антител. Антителообразование — как функция новообразовавшейся иммунной системы, развивается только после того, как произойдет адекватное восстановление Т-клеточного звена иммунитета. При благоприятном течении посттрансплантационного периода и без развития хронической реакции «трансплантат против хозяина» это может произойти через 6 мес. Несмотря на это, не рекомендуется использовать живую полиомиелитную вакцину, так как продукция антител в ответ на вирусную инфекцию замедлена. Рекомендуемый прививочный календарь приведен в табл. 8.5.

Таблица 8.5

**Рекомендуемая схема ревакцинации детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток**

Вакцина	Сроки
Дифтерия — столбнячный анатоксин	6–12 мес.
Вакцина Сэбина	Не рекомендуется
Инактивированная полиомиелитная вакцина Солка	6–12 мес.
Корь — паротит — краснуха	2 г.

**Функция легких**

Обструктивные нарушения отмечаются у 10% больных с хронической реакцией «трансплантат против хозяина», рестриктивные — у 20% долгожителей.

**Вторые опухоли**

Данные Международного трансплантационного регистра указывают, что частота встречаемости вторых злокачественных опухолей составляет 0,6 на 100 пациентов в год. Эти сведения совпадают с данными, полученными в Сиэтле (США), где вторые опухоли развились у 82 из 4294 пациентов, перенесших ТГСК. Вероятность развития вторых опухолей в сроки до 15 лет после трансплантации составляет 6% для больных, не получавших тотальное облучение тела, по сравнению с 20%, если оно было включено в режим кондиционирования.

**Гормональные нарушения**

После высокодозной химиотерапии и трансплантации часто встречается патология со стороны эндокринной системы. У детей отмечаются недостаточность функции щитовидной железы и дефицит гормона роста. Если режим кондиционирования включает только циклофосфан, то частота развития недостаточности функции щитовидной железы не превышает таковую в нормальной популяции. В связи с тем, что не страдает продукция гормона роста, лечение не влияет на последующий рост больных. Если пациентам осуществлялось тотальное облучение тела, то дисфункция щитовидной железы, по данным разных авторов, отмечалась в 12–56% случаев.

В то же время у 50–60% больных, которым проводилось тотальное облучение тела, отмечается дефицит продукции гормона роста с соответствующим отставанием в росте от сверстников. Следует отметить, что аналогичное влияние оказывает и краниальное облучение. Если пациент не получает заместительной терапии гормоном роста и если ТГСК была произведена в возрасте до 11 лет, то процент недобора роста может быть очень существенным. Облучение головы и шеи у пациентов младшей возрастной группы сопровождается уменьшением размеров лицевого скелета. Нарушается формирование челюстей и образование зубов.

Все пациенты, получившие высокодозную химиотерапию с ТГСК, относятся к группе риска развития дисфункции гонад. У детей это является более серьезной проблемой, чем у взрослых. Если больным проводилась высокодозная химиотерапия циклофосфаном, их вторичное половое развитие соответствовало возрасту. У некоторых из этих бывших детей имеются свои дети. Таким образом, фертильность не всегда развивается в препубертатном периоде. В постпубертатном периоде нормализация функции гонад отмечается у 65% больных к окончанию года после ТГСК. У большинства пациентов препубертатного возраста, которым было применено тотальное облучение тела, отмечается нарушение полового развития, а у больных постпубертатного возраста — недостаточность функции гонад. После аллоТГСК больные длительное время должны наблюдаться эндокринологом. Своевременное назначение гормональной коррекции может улучшить прогноз посттрансплантационного периода и уменьшить последствия дисфункции эндокринных желез.

Трансплантация ГСК становится стандартным методом лечения при ряде злокачественных заболеваний у детей. Несмотря на достижения в типировании доноров, проведении поддерживающей терапии, осложнения, связанные с ТГСК, остаются существенными. Также велик риск прогрессирования заболевания. К безусловно перспективным направлениям относятся разработки немиелоаблативных режимов, возможностей проведения гаплоидентичных ТГСК, более широкое использование пуповинной крови и развитие представлений о феномене и моделировании эффекта «трансплантат против опухоли».

#### Основная литература

1. Долгополов И.С., Янкелевич М.Я., Андреева Л.Ю. и др. Мобилизация и сепарация стволовых клеток из периферической крови в детской онкологии:

- результаты 4-летнего поиска эффективной и безопасной методики // Педиатрия. — 1999. — Т. 3. — С. 58–65.
2. Долгополов И.С., Проценко Р.М., Равшанова Р.С. Лейкаферез у детей с малым весом: опыт работы отделения трансплантации костного мозга // Детская онкология. — 2003. — №3. — С. 19–22.
  3. Долгополов И.С., Равшанова Р.С., Проценко Р.М. Аллогенная трансплантация от родственных частично совместимых доноров на фоне режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью в онкологии // Детская онкология. — 2003. — №3. — С. 32–41.
  4. Попа А.В., Долгополов И.С., Гришина В.В. Значение аутологичной трансплантации костного мозга или периферических стволовых клеток у детей, больных острым миелоидным лейкозом // Детская онкология. — 2003. — №3. — С. 13–19.
  5. Проценко Р.М., Долгополов И.С., Андреева Л.Ю. Отсроченное введение Г-КСФ после химиотерапии не влияет на процесс мобилизации периферических стволовых клеток крови и кинетику приживления трансплантата у детей со злокачественными опухолями высокого риска: ретроспективное исследование 45 случаев // Детская онкология. — 2003. — №3. — С. 7–13.
  6. Gaynon P.S. Childhood acute lymphoblastic leukemia and relapse // Br. J. Hematol. — 2005. — Vol. 131. — P. 579–587.
  7. Klingebell T., Schunn M., Lang P. et al. CD34 enrichment as GVHD prophylaxis in mismatched related and unrelated stem cell transplantation // Bone Marrow Transplantation, 1998. — Vol. 21, suppl 1, march +n 755.
  8. Rivera G.K. Therapeutic options for children with acute lymphocytic leukemia who fail on contemporary protocols. In: Bone marrow transplantation. Current controversies / Eds. R.P. Gale, R.E. Champlin. — New York: Alan R. Liss, 1989. — С. 31–45.
  9. Sanders J.E., Im H.J., Hoffmeister P.A. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia // Blood. — 2005. — Vol. 105(9). — С. 3749–3756.

10. *Thomas E.D., Blume K., Forman S.* Hematopoietic cell transplantation. — Blackwell Science, 1999.
11. *Tiedemann K., Waters K., Tauro G. et al.* Results of intensive therapy in childhood acute myeloid leukemia, incorporating high-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation in first complete remission // *Blood*. — 1993. — Vol. 82, No 12. — P. 3730–3738.

## Глава 9

### Сопроводительная терапия

*И. С. Долгополов*

За последние два десятилетия интенсификация программ терапии острых лейкозов изменила прогноз у больных, особенно в педиатрической практике. Вместе с тем существенное увеличение безрецидивной и, особенно, бессобытийной выживаемости пациентов было бы невозможно без постоянного совершенствования методов сопроводительной терапии. Эта глава посвящена наиболее острым проблемам сопроводительной терапии больных в фазах индукции и консолидации ремиссии. Особый акцент сделан на различного рода инфекционные осложнения, возникающие в фазу нейтропении, на профилактику и лечение геморрагического синдрома, состояний, связанных с метаболическими нарушениями при терапии острых лейкозов. Затронут ряд и других аспектов, с которыми врач, курирующий проблему острых лейкозов, наиболее часто встречается в своей практике.

## 9.1. Инфекционные осложнения

Инфекции, вызванные бактериями, вирусами, грибами или простейшими, наблюдаются у больных острыми лейкозами в течение всего периода течения болезни и ее лечения. Некоторые микроорганизмы приобретаются в процессе пребывания больного в стационаре, другие, колонизирующие кожу и слизистые, не вызывающие болезни у иммунокомпетентных хозяев, становятся более патогенными при изменении механизмов противомикробной защиты [2]. Наиболее часто серьезные инфекции у больных лейкозами связаны с условно-патогенными бактериями и грибами, такими как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, анаэробными бактериями *Clostridium difficile* и грибами рода *Candida*. Внешняя среда является источником *Pseudomonas aeruginosa* и грибов рода *Aspergillus* (табл. 9.1). Вирусные инфекции распространяются различными путями. У детей инфицирование вирусом простого герпеса типа 1, ЦМВ и вирусом *varicella-zoster* осуществляется воздушно-капельным путем при контакте с инфицированным индивидуумом. У взрослых происходит реактивация этих и других (вирус простого герпеса типа 2) вирусов.

Механизмы защиты здорового индивидуума от инфекций включают в себя клеточные и гуморальные звенья иммунитета, а также механические факторы, такие как целостность кожных покровов и слизистых желудочно-кишечного, респираторного и мочеполового трактов. У больных острыми лейкозами наблюдается нарушение всех этих механизмов одновременно или последовательно, в зависимости от характера болезни, интенсивности и фазы терапии (табл. 9.2).

