

выполнено 7 больным. И уже через 1–5 дней (медиана 3 дня) после аборта всем им было начато проведение индукционной химиотерапии в полных дозах. Вопрос о родоразрешении до начала курса ХТ встает лишь на поздних сроках (35–40 нед). До начала ХТ родоразрешение было выполнено 7 больным (ОМЛ – 4, ОПЛ – 2, ОЛЛ – 1) на сроке 36–39 нед (медиана 38 нед). Всем им через 1–35 дней (медиана 7 дней) было начато проведение индукционной ПХТ в полных дозах. Если срок беременности составляет 12–34 нед, необходимо проводить ХТ, которая должна осуществляться по стандартным программам лечения ОМЛ, ОПЛ и ОЛЛ взрослых без снижения доз цитостатических препаратов. Лечение ОЛ (1–4 курса ХТ (медиана 1) на фоне беременности на сроках 14–34 нед (медиана 24 нед) выполнено 24 больным (у 13 – ОМЛ, у 3 – ОПЛ, у 8 – ОЛЛ). У 11 (45,8%) из 24 при проведении индукционного курса ХТ в полных дозах к моменту родоразрешения была достигнута полная ремиссия ОЛ. У 13 (54,2%) из 24 пациенток родоразрешение выполнялось вне ремиссии – либо по срочным показаниям на фоне продолжающегося индукционного курса ХТ или при резистентности лейкемии. У 2 больных на фоне ХТ была констатирована антенатальная гибель плода на сроке беременности 30 и 32 нед. У 12 больных – на сроке беременности 30–39 нед (медиана 36 нед) произошли

самостоятельные роды и 17 – было выполнено кесарево сечение. Один ребенок умер на фоне пневмонии в течение первой недели жизни, остальные дети живы (2 нед – 22 года) и здоровы. Нами замечен курьезный феномен, что у больных, страдающих ОМЛ чаще (83%) рождаются мальчики, а ОЛЛ – девочки (63%), причем эти различия статистически значимы ( $p = 0,01$ ). При проведении ХТ в полных дозах результаты лечения беременных с ОЛ не отличаются от таковых показателей в данной возрастной группе – по данным ГНЦ частота достижения ремиссии у этой категории больных составляет 72%. В целом, частота достижения ремиссии выше при ОМЛ и ОПЛ – 81,3% и 80%, с ранней летальностью – 6,2% и 20% и резистентностью – 2% и 0%, соответственно, чем при ОЛЛ – 60%, 20% и 20% соответственно. В настоящее время живы 14 (36,8%) из 38 наших больных; период наблюдения от 4 нед до 13 лет.

**Заключение.** Наши данные демонстрируют, что основной целью лечения ОЛ на фоне беременности является спасение двух жизней. ХТ беременным женщинам с целью достижения ремиссии ОЛ после 1-го курса должна проводиться по стандартным программам в полных дозах. Долгосрочные результаты лечения этих больных сопоставимы с общими результатами лечения ОЛ.

## Оптимизация условий культивирования В-клеток хронического лимфолейкоза

Р.А. Сарибекян, И.А. Воробьев

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

**Введение.** При культивировании В-клеток хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ) *in vitro*, в большинстве работ наблюдается высокий уровень спонтанного апоптоза, что сильно затрудняет исследования данного заболевания в моделях *ex vivo*. Целью настоящей работы являлся поиск оптимальной среды для культивирования В-ХЛЛ.

**Материалы и методы.** Исследовали опухолевые клетки, выделенные у больных В-ХЛЛ. У 39 из них, клетки выделяли из образцов периферической крови, у 12 – из биоптатов селезенки или лимфатических узлов. Для получения культуры стромальных клеток использовали клетки выделенные из пункций костного мозга у 19 больных В-ХЛЛ. Периферические мононуклеары крови (ПМК) и стромальные клетки костного мозга выделяли в градиенте фиколла ("Sigma-Aldrich") и культивировали в термостате при 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C. При культивировании стромальных клеток в качестве фидерного слоя использовали среду RPMI-1640 ("Панэко") с добавлением 10% сыворотки новорожденных телят (NBCS, "Панэко"). При этом по прошествии 24 ч все не прикрепившиеся к пластику клетки удаляли. Полученную культуру стромальных клеток выращивали в течение 2–3 нед, и затем использовали в качестве подложки. Для культивирования клеток В-ХЛЛ использовали среду Hybridoma SFM ("Invitrogen") без добавления сыворотки, и среду RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки NBCS. Уровень апоптоза определяли методом проточной цитофлюориметрии (прибор FACScalibur, "BD Bioscience", США). Для маркирования апоптотических В-клеток использовали Annexin V ("BD Pharmingen") и моноклональные антитела к CD19 ("Dako Cytomation"). Анализ полученной информации производили с помощью программы CellQuest.

**Результаты и обсуждение.** При культивировании ПМК от больных В-ХЛЛ в среде Hybridoma SFM (без добавок)

частота апоптоза составила  $32 \pm 6,3\%$  на 1-е сутки,  $32,3 \pm 8,4\%$  на 2-е сутки,  $27,5 \pm 6,1\%$  на 3-и сутки и  $39,1 \pm 14\%$  6-е сутки ( $n = 20$ ). При культивировании ПМК В-ХЛЛ в среде RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки частота апоптоза составила  $20 \pm 5,2\%$  на 1-е,  $21,7 \pm 6,7\%$  на 2-е,  $25,7 \pm 8,2\%$  на 3-и, и  $40,1 \pm 10,9\%$  на 6-е сутки ( $n = 19$ ). При добавлении в среду Hybridoma SFM альбумина (25 мг/мл) частота апоптоза уменьшилась и составляла  $15,4 \pm 5,1\%$  на 1-е сутки,  $20,2 \pm 9,5\%$  на 2-е сутки,  $21 \pm 10,8\%$  на 3-и сутки ( $n = 20$ ). Добавление IL-6 в среду Hybridoma SFM не имело существенного влияния на уровень апоптоза – доля апоптотических клеток составляла  $33,7 \pm 5,7\%$  после 24 ч культивирования,  $31,2 \pm 7,6\%$  после 48 ч и  $31 \pm 14,6\%$  после 72 ч ( $n = 20$ ). При культивировании суспензий лимфатических органов, которые содержали как клетки В-ХЛЛ, так и стромальные клетки, в среде Hybridoma SFM уровень апоптоза составил  $10,8 \pm 4,8\%$  на 1-е сутки,  $10,1 \pm 5,1\%$  на 2-е сутки,  $11,1 \pm 5,5\%$  на 3-и сутки ( $n = 12$ ). При кокультивировании ПМК от больных В-ХЛЛ с заранее подготовленной подложкой из стромальных клеток неродственного костного мозга в среде RPMI-1640 с 10% сыворотки уровень апоптоза составлял  $10,5 \pm 3,9\%$  на 1-е;  $10,9 \pm 4,8\%$  на 2-е;  $11,5 \pm 5,3\%$  на 3-