Таблица 9.1

## Основные причины инфекций у детей с острыми лейкозами

Патоген	Частота
<b>Бактерии</b>	редко
Грамотрицательные	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
Грамположительные	
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. viridans</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Listeria spp.</i>	
Анаэробы	
<i>Bacteroides spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i>	
Микобактерии	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , atypical <i>Mycobacteria</i>	
<b>Грибы</b>	
<i>Fusarium spp.</i> , <i>Mucor spp.</i>	
<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	
<b>Простейшие</b>	
<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	

Таблица 9.1 (продолжение)

Патоген	Частота
Вирусы	редко
<i>varicella-zoster</i> , вирус простого герпеса, ЦМВ	часто
Вирус Эпштейна—Барр, энтеровирусы, герпес-вирус человека типа 6, вирус ВК, аденовирус, респираторный синцитиальный вирус, живые вакцинальные вирусы, вирусы гепатита В и С, вирусы гриппа и парагриппа	редко

Таблица 9.2

## Причины снижения резистентности к инфекциям у детей с острыми лейкозами

Причины	Эффекты
Лейкоз	Гранулоцитопения, лимфоцитопения Гипогаммаглобулинемия Нарушение иммунитета
Химиотерапия	Цитопения Нарушение целостности физиологических барьеров Т-, В-клеточный дефицит
Госпитализация (воздух, еда, вода, личные контакты)	Колонизация внутрибольничной флорой
Катетеры, дренажи	Нарушение целостности физиологических барьеров

Нейтропения у больных острыми лейкозами — один из основных факторов, способствующих развитию инфекции [2]. Нейтропения диагностируется при абсолютном количестве нейтрофилов в периферической крови менее  $1,5 \cdot 10^9/\text{л}$ , а тяжелая нейтропения — менее  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ . Риск развития инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, прежде всего *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, а также грибами родов *Candida* и *Aspergillus*, резко увеличивается при абсолютном содержании нейтрофилов менее  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ . Другим критическим фактором является длительность нейтропении более 10 дней. В исследовании, объединяющем 444 больных с фебрильной нейтропенией, риск развития инфекции IV степени тяжести составлял 36% по сравнению с 16% ( $p < 0,0001$ ), если уровень нейтрофилов не поднимался выше  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$  в течение 7 и более дней [12].

Развитие мукозитов на фоне химио- и лучевой терапии не только является причиной выраженного болевого синдрома и ухудшает самочувствие больного, но и достоверно увеличивает риск развития тя-

желых инфекций, нарушая проницаемость слизистых оболочек. С этой точки зрения наиболее опасна комбинация язвенно-некротического стоматита и нейтропении. Поражение слизистых оболочек при применении в терапии высоких доз цитозина-арабинозида возникает в первые 24–48 ч и ассоциировано с высоким риском развития сепсиса, вызванного *Streptococcus viridans*.

Большинство химиопрепаратов, используемых для лечения лейкозов, вызывают не только нейтропению и мукозит, но и подавляют фагоцитоз и другие звенья иммунной системы.

Новые аналоги пуриновых нуклеотидов (флударабин), показавшие высокую эффективность в качестве второй линии терапии, оказывают длительное и значительное иммуносупрессивное действие. Выраженный иммунодефицит, обусловленный низким уровнем CD4<sup>+</sup>-клеток после применения флударабина, персистирует в течение года и более. У больных отмечается высокий уровень инфекций, вызываемых *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis carinii*, ЦМВ, вирусами простого герпеса, *varicella-zoster*, атипичными микобактериями.

Кортикостероиды, используемые при лечении лейкозов, а также при терапии септического шока и интерстициальной пневмопатии, угнетают фагоцитоз, подавляют клеточный иммунитет и неспецифические воспалительные реакции, уменьшая клинические симптомы инфекции. Кортикостероиды в терапевтических дозах способствуют росту грибов рода *Aspergillus*, ускоряя рост гифов в 2 раза (с 1 до 2 см/ч). Активное использование стероидов, интенсивная предшествующая терапия, нейтропения, гипогаммаглобулинемия, высокий креатинин сыворотки крови, плохой ответ на терапию — неблагоприятные факторы, увеличивающие риск летальных инфекций.

Свой вклад в селекцию патологических микроорганизмов вносит применение антибиотиков для

профилактики и лечения инфекции [2]. Этот же механизм характерен для инфекций, вызываемых *Streptococcus* и другими грамположительными бактериями на фоне деконтаминации кишечника фторхинолонами. Другим примером служит некротизирующий энтероколит, вызываемый *Clostridium difficile*, возникающий в результате селекции флоры после применения антибиотиков широкого спектра действия. Длительное применение антибиотиков и стероидов достоверно увеличивает риск грибковых инфекций, вызываемых *Aspergillus spp.* С другой стороны, активная противогрибковая терапия амфотерицином В удлиняет период нейтропении, что, в свою очередь, приводит к развитию вирусных и бактериальных инфекций.

### 9.1.1. Эволюция причин инфекции

Профилактическое использование антибиотиков и противовирусных препаратов в рамках сопроводительной терапии острых лейкозов привело к изменению спектра инфекций у этой группы больных. Значительно снизилось количество ранних инфекций, вызванных вирусом герпеса, *Pneumocystis carinii* и грамотрицательными микроорганизмами, в связи с применением ацикловира, триметоприма/сульфаметоксазола и пероральных фторхинолонов [2]. В результате стало прогрессивно нарастать значение грамположительных микроорганизмов и грибов. Применение H<sub>2</sub>-гистаминоблокаторов, снижающих барьерную функцию желудка, также способствовало колонизации и развитию инфекций, вызванных бактериями родов *Streptococcus* и *Staphylococcus* [13]. В исследовании, проведенном Национальным противораковым институтом США, более 63% инфекционных эпизодов в процессе проведения индукционной химиотерапии больным с острыми лейкозами было вызвано грамположительными бактериями. По данным Европейской организации по исследованию

и лечению рака (EORTC), частота документированной инфекции за счет грамположительной флоры выросла с 28 до 69%, а за счет грамотрицательной флоры, наоборот, снизилась — с 68 до 31% [9]. Различные штаммы *Streptococcus* и *Staphylococcus* (прежде всего *S. aureus* и коагулазонегативные стафилококки) в настоящее время ответственны за 70% всех первичных фебрильных эпизодов у больных с нейтропенией [9]. Появление метициллин-резистентных стрептококков, стафилококков и штаммов *E. coli*, резистентных к фторхинолонам, а также грамположительных кокков, устойчивых к ванкомицину и тейкопланину, связано не только с биологическими особенностями этих микроорганизмов, но в ряде случаев — с невольным злоупотреблением новыми, высокоэффективными антибиотиками. Эта проблема стоит еще более остро для грибковых инфекций, так как количество применяемых препаратов в этой области чрезвычайно ограничено. Резистентность *Candida albicans* к флуконазолу достигает 30%; встречаются штаммы, устойчивые к флуконазолу и даже к амфотерицину В.

Выделены штаммы вируса герпеса и ЦМВ, устойчивые к ацикловиру и ганцикловиру соответственно. Для больных, инфицированных такими устойчивыми вирусами, препаратом выбора становится фоскарнет.

Увеличивается не только частота инфекций, вызываемых грибами, но и прослеживается тенденция к более раннему возникновению таких инфекций у больных острыми лейкозами. Данные Противоракового центра MD Anderson (США) говорят об увеличении не только частоты грибковых инфекций с 11 до 20% за последние годы, но и о нарастании летальности, связанной с ними с 8 до 40%. На аутопсии инфекция, вызванная грибами рода *Aspergillus* (30%) и *Candida* (58%), обнаруживается у 25% погибших больных острыми лейкозами. Особенно высока частота обнаружения грибов в посевах из крови больных с центральными катетерами, получающих парентеральное питание [4].

### 9.1.2. Заболеваемость и смертность

Инфекции, развивающиеся в индукционную фазу терапии острых лейкозов, могут быть ответственны за гибель  $\frac{2}{3}$  пациентов. В дальнейшем с инфекционными эпизодами связаны повторные госпитализации больных, удлинение срока их пребывания в стационаре и даже гибель пациентов, находящихся в ремиссии. Частота инфекционных эпизодов и связанная с ними летальность еще выше у пациентов с рефрактерными и рецидивными формами острых лейкозов. Частота инфекций у больных ОМЛ в период нейтропении колебалась от 22 до 96% (более 50% в 4 из 6 исследований) в процессе индукционной терапии и от 25 до 60% (более 50% в 3 из 4 исследований) при проведении консолидации ремиссии [2]. Летальность от инфекционных причин колебалась от 1,5 до 21,9% (в среднем 14,6%) в процессе индукции и от 0 до 17% (в среднем 5,6%) при консолидации ремиссии. Летальность была меньшей в группах детей с ОМЛ и не превышала 5%. У пациентов, получавших цитарабин в высоких дозах, тяжелые инфекции развивались, как правило, в период выраженного мукозита и длительной миелосупрессии. Частота возникновения тяжелых инфекций у больных ОЛЛ колебалась от 30 до 100% во время индукции, уменьшалась в период консолидации ремиссии (от 34 до 75%; менее 50% в 3 из 5 исследований) и была достоверно меньшей у детей. Летальность, связанная с инфекцией, составила у взрослых больных в среднем 5,8% (более 10% в 3 из 12 исследований) в фазе индукции и 2,8% в фазе консолидации ремиссии. В детской популяции эти цифры составили 2,2 и 0,5% соответственно. Инфекция, вызванная *Pneumocystis carinii*, редко встречалась у детей, независимо от фазы лечения. Пациенты, у которых инфекционный синдром представлен на момент установления диагноза, имеют достоверно худший прогноз.

### 9.1.3. Фебрильная нейтропения

Учитывая наличие стероидов в программном лечении больных острыми лейкозами, которые маскируют симптомы воспаления в индукционной фазе лечения, когда риск инфекционных осложнений максимальный, часто затруднительно однозначно высказаться о причинах субфебрилитета и недомогания у пациента. Началом инфекционного синдрома у больного с нейтропенией IV степени, требующего проведения антибиотикотерапии, может считаться подъем температуры тела выше  $37,7^{\circ}\text{C}$  и сохранение ее на этом уровне в течение одного часа или однократный подъем температуры тела выше  $38^{\circ}\text{C}$  [8]. Инфекционный синдром сопровождается тахикардией, нарушением периферического сосудистого тонуса (белое пятно при надавливании на ногтевую пластинку сохраняется более 3 с), спутанностью сознания, уменьшением диуреза, снижением артериального давления. В ряде случаев у больных может наблюдаться гипотермия с гемодинамическими нарушениями. Локализованная эритема и/или уплотнение кожи (слизистых) являются подозрительными на инфекцию даже при отсутствии лихорадки. Любые боли и дискомфорт в грудной клетке, животе, проекции придаточных пазух носа должны подвергаться углубленному обследованию на предмет возможных инфекций. Особое внимание следует обращать на места входа центральных катетеров. При появлении болезненности или гиперемии в этих областях необходимо провести бактериологическое и рентгенологическое обследование. Подробно порядок обследования больных с фебрильной нейтропенией представлен в табл. 9.3.

Таблица 9.3

#### Порядок обследования больных с фебрильной нейтропенией

Метод исследования	Параметр
Сбор анамнеза	Наличие бактериальной, грибковой или вирусной инфекции
Обследование	Артериальное давление, ЧСС, частота дыхания. Осмотр полости рта, кожи, промежности, мест стояния катетеров
Лабораторные тесты	Общий анализ крови (абсолютное число лейкоцитов, моноцитов, нейтрофилов и тромбоцитов, уровень гемоглобина), анализ мочи, АСТ/АЛТ, ЛДГ, билирубин, мочевины, креатинин, альбумин
Рентгенологическое обследование	Рентгенография грудной клетки (две проекции), придаточных пазух носа (если есть боль, выделения из носовых ходов)
Микробиологическое исследование	Двукратный с интервалом в 30–60 мин посев из крови (венозного катетера). При наличии 2-просветного катетера посева берутся раздельно из каждого просвета. Посев кала, мочи, раневого отделяемого при наличии клинических симптомов поражения этих органов и систем
Разное	Компьютерная томография, ультразвуковое исследование показано, в случаях, когда имеется подозрение на грибковую этиологию (легкие, брюшная полость, головной мозг)

Принятые сокращения: ЧСС — частота сердечных сокращений, АСТ — аспаргатаминотрансфераза, АЛТ — аланинаминотрансфераза.

#### 9.1.4. Бактериальные инфекции

Как отмечалось выше, сепсис у больных острыми лейкозами, вызванный грамотрицательными организмами, в настоящее время наблюдается реже, чем в прошлом. Однако течение его крайне неблагоприятно, особенно если патологическим агентом является *Pseudomonas aeruginosa*, и ассоциировано с картиной шока, острой почечной недостаточностью, пневмонией и инфекцией мягких тканей. Сепсис, вызываемый грамположительными организмами, в целом имеет менее фатальное течение. Исключение составляют инфекции, вызванные альфа-гемолитическим стрептококком, *Streptococcus viridans*, сопровождающиеся респираторным дистресс-синдромом взрослого типа, септический шок, вызванный *Staphylococcus aureus*, и некротизирующие инфекции мягких тканей, связанные со *Streptococcus pyogenes* [2, 14]. В большинстве случаев инфекции, вызванные грамположительными микроорганизмами, связаны с использованием центральных и периферических катетеров и могут осложняться пневмонией и эндокардитом. Анаэробные инфекции встречаются в 5–10% случаев и проявляются, прежде всего, перитонитом, некротизирующим гингивитом, стоматитом и инфекциями мягких тканей, включая перианальный целлюлит [3]. Известны случаи молниеносного сепсиса, вызванного *Clostridium perfringens* и сопровождающегося внутрисосудистым гемолизом. Продуцирующий токсин анаэроб *Clostridium difficile* способен вызывать поражение толстой кишки вплоть до некротизирующего колита.

#### 9.1.5. Грибковые инфекции

Наиболее часто грибковая инфекция у больных острыми лейкозами вызывается *Candida albicans*, которая, являясь представителем нормальной флоры кожи и кишечника, в условиях нейтропении и мукозита размножается и колонизирует слизистые оболочки, дыхательные пути, мочеполовой тракт. Тщательное наблюдение за флорой, колонизирующей кожу и

слизистые, позволяет правильно подобрать профилактику и выработать программу лечения инвазивного кандидоза [4, 8]. Поражение слизистой полости рта и пищевода — наиболее распространенная форма неинвазивного кандидоза. Эзофагит диагностируется при наличии у больного ретростернальных болей, усиливающихся при глотании. При этом чаще всего поражается дистальная часть пищевода. Выделение *Candida spp.* из мочи и венозного катетера на фоне нейтропении является показанием к назначению противогрибковой терапии.

Кандидемия — наиболее тяжелая форма инфекции, которая характеризуется высокой лихорадкой, не отвечающей на антибиотики широкого спектра действия, некротическим поражением кожных покровов (вызванным грибковыми эмболами), миалгиями, респираторным дистресс-синдромом, а также поражением внутренних органов (висцеральный инвазивный кандидоз), прежде всего печени, селезенки, глаз и легких. Без лечения эта форма кандидоза всегда ведет к гибели больного. Терапия должна быть начата непосредственно после выделения *Candida spp.* из крови или до получения результатов гемокультуры при наличии характерных клинических проявлений у больных с нейтропенией. Серьезным осложнением является развитие хронического системного кандидоза, который часто наблюдается у больных, продолжающих лихорадить и после восстановления количества нейтрофилов в периферической крови [2]. Диагноз ставится на основании наличия персистирующей лихорадки, устойчивой к антибиотикам, высокого лейкоцитоза, повышения уровня ЩФ и гамма-глутаминтрансферазы в сыворотке крови, болей в животе и характерной ультразвуковой картины поражения паренхиматозных органов.

Грибы рода *Aspergillus* не относятся к нормальной флоре человека и колонизируют пациента в процессе терапии. Учитывая воздушно-капельный путь передачи инфекции, колонизация слизистых верхних дыхательных путей предшествует инвазивной инфек-

ции и может быть выявлена при проведении повторных микробиологических исследований. Ремонтные и восстановительные работы в клинике или в непосредственной близости от медицинского учреждения при отсутствии изолирующей вентиляции ведут к нарастанию частоты колонизации и инвазивного аспергиллеза. Гематогенная диссеминация встречается редко и только у больных, находящихся в состоянии глубокого иммунодефицита. В основном для аспергиллеза характерны локальные инвазивные формы, прежде всего, с поражением придаточных пазух носа и легких. Инвазивный бронхолегочный аспергиллез может проявляться в виде солитарной или множественных аспергиллем округлой формы с нечеткими контурами и очагом распада по периферии или в центре. Инфильтраты с нечеткими контурами, возникнув в период нейтропении, постепенно превращаются в аспергиллемы округлой формы, окруженные воспалительным валом, по мере восстановления количества лейкоцитов у больного. Часто поражения легочной ткани ассоциированы с плевритом. Кровохарканье — один из важных, часто первых симптомов инвазивного аспергиллеза, особенно у больных, получающих стероиды, которые нивелируют общевоспалительные реакции.

Другие инфекции, вызываемые грибами рода *Fusarium*, *Cryptococcus* и *Histoplasma*, встречаются значительно реже и протекают по типу диссеминированных поражений.

### 9.1.6. Вирусные инфекции

Тяжелые вирусные инфекции не характерны для больных острыми лейкозами, получающих программное лечение, не включающее ТГСК. Проблемой является тяжелый затяжной мукозит, возникший в процессе проведения химиотерапии. Согласно данным культуральных и морфологических исследований, в ряде случаев он ассоциирован с герпесвирусной инфекцией, и в его лечении с успехом могут быть приме-

нены противовирусные препараты, такие как ацикловир и фоскарнет.

### 9.1.7. Интерстициальная пневмония

Интерстициальная пневмония — относительно редкое, но грозное осложнение. Нередко она развивается на этапе поддерживающей терапии ОЛЛ метотрексатом, 6-меркаптопурином и у пациентов с резистентными формами болезни, получающими вторую и последующие линии химиотерапии. *Pneumocystis carinii*, *Legionella* и различного рода вирусы, прежде всего ЦМВ, — наиболее часто встречающиеся инфекционные агенты [13]. Для этого заболевания характерно подострое течение с нарастанием одышки, признаков дыхательной недостаточности при бедной аускультативной картине и, часто, отсутствии лихорадки. На рентгенограммах грудной клетки видны усиление интерстициального рисунка и облаковидные инфильтраты, преимущественно в базальных и прикорневых областях. В крови снижено парциальное давление кислорода, а, следовательно, нарушается периферическая сатурация тканей. Терапия включает в себя антибиотики широкого спектра действия, противогрибковые (активные против *Candida*) и противовирусные (активные против ЦМВ) препараты. Используются стероиды в дозе 1 мг/кг коротким курсом — до 3–5 дней.

### 9.1.8. Терапия инфекций

#### Монотерапия

Эмпирическая антибиотикотерапия направлена, прежде всего, на грамотрицательные микроорганизмы, хотя спектр действия ряда современных антибиотиков включает и кокковую флору. Основная группа монотерапии — бета-лактамы антибиотики, включающие полусинтетические пенициллины в комбинации с ингибиторами лактамазы, цефалоспорины третьего и четвертого поколения и имипенемы, а также активные против наиболее опасного представителя грамотрицательных микроорганизмов — *Pseudomonas aeruginosa*.

sa. К сожалению, около 25% штаммов стафилококков и энтерококков резистентны к этим антибиотикам. Внутривенная монотерапия показана на начальном этапе нейтропении больным из группы стандартного риска по развитию инфекций (табл. 9.4), если пероральный прием антибиотиков невозможен в связи с развитием мукозита [3, 8]. Эффективность монотерапии колеблется от 48 до 88%. В 16–48% случаев требуется модификация антибиотикотерапии в связи с ее неэффективностью. Окончательный выбор антибиотика для монотерапии зависит от эпидемической ситуации в отделении, результатов плановых бактериальных посевов у пациента, ожидаемой длительности нейтропении и тяжести инфекции. В ряде работ последних лет в первой линии эмпирической терапии предлагается использовать имипенемы (карбопенем, имипенем) в связи с более высокой эффективностью, сравнимой с комбинированной терапией. Однако, учитывая высокую стоимость подобной терапии, ее неабсолютную эффективность и проблему развития резистентности микроорганизмов, данный подход требует углубленного изучения, прежде чем может быть рекомендован для внедрения в широкую клиническую практику.

Таблица 9.4

## Группы риска по развитию инфекций

Фактор	Инфекционный риск	
	стандартный	высокий
Нейтропения	$>0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ $<0,5 \cdot 10^9/\text{л}, < 8$ дней	$<0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ $<0,5 \cdot 10^9/\text{л}, > 8$ дней
Мукозит	I–III стадии	IV стадия
Лейкоз	Хороший ответ на индукцию	Острый лейкоз Плохой ответ на индукцию
Лечение	Стандартные дозы	Высокие дозы
	Первая линия терапии	Трансплантация ГСК
	Поддерживающая терапия	

## Комбинированная терапия

Синергизм, наблюдаемый при добавлении к бета-лактамам антибиотикам аминогликозидов (гентамицин, канамицин, амикацин), является обоснованием применения комбинированной терапии двумя антибиотиками в различных сочетаниях. Такая терапия в настоящее время считается «золотым стандартом» для больных с нейтропенией из группы высокого риска по развитию инфекций и в тех случаях, когда монотерапия неэффективна. Существенно упрощает лечение возможность вводить аминогликозиды один раз в день без снижения эффективности. Напротив, цефтриаксон, также применяемый однократно, не является препаратом выбора в связи с отсутствием активности против *Pseudomonas aeruginosa* [9]. Описаны комбинации цефалоспоринов третьего поколения и полусинтетических пенициллинов. Однако подобный подход не может быть рекомендован в центрах, где определяется флора, продуцирующая бета-лактамазу (*Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*). Вместе с тем она не защищает больного от анаэробов и большинства грамположительных микроорганизмов. В целом для признания эмпирической монотерапии или комбинированной терапии эффективными процент успеха должен быть не меньше 70% в отношении грамотрицательных микроорганизмов. В противном случае требуется пересмотр схемы терапии с учетом результатов бактериологических исследований.

## Гликопептиды (ванкомицин и др.) в лечении инфекций

Бета-лактамы антибиотиками и аминогликозидами частично эффективны в отношении грамположительных штаммов, но не покрывают в полной мере весь их спектр. В связи с этим некоторые авторы предлагали добавлять в эмпирическую терапию гликопептиды (ванкомицин). В ряде клинических исследований было показано преимущество добавления ванкомицина в первую линию терапии. Однако, принимая во

внимание, что инфекция, вызываемая грамположительными микроорганизмами, редко ведет к быстрому ухудшению состояния больного, хорошо отвечает на терапию и составляет всего 5% всей инфекционной летальности больных с нейтропенией, а также учитывая высокую токсичность гликопептидов, в настоящее время не может быть рекомендовано включение ванкомицина или тейкопланина в первую линию эмпирической терапии [7]. Исключением являются ситуации, когда в клинике имеется необычно высокий процент инфекций, вызываемых метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans*, когда у больного первично развивается картина септического шока, имеется ассоциированная с катетером гнойная инфекция и сепсис возникает на фоне профилактического использования фторхинолонов или связан с эрозивно-язвенным стоматитом после применения высоких доз цитарабина. При наличии ванкомицинрезистентных штаммов препаратами выбора являются тейкопланин и линезолид, а в качестве альтернативы могут рассматриваться высокие дозы ампициллина (250–300 мг/кг), комбинации его с ингибиторами бета-лактамазы и комбинация хлорамфениколов (левомецетин) с аминогликозидами. Тейкопланин является альтернативой ванкомицину при наличии у больного признаков почечной токсичности или почечной недостаточности.

#### Причины неэффективности терапии инфекций

В одном из первых исследований причин неэффективности терапии инфекции у больных острыми лейкозами, проведенным Институтом Dana Farber (США), выявлена прямая связь летальности с ранним развитием (менее 10 дней от начала химиотерапии) лихорадки при глубокой нейтропении, возрастом больных и появлением у них пневмонии в первые две недели терапии. Летальность увеличивалась с 9% в контрольной группе до 39 и 64% соответственно, если

у пациента имелись два или три вышеназванных фактора одновременно ( $p < 0,001$ ). В другом исследовании, объединяющем 909 эпизодов бактериемии у 799 больных с нейтропенией, выживаемость была достоверно хуже в группе, где отмечался один из следующих неблагоприятных факторов: систолическое артериальное давление ниже 90 мм рт. ст., выделение в культуре от больного *Pseudomonas*, *Clostridium* или полирезистентного штамма и низкий уровень альбумина в сыворотке крови. К неблагоприятным факторам, существенно увеличивающим летальность от инфекций, относится также развитие инфекции мягких тканей с некрозом или без такового.

#### Модификация эмпирической антибиотикотерапии

После начала эмпирической терапии состояние больного должно оцениваться ежедневно (табл. 9.5). При ухудшении клинического состояния больного требуется интенсификация терапии и смена антибиотиков. Ключевым моментом является оценка эффективности антибиотикотерапии на 3-й день от ее начала. Если к этому дню у больного отсутствует лихорадка, результаты бактериологических посевов негативны, а нейтропения имеет тенденцию к разрешению (больные из группы стандартного риска развития инфекции), пациент может быть переведен на терапию пероральными антибиотиками или ему назначается монотерапия длительностью до 5–7 дней, если нейтропения не разрешилась, или до 48 ч, если количество нейтрофилов — более  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ . Если лихорадка сохраняется, то терапию продолжают в течение не менее 5–7 дней и модифицируют ее только в зависимости от результатов бактериологических посевов или при ухудшении состояния больного с нарастанием интоксикации [6]. Сохранение лихорадки без существенных изменений в состоянии и самочувствии больного не является достаточной причиной ни для смены схемы антибиотикотерапии, ни для добавле-

**Схема модификации антибиотикотерапии больных в зависимости от клинических и бактериологических данных**

Состояние	Модификация терапии
Септический шок	<i>Антибиотики (добавить/поменять)</i> а) имипенем + ванкомицин <i>Противогрибковые (добавить)</i> а) амфотерицин В или б) флуконазол
Ассоциированная с использованием катетера инфекция	В зависимости от результатов бактериологического исследования Если <b>грамположительная флора</b> (добавить) а) ванкомицин <b>Другие бактерии</b> а) антибиотики по результатам посевов (добавить/поменять) <b>Грибы</b> а) амфотерицин В или б) флуконазол ( <i>Candida spp.</i> ) Удаление катетера, если прогрессирование инфекции или развитие флегмоны, сепсис, грамотрицательная флора в посевах

Таблица 9.5 (продолжение)

Состояние	Модификация терапии
Пневмония	Рекомендуется получить материал для микробиологического исследования (лаваж, мокрота, пункция плевральной полости или легкого, биопсия). Обязателен рентгенологический контроль. <b>Инфильтративные тени</b> а) единичные, стабильные. Оставить прежнюю терапию или добавить ванкомицин; б) увеличивающиеся в размерах и количественно. Добавить ванкомицин и амфотерицин В; в) диффузные, интерстициального характера. Добавить триметоприм/сульфаметоксазол + эритромицин
Псевдомембранозный энтероколит ( <i>Clostridium difficile</i> )	<i>Антибиотики (добавить)</i> а) метронидазол 20 мг/кг <i>per os</i> или внутривенно или б) ванкомицин <i>per os</i>
Анаэробная инфекция	<i>Антибиотики (добавить/поменять)</i> а) имипенем или б) метронидазол

ния ванкомицина. Схема терапии изменяется через 5–7 дней в зависимости от состояния гемопоэза, клинических, бактериологических и эпидемиологических данных. Однако в подавляющем большинстве случаев к терапии добавляется ванкомицин и противогрибковые препараты [7, 12]. Амфотерицин В в качестве эмпирической терапии назначается в дозе 0,5–1,0 мг/кг/сут до разрешения нейтропении или нормализации температуры тела либо в случае, если у больного будет доказана негрибковая этиология инфекционного процесса. Если ванкомицин использовался в первой линии терапии, то после 5–7 дней применения он может быть отменен, так как инфекция, вызванная грамположительной флорой, маловероятна [14].

#### Септический шок и интенсивная терапия

Септический шок — чрезвычайно грозное осложнение с высокой летальностью. Основные повреждающие факторы, вызывающие его: циркуляция в крови эндотоксинов или экзотоксинов, нарушения в свертывающей системе крови, потеря форменными элементами крови реологических свойств, парез сосудистой стенки венул, изменение проницаемости капилляров и метаболический ацидоз. Это состояние диагностируется при снижении систолического артериального давления более чем на 40 мм рт. ст. а диастолического — на 20 мм рт. ст. и более, требующее назначения прессорных аминов. У больных наблюдается олигоанурия, тахикардия, острая сердечная недостаточность, динамическая кишечная непроходимость, респираторный дистресс-синдром с отеком легких, нередко — спутанность или потеря сознания и судороги [14].

Основные мероприятия интенсивной терапии направлены на предупреждение или лечение септического шока у больных и включают в себя назначение/смену антибиотиков, поддержание насыщения периферической крови кислородом на уровне

не ниже 95%, инфузионную терапию под контролем центрального венозного давления и почасового диуреза, применение прессорных аминов (допамин, добутамин), коррекцию ацидоза, адекватное энергетическое и пластическое обеспечение. Специфическая терапия должна включать антибиотики, направленные на грамотрицательную флору, в частности *Pseudomonas aeruginosae* (бета-лактамы, аминогликозиды, имипенемы), грамположительную флору (ванкомицин) и анаэробные бактерии. При снижении уровня сатурации ниже 90%, появлении признаков дыхательной недостаточности и нарастании одышки больному показана интубация и перевод на искусственную вентиляцию легких в режиме положительного давления в конце выдоха. Инфузионная терапия и парентеральное питание проводятся высокомолекулярными растворами коллоидов (10% человеческий альбумин из расчета 1 г/кг массы тела больного) и гиперосмолярными растворами кристаллоидов (20% раствор декстрозы, растворы аминокислот) из базового расчета 2000–2500 мл/м<sup>2</sup>/сут. Допускается применение 5 и 10% растворов декстрозы (не более 1/4 объема суточной инфузии) под контролем диуреза, массы тела больного и при отсутствии признаков отека легких. При наличии геморрагического синдрома, в частности, желудочно-кишечного кровотечения, нередко сопровождающего синдром септического шока, больному показана трансфузия свежзамороженной плазмы из расчета 15 мл/кг массы тела больного. Допамин в дозах 1–3 мкг/кг/мин стимулирует бета-адренорецепторы, дофаминовые рецепторы и способен улучшить почечный кровоток, обладает положительным хронотропным и инотропным действием, существенно не влияя на системное артериальное давление. В дозах 5 мкг/кг/мин и более допамин вызывает стимуляцию альфа-адренорецепторов и способствует повышению сниженного артериального давления, однако приводит к централизации кровообращения и ухудшению почечного кровообра-

ка. Добутамин по химическому строению сходен с допамином, но в терапевтических дозах избирательно стимулирует только бета-адренорецепторы и не оказывает выраженного действия на системное артериальное давление и почечный кровоток. Энергетическое питание должно назначаться из расчета 15 г/кг глюкозы в сутки в сочетании с 0,5–1 г/кг аминокислот. Общая калорийность парентерального питания — 40–50 ккал/кг/сут. Поддержание адекватного диуреза (не менее 0,7 мл/кг/ч) обеспечивается петлевыми диуретиками. Роль глюкокортикоидов в лечении септического шока остается противоречивой. Идеальный антибиотик для эмпирической терапии должен обладать широким спектром действия вне зависимости от уровня нейтрофилов в периферической крови, низкой токсичностью, не индуцировать резистентность микроорганизмов и недорого стоить. Такого препарата на настоящий момент не существует. Альтернативно предложен ряд высокоэффективных комбинаций, базирующихся на проведенных исследованиях при лечении фебрильной нейтропении (табл. 9.6).

Если у больного развиваются признаки септического шока, в качестве основных причинных микроорганизмов необходимо рассматривать *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus viridans*, альфа-гемолитический стрептококк, стафилококки. Диссеминированный кандидоз также может явиться причиной ухудшения состояния больного на массивной антибиотикотерапии первой линии. В данной ситуации цефтазидим (если использовался в первой линии) должен быть заменен на имипенемы или бета-лактамы антибиотики, комбинированные с ингибиторами лактамазы. Ванкомицин и противогрибковые препараты должны быть добавлены ко второй линии эмпирической терапии в зависимости от клинической картины. Выраженный язвенный мукозит с некрозами на слизистой полости рта подозрителен в отношении развития суперинфекции анаэробами и часто ассоциирован с реактива-

Таблица 9.6  
Рекомендации по назначению эмпирической внутривенной антибиотикотерапии у больных с фебрильной нейтропенией

Терапия/группа риска	Стандартный риск: пероральные антибиотики, нет потребности в госпитализации	Высокий риск: пероральные антибиотики не эффективны или не могут быть назначены
Монотерапия (средний риск, нет осложнений)	Терапия двумя препаратами (высокий риск, осложнения, неэффективная монотерапия)	Терапия двумя препаратами (высокий риск развития грамположительной инфекции)
Цефалоспорины	Аминогликозиды + бета-лактамы	Цефалоспорины + ванкомицин
а) цефтазидим 100 мг/кг/сут	а) амикацин 15 мг/кг/сут + пиперациллин	40 мг/кг/сут
б) цефепим 30 мг/кг/сут	Аминогликозиды + цефалоспорины	Карбопенемы + ванкомицин
Бета-лактамы/ингибиторы лактамазы	а) амикацин + цефтазидим, цефепим	
а) пиперациллин/тазобактам 300–400 мг/кг/сут по пиперациллину	Аминогликозиды + карбопенемы	
Карбапенемы	Терапия двумя препаратами + ванкомицин (тейкопланин 6–10 мг/кг/сут — альтернатива ванкомицину)	
а) меропенем 45–60 мг/кг/сут		

цией герпесвирусной инфекции. Больные с колитом, инфекцией в перианальной области или брюшной полости должны получать активную в отношении анаэробов терапию меронемом, клиндамицином или метронидазолом [2]. Доказанный псевдомембранозный колит, вызванный *Clostridium difficile*, требует назначения ванкомицина *per os* или метронидазола внутривенно.

Инфекции, ассоциированные с использованием катетера, вызванные грамположительной или грамотрицательной флорой, не требуют немедленного удаления катетера при условии проведения адекватной антибактериальной терапии. Удаление катетера показано в случаях, если инфекция вызвана *Candida*, *Aspergillus* и *Mycobacterium spp.* При наличии инфильтратов в легких, которые постепенно разрешаются по мере восстановления в периферической крови количества нейтрофилов, а состояние больного улучшается, разумно сохранить ранее назначенную эмпирическую терапию. При нарастании инфильтративных изменений в легких и/или при отсутствии признаков восстановления количества нейтрофилов показано назначение амфотерицина В и/или ванкомицина. При наличии интерстициального компонента показано добавление к терапии антибиотиками широкого спектра действия триметоприма/сульфометоксазола (длительностью не менее 2 нед.) и макролидов (длительностью не менее 3 нед.).

#### Длительность антибиотикотерапии

При определении длительности применения антибактериальных препаратов в качестве критерия используется сохранение у больного лихорадки и отсутствие восстановления в периферической крови количества нейтрофилов. Лечение может быть прервано у пациентов из группы низкого риска по развитию инфекции при условии восстановления уровня нейтрофилов  $> 0,5 \cdot 10^9/\text{л}$  через 48 ч после нормализации температуры тела [14]. При сохранении тяжелой ней-

тропении, наличии гемодинамических нарушений или тяжелого мукозита антибиотикотерапия должна продолжаться, по меньшей мере, 10–14 дней (не менее 5–7 дней после нормализации температуры тела) [2]. С диагностической целью можно отменить антибиотики у лихорадящего больного со стабильным уровнем нейтрофилов  $> 0,5 \cdot 10^9/\text{л}$  в течение не менее 5 дней при отсутствии у него гемодинамических нарушений.

#### Противогрибковая терапия

До появления менее токсичных производных азола амфотерицин В долгое время оставался единственным противогрибковым препаратом. В настоящее время обладающие данные получены при анализе результатов использования в качестве эмпирической терапии флуконазола. При сравнении флуконазола и амфотерицина В эффективность терапии колебалась от 56 до 75% для флуконазола против 46–66% для амфотерицина. Назначение флуконазола длительно лихорадящим больным, имеющим нейтропению, у половины из них улучшает течение периода аплазии и самочувствие [4].

Локальная инфекция, вызванная *Candida spp.*, на слизистых у больных вне аплазии кроветворения хорошо поддается терапии клотримазолом, нистатином, флуконазолом или амфотерицином В в ингаляциях, полосканиях или при приеме *per os*. Пациентам в состоянии аплазии с выраженным эрозивно-язвенным поражением слизистых показана системная терапия амфотерицином В или флуконазолом [2]. Для лечения диссеминированного, почечного и других висцеральных форм кандидоза препаратами выбора являются амфотерицин В в дозе 1,0 мг/кг/сут или флуконазол в дозе 8–10 мг/кг/сут. В ретроспективных и проспективных исследованиях эти препараты показали одинаковую эффективность как у больных с нейтропенией, так и в случаях нормального гемопоэза, при использовании в максимальных терапевтических дозах (64 против 66% в ретроспективных и 71 против 73% в про-

спективных исследованиях). Проведенные исследования свидетельствуют, что флуконазол может быть использован в первой линии эмпирической противогрибковой терапии, если только у больного не выделена *Candida krusei*.

Документированная инфекция, вызванная *Aspergillus spp.*, также поддается терапии амфотерицином В в дозе 1,0–1,25 мг/кг/сут в течение не менее 10–14 дней. Новый препарат для лечения аспергиллеза — интраконазол, но его переменная биодоступность затрудняет точный расчет дозы. При наличии аспергиллем показано их хирургическое лечение.

## 9.2. Геморрагический синдром

Аномалии свертывающей системы чаще встречаются при ОМЛ и значительно реже — при ОЛЛ [5]. У больных наблюдается гипофибриногенемия, увеличение количества продуктов деградации фибрина, уменьшение С-протеина и антитромбина, удлинение протромбинового времени. Нарушения гемостаза носят комплексный характер и приводят к развитию ДВС-синдрома.

Кровоизлияние в ЦНС или другие проявления тяжелого геморрагического синдрома обычно сопровождаются снижением артериального давления, уровня гемоглобина, появлением спутанности сознания и очаговой симптоматики. Пациентам рекомендована КТ или МРТ ЦНС в максимально короткие сроки. Спинномозговая пункция не обязательна. Терапия заключается в трансфузиях тромбоцитов, факторов свертывания. При выраженном анемическом синдроме переливается эритроцитная масса из расчета 10 мл/кг массы тела больного. Параллельно проводится дегидратационная терапия.

Наиболее часто тяжелый геморрагический синдром встречается в процессе проведения индукции у больных ОПЛ (ОМЛ М3). Наиболее опасен в этом отношении микрогранулярный вариант ОМЛ (М3v),

особенно сочетающийся с выраженным лейкоцитозом. До введения в клиническую практику третиноина геморрагический синдром был основной причиной летальности в период проведения индукции [5]. В проспективном многоцентровом исследовании 1984–1987 гг. 37 из 268 больных с ОМЛ М3 (14%) погибли от кровотечения. Уже первые клинические исследования по применению третиноина показали возможность достижения полной гематологической ремиссии без выраженной гипоплазии костного мозга при уменьшении частоты и тяжести геморрагического синдрома. Третиноин влияет на терминальную дифференцировку промиелоцитов. Количество прокоагулянтов, выделяемых бластами, резко снижается и не формируется ДВС-синдром. Применение третиноина способствовало снижению на 5–6% летальности от кровотечений при проведении индукции ремиссии. И в настоящее время летальность, связанная с геморрагическим синдромом, у больных ОМЛ М3, получающих различные схемы химиотерапии в комбинации с третиноином, колеблется от 2,4 до 6,5%. При терапии третиноином примерно у 14% пациентов может возникать так называемый синдром ретиноевой кислоты, который характеризуется болями в костях, мышцах, грудной клетке и за грудиной, полисерозитами, формированием респираторного дистресс-синдрома взрослого типа и гипотензией. В лечении этого синдрома ведущую роль играют дексаметазон в дозе 0,5–1 мг/кг/сут и инфузия солевых растворов из расчета 2000–2500 мл/м<sup>2</sup>.

Терапия геморрагического синдрома включает в себя прежде всего адекватную поддержку донорскими тромбоцитами и факторами свертывания. Трансфузия донорских тромбоцитов позволила достоверно снизить частоту развития угрожающих жизни кровотечений у пациентов с острыми лейкозами. К сожалению, в настоящее время не существует единого мнения по поводу уровня тромбоцитов, необходимого для профилактики и терапии геморрагического синдро-

ма. Ранние исследования свидетельствовали об увеличении риска кровоточивости у больных с уровнем тромбоцитов  $< 20,0 \cdot 10^9/\text{л}$ , однако в этих исследованиях тромбоцитопения рассматривалась изолированно, без учета других факторов, влияющих на гемостаз. Пациенты с выраженным инфекционным синдромом или с клинически значимой кровоточивостью требуют поддержания тромбоцитов на более высоком уровне и, следовательно, большего количества их трансфузий. Необходимость профилактических трансфузий тромбоцитов была подтверждена в целом ряде рандомизированных исследований. Среди 255 больных ОМЛ тяжелый геморрагический синдром наблюдался в 21% случаев при уровне тромбоцитов менее  $10,0 \cdot 10^9/\text{л}$  (менее  $20,0 \cdot 10^9/\text{л}$  у пациентов с активным кровотечением или инфекцией) и только в 5,2% — при уровне тромбоцитов более  $30 \cdot 10^9/\text{л}$ . При ОМЛ М3 потребность в трансфузиях тромбоцитов выше. Уровнем тромбоцитов, обеспечивающим существенное снижение осложнений, считается  $20,0 \cdot 10^9/\text{л}$  для больных без геморрагического синдрома и не менее  $50,0 \cdot 10^9/\text{л}$  для пациентов с активным кровотечением или инфекцией. Рекомендации по трансфузиям тромбоцитов больным с острыми лейкозами представлены ниже.

#### Рекомендации по трансфузиям тромбоцитов больным острыми лейкозами

##### *Острый промиелоцитарный лейкоз*

- Активное кровотечение или в процессе индукционной терапии  
Тромбоциты — менее  $50,0 \cdot 10^9/\text{л}$  (трансфузии, как правило, дважды в день)
  - Стабильное состояние  
Тромбоциты менее  $20,0 \cdot 10^9/\text{л}$
- Другие варианты ОМЛ*
- Активное кровотечение, температура тела выше  $38^\circ\text{C}$ , инвазивные манипуляции  
Тромбоциты — менее  $20,0 \cdot 10^9/\text{л}$
  - Стабильное состояние  
Тромбоциты — менее  $10,0 \cdot 10^9/\text{л}$

Тромбоциты содержатся в так называемой тромбоплазме — препарате крови, полученном от донора после разделения цельной крови на фракции. Продукт отличается невысоким содержанием тромбоцитов ( $0,3+0,5 \cdot 10^{11}/\text{доза}$ ) и высоким уровнем контаминации лейкоцитами. Для поддержания адекватного уровня тромбоцитов в крови больному требуется переливание 3–6 доз тромбоплазмы от разных доноров одновременно (из расчета 1 доза/10 кг массы тела больного). Это существенно увеличивает риск аллоиммунизации и формирования рефрактерности к переливанию тромбоцитов, риск побочных реакций на повторные трансфузии и заражения инфекциями, передающимися через кровь.

Тромбоконцентрат, полученный на сепараторе крови от одного донора, содержит в среднем  $2,5+4,0 \cdot 10^{11}$  тромбоцитов в одной дозе и обеспечивает потребности больного любой массы тела. Он значительно беднее лейкоцитами, что позволяет снизить риск аллоиммунизации. С этой же проблемой призваны бороться такие методы лейкоцитарной деплеции, как облучение продуктов крови ионизирующим излучением, ультрафиолетом, применение лейкоцитарных фильтров. Тромбоконцентрат, приготовленный на некоторых сепараторах, в которых предусмотрены встроенные лейкоцитарные ловушки, изначально содержит малое количество лейкоцитов (менее  $1,0 \cdot 10^6/\text{л}$ ) и не требует применения других методов лейкоцитарной деплеции.

Поддержание уровня факторов свертывания — необходимое звено в комплексной терапии геморрагического синдрома. Трансфузии свежзамороженной плазмы осуществляются из расчета не менее 15–20 мл/кг массы тела больного ежедневно при наличии у него признаков кровотечения или при снижении уровня фибриногена. Трансфузии криопреципитата или очищенных отдельных факторов свертывания наиболее выгодны с точки зрения малого объема и возможности прицельной коррекции, но пока не по-

лучили широкого распространения в России из-за их высокой стоимости.

Роль гепарина в комплексной терапии ДВС-синдрома остается противоречивой. Содержащиеся в литературе сведения о снижении летальности, связанной с геморрагическим синдромом, в группах больных, получивших гепарин в качестве профилактики или терапии, надо интерпретировать очень осторожно, поскольку объединяют малое число наблюдений и не несут рандомизированного или контролируемого характера.

Применение ингибиторов фибринолиза и протеаз, таких как эpsilon-аминокапроновая кислота и апротинин, также не может быть рекомендовано в рутинной клинической практике. Более того, имеются сведения об увеличении риска тромбоэмболических осложнений при применении этих групп препаратов, особенно на фоне терапии третиноином.

### 9.3. Анемический синдром

Снижение уровня гемоглобина у больных острыми лейкозами наблюдается как вследствие инфильтрации костного мозга бластами, так и в результате получаемой химиотерапии. Анемия у этих больных развивается относительно медленно и переносится удовлетворительно. К симптомам, связанным с анемией, относятся повышенная утомляемость, одышка в покое или при физической нагрузке, тахикардия. Кроме того, у больных с низким уровнем гемоглобина в периферической крови резко нарушаются обменные процессы в тканях, и развивается гемическая гипоксия. Как показывают проведенные исследования, все вышеописанные симптомы развиваются у больных с анемией при уровне гемоглобина менее 7,0 г/дл [6]. Однако в индукционную фазу химиотерапии, когда у больных имеются проявления инфекционного и геморрагического синдромов, большинством центров рекомендуется поддерживать гемоглобин на уровне

8–10 г/дл. Наряду с уровнем гемоглобина необходимо учитывать выраженность клинических проявлений анемии, таких как астенический синдром, тахикардия, а также наличие инфекции или органотоксичности химиотерапии. Трансфузии эритроцитарной массы осуществляются из расчета 8–15 мл/кг со скоростью 4–8 мл/кг/ч.

Аллоиммунизация и снижение уровня тромбоцитов — наиболее значимые проблемы, связанные с переливанием эритроцитарной массы. Аллоиммунизация может быть предупреждена тщательным подбором доноров с учетом не только системы АВ0 и фенотипа резус-фактора, но и Kell, а также деплецией лейкоцитов. При массивных гемотрансфузиях наблюдается достоверное снижение уровня тромбоцитов, связанное с формированием микроагрегатов (состоящих в основном из тромбоцитов и лейкоцитов, содержащихся в эритроцитарной массе), и секвестрации тромбоцитов в селезенке. Для предупреждения осложнений, связанных с трансфузиями эритроцитарной массы, рекомендовано облучение продуктов крови в дозе 15–30 Гр или использование лейкоцитарных фильтров с порами диаметром 40 мкм.

Применение эритропоэтинов больным острыми лейкозами не показало своей эффективности в связи с длительной и глубокой аплазией, развивающейся в результате химиотерапии, а, соответственно, отсутствия клеток-мишеней для действия экзогенных и эндогенных цитокинов. Более того, имеются данные о том, что применение эритропоэтинов у больных различными формами рака может стимулировать рост опухолевых клеток и тем самым снижать безрецидивную и общую выживаемость.

### 9.4. Гиперлейкоцитоз

На момент установления диагноза уровень лейкоцитов более  $100 \cdot 10^9/\text{л}$  встречается в 9–13% детей с ОЛЛ и в 5–22% — с ОМЛ. Основные причины гибели

ли больных с гиперлейкоцитозом — кровоизлияния в ЦНС, тромбоз центрального венозного синуса, респираторный дистресс-синдром и метаболические нарушения, связанные с синдромом лизиса опухоли. Риск осложнений достоверно возрастает при уровне лейкоцитов более  $300 \cdot 10^9/\text{л}$  [10]. Симптомы, наблюдающиеся при высоком уровне лейкоцитов, включают в себя одышку, нарушение зрения и сознания, наблюдается ацидоз и гипоксия. Мероприятия по преодолению осложнений, связанных с гиперлейкоцитозом, включают в себя инфузионную терапию, борьбу с ацидозом и применение аллопуринола. Роль обменных трансфузий крови и лейкоцитафереза при гиперлейкоцитозе остается противоречивой. В нерандомизированных исследованиях лейкоцитафереза позволяли снизить риск развития синдрома острого лизиса опухоли у пациентов с ОЛЛ. Процедура удовлетворительно переносится больными, однако, как правило, не позволяет существенно снизить содержание лейкоцитов в периферической крови. У больных ОМЛ отмечалось снижение уровня лейкоцитов после сеанса не более чем на 30%, что не влияло на вероятность достижения ремиссии. Также остается недоказанной возможность снижения риска кровоизлияний в ЦНС у больных ОМЛ после лейкоцитафереза. Существенные трудности связаны с обеспечением адекватного венозного доступа у маленьких детей и применением антикоагулянта в процессе процедуры.

## 9.5. Синдром острого лизиса опухоли

Синдром острого лизиса опухоли характеризуется гиперкалиемией, гиперфосфатемией и гиперурикемией. Вторично развиваются гипокальциемия и острая почечная недостаточность. Синдром наблюдается в первые дни от начала специфической терапии. В группу риска входят больные с гиперлейкоцитозом,

повышенным на момент начала терапии уровнем мочевой кислоты и ЛДГ в сыворотке крови. Имеются данные о том, что данный синдром чаще развивается у детей старшего возраста. Это может быть обусловлено снижением с возрастом физиологической способности почек выводить мочевую кислоту. У больных с высоким риском развития синдрома лизиса опухоли особое внимание следует обратить на изменения суточного диуреза, симптомы гипокальциемии, включающие рвоту, анорексию, мышечные спазмы и фасцикуляции. Биохимические анализы включают в себя оценку уровня натрия, калия, хлоридов, кальция, фосфора, мочевины и креатинина в сыворотке крови. При повышении уровня калия в сыворотке крови требуется выполнение ЭКГ.

Терапия синдрома острого лизиса опухоли включает в себя гидратацию из расчета не менее  $3000 \text{ мл}/\text{м}^2$ . Обязательно применение раствора гидрокарбоната натрия из расчета  $50\text{--}100 \text{ ммоль}/\text{л}$  инфузионного раствора с целью поддержания pH мочи на уровне  $7,0\text{--}7,5$  и удельного веса мочи — не более 1010. При уровне pH более 7,5 формируются гипоксантин-овые конкременты, а при pH более 8,0 выпадает в осадок фосфат кальция. Инфузия гидрокарбоната натрия прекращается с началом химиотерапии. Применение аллопуринола, ингибирующего ксантиноксидазу — фермента, переводящего гипоксантин и ксантин в мочевую кислоту, существенно снижает выраженность симптомов острого лизиса. При уровне калия более  $6,0 \text{ ммоль}/\text{л}$  могут отмечаться нарушения ритма сердца на ЭКГ, расширение комплекса QRS. Необходимо немедленно прекратить поступление калия извне и начать терапию препаратами, связывающими калий (полистиролсульфонат натрия), из расчета  $1 \text{ г}/\text{кг}$  с 50% сорбитолом. Эффективно для снижения уровня калия введение кальция глюконата ( $100\text{--}200 \text{ мг}/\text{кг}$ ) и инсулина ( $1 \text{ ед}/\text{кг}$  в 20% глюкозе) [10]. Эти препараты способствуют внутриклеточному току калия и снижают его концентрацию в

плазме. Если гиперурикемия, креатининемия и симптомы острой почечной недостаточности нарастают, тогда необходим гемодиализ.

### 9.6. Гиперкальциемия

Уровень кальция в сыворотке более 3,0 ммоль/л нарушает функционирование всех систем организма, а уровень более 5,0 ммоль/л может быть опасен для жизни. Симптомы, сопровождающие гиперкальциемию, включают в себя рвоту, анорексию, развитие динамической кишечной непроходимости, аритмию, брадикардию, полиурию, гипотонию, ступор и кому.

Терапия заключается в активной гидратации и применении петлевых диуретиков. Оправдано применение стероидов в дозах 1–2 мг/кг/сут. Назначение экзогенного кальцитонина (Миокальцик®) позволяет добиться быстрого снижения уровня кальция, однако к препарату быстро развивается устойчивость. Применение бисфосфонатов (памидронат, этидронат) у взрослых позволяет полностью контролировать уровень кальция. Опыт применения данной группы препаратов в педиатрической практике ограничен, однако их эффективность несомненна.

### 9.7. Антиэметическая (противорвотная) терапия

Для контроля тошноты и рвоты, возникающих в процессе химиотерапии у детей с острыми лейкозами, рекомендовано применение антагонистов 5-НТ<sub>3</sub>-рецепторов. К ним относятся ондансетрон, гранисетрон и трописетрон. Эти препараты различаются по степени сродства к рецепторам серотонина и по длительности эффекта. Ондансетрон эффективен при назначении в дозе 0,15 мг/кг за 30–60 мин до начала химиотерапии. При химиотерапии средней эметогенности требуется применять ондансетрон 3 раза в сут-

ки. Имеются сообщения об эффективном применении препарата в дозе 0,45 мг/кг однократно в сутки. Трописетрон можно назначать однократно в сутки в дозе 5 мг или 0,2 мг/кг, учитывая его большой период полувыведения. Антиэметическое действие антагонистов 5-НТ<sub>3</sub>-рецепторов усиливается при их комбинации с дексаметазоном.

К сожалению, действие этой группы препаратов на отсроченную рвоту ограничено. Применение производных фенотиазина (хлорпромазин, этаперазин) эффективно при наличии у больного повышенной тревожности и в случае отсроченной рвоты, однако сопровождается целым рядом побочных эффектов. Частично решить эту проблему позволяет продленная инфузия малых доз производных фенотиазина. Увеличению антиэметического действия фенотиазинов, уменьшению экстрапирамидных эффектов и предупреждению развития синдрома отмен способствует назначение антигистаминных препаратов, таких как дифенилгидрамин (Димедрол®). Антагонист центральных и периферических допаминовых рецепторов — метоклопрамид (Церукал®) обладает умеренным антиэметическим действием в дозе 1–2 мг/кг на введение. Короткий период полужизни препарата диктует необходимость применять его через каждые 3–4 ч, что увеличивает риск побочных эффектов, особенно у детей. Метоклопрамид в комбинации с дифенилгидрамином и дексаметазоном наиболее эффективен для профилактики отсроченной рвоты. Другие группы препаратов, такие как производные бензодиазепина, скополамин и каннабиноиды, не имеют самостоятельного значения.

### 9.8. Терапия болевого синдрома

Мукозит и поражение костной системы — основные причины болевого синдрома у больных острыми лейкозами. Интенсивность болей столь велика, что в данном случае не оправдано применение нестероид-

ных противовоспалительных препаратов. Первой линией терапии являются морфин и его производные [11]. При наличии у больного стабильного венозного доступа рекомендовано введение препаратов в виде 24-часовой инфузии. Начальная доза морфина в этом случае составляет 0,03–0,04 мг/кг/ч. Не рекомендовано превышать суточную дозу в 2 мг/кг. Синтетический опиоид фентанил обладает в 50 раз более мощным анальгезирующим потенциалом, чем морфин. При внутривенном введении действие фентанила короче, чем других наркотических анальгетиков, в связи с высоким сродством к липидам и быстрым распределением в тканях организма. Это свойство привело к созданию новой лекарственной формы — пластыря с фентанилом, позволяющего использовать трансдермальный путь введения.

### 9.9. Парентеральное питание

Одной из важных проблем, возникающих в процессе терапии острых лейкозов, является обеспечение адекватного пищевого и витаминного статуса больного. При недостаточном питании возникают или усугубляются астения, анемический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, ацидоз, гипоальбуминемия, мышечная атрофия, удлиняется период аплазии [1]. Потеря массы тела (более 10% у детей и 5% — у взрослых) в процессе лечения неблагоприятно сказывается на результатах терапии, увеличивает летальность и снижает выживаемость. При интенсивном лечении в случае часто возникающих мукозитов обычно трудно обеспечить адекватное энтеральное питание, даже с учетом наличия на рынке сбалансированных специальных смесей и составов. Частичное или полное парентеральное питание проводится путем 24-часовой инфузии концентрированными растворами глюкозы из расчета 12–15 г/кг/сут и аминокислотами из расчета 1–2 г/кг/сут в зависимости от возраста больного (у маленьких детей с весом менее 10–15 кг суточная по-

требность в белке больше и рассчитывается индивидуально). При продолжительности парентерального питания более 10–14 дней рассматривается вопрос о назначении жировых эмульсий из расчета 2 г/кг ежедневно или через день. Суточная потребность в калориях зависит от возраста и составляет 75–90 ккал/кг для детей 1–8 лет и 30–50 ккал/кг у более старших. Калорийность на 20–30% обеспечивается за счет липидов, на 50–60% — за счет углеводов и на 10–20% — белков. Суточная потребность в электролитах составляет 2–4 ммоль/кг для натрия, 1,5–2 ммоль/кг для калия. Потребность в кальции и магнии составляет 0,15–0,2 ммоль/кг массы тела больного в сутки. Одновременно необходимо учитывать суточную потребность в витаминах, особенно группы В. К осложнениям полного парентерального питания относятся нарушения печеночных тестов (обычно возникающих после первой недели терапии) и холестаза. Особенно быстрое увеличение уровня трансаминаз и билирубина отмечается при избыточном поступлении глюкозы в организм и связано с повышенным отложением гликогена в печени. Лечение данного синдрома заключается в частичной замене глюкозы жировыми эмульсиями. Нарушение толерантности к глюкозе также относится к одному из осложнений парентерального питания.

Профилактика и лечение инфекционных осложнений, коррекция тромбоцитопении и анемии, возникающих у детей в процессе применения современных протоколов, терапия метаболических нарушений, адекватное обезболивание являются необходимым компонентом современной терапии острых лейкозов. Сопроводительная терапия позволяет не только существенно снизить летальность этой категории больных, но и значительно интенсифицировать специфическую терапию и тем самым повысить процент достижений полных ремиссий и БСВ.

## Основная литература

1. *Alexander H.R., Rickard K.A., Godshall B.* In Nutritional supportive care. 3<sup>rd</sup> ed. // Eds. P.A. Pizzo, D.G. Poplack. — Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 1997. — P. 1167–1181.
2. *Bassan A.* The management of infections in patients with leukemia. In *Leukemia*. 7<sup>th</sup> ed. // Eds. E.S. Henderson, T.A. Lister, M.F. Greaves. — Philadelphia, W.B. Saunders, 2002. — P. 297–361.
3. *Bisno A.L.* Streptococcal infections of skin and soft tissues // *N. Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 334. — P. 240–253.
4. *Bodey G.P., Anaissie E.J.* Opportunistic fungal infection. A major problem in immunocompromised patients. In *Opportunistic Fungal Infections: Focus on Fluconazole* / Eds. R.G. Richardson. — London, Royal Society of Medicine Services, 1989. — P. 1–16.
5. *Brabui T., Finnazi G., Falanga A.* Management of bleeding and thrombosis in acute leukemia and chronic myeloproliferative disorders. In *Leukemia*. 7<sup>th</sup> ed. / Eds. E.S. Henderson, T.A. Lister, M.F. Greaves. — Philadelphia: WB Saunders, 2002. — P. 363–382.
6. British Committee for Standards in Hematology: Guidelines on the clinical use of leukocyte-depleted blood components // *Transfusion Med.* — 1998. — Vol. 8. — P. 59–91.
7. *Feld R.* Vancomycin as part of initial empirical antibiotic therapy for febrile neutropenia in patients with cancer: Pros and cons // *Clin. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 35. — P. 2246–2262.
8. *Hughes W.T.* 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever // *Clin. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 25. — P. 551–572.
9. *Jones R.N.* Contemporary antimicrobial susceptibility patterns of bacterial pathogens commonly associated with febrile patients with neutropenia // *Clin. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 29. — P. 495–511.
10. *Lange B., O'Neill J.A., Goldwein J.W. et al.* In *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3<sup>rd</sup> ed. / Eds. P.A. Pizzo, D.G. Poplack. — Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 1997. — P. 1025–1049.

11. Report of the consensus conference on the management of pain in childhood cancer // *Pediatrics*. — 1990. — Vol. 86. — P. 813–832.
12. *Talcott J.A., Siegel R.D., Finberg R. et al.* Risk assessment in cancer patients with fever and neutropenia: a prospective, two center validation of a predictive rule // *J. Clin. Oncol.* — 1992. — Vol. 10. — P. 316–328.
13. *Wheeler A.P.* Treating patients with severe sepsis // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 340. — P. 207–219.
14. *Zinner S.H.* Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: Emphasis on gram-negative and resistant bacteria // *Clin. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 29. — P. 490–508.

Научно-практическое издание

# ЛЕЙКОЗЫ У ДЕТЕЙ

под редакцией

Георгия Людомировича Менткевича,  
Светланы Александровны Маяковой

Главный редактор,  
канд. мед. наук.....*Д. Д. Проценко*  
Зав. редакцией.....*Н. В. Денежкина*  
Редактор.....*Т. Л. Сологуб*  
Корректор.....*А. М. Кольцова*  
Макет, производство .....*Д. Р. Сысоев*

Подписано в печать: 19.02.2009

Формат : 84 × 108 <sup>1</sup>/<sub>32</sub>

Объем: 12 физ.п.л./13,5 авт.л.

Гарнитура: типа "антиква новая"

Бумага: мелованная

Сан. эпид. заключение

№ 77.99.60.953.Д.008765.07.07 от 25.07.2007 г.

**практическая медицина**

тел. +7(495) 324-93-29 (редакция), +7(916) 320-01-55 (производство)  
e-mail: medprint@mail.ru, tezey@post.mos.ru

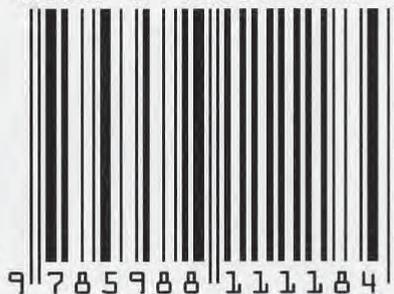
заказать с доставкой можно на сайте

[www.medprint.ru](http://www.medprint.ru)

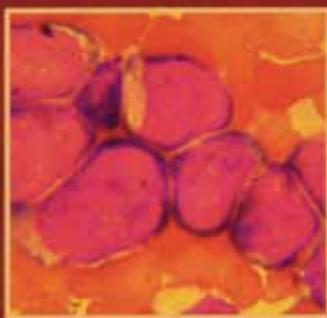
Отпечатано в типографии:



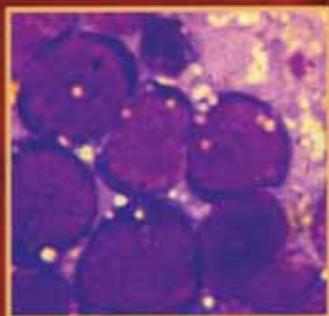
ISBN 5-98811-118-1



Тираж 1 500. Заказ № 3968



- Лабораторная диагностика лейкозов у детей
- Иммунодиагностика острого лейкоза
- Хромосомный анализ в диагностике и прогнозировании лейкозов у детей



- Апоптоз
- Острые лимфобластные лейкозы
- Острые миелоидные лейкозы



- Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- Сопроводительная терапия

Впервые в монографической отечественной литературе обобщены основные позиции современной диагностики (морфология, иммунофенотипирование, цитогенетика), классификации и лечения различных вариантов острых лимфоидных, миелоидных лейкозов и хронического миелолейкоза у детей. Показаны перспективы химиотерапии, трансплантации стволовых клеток крови, сопроводительного лечения для увеличения выживаемости больных.

**Для педиатров, детских гематологов и онкологов**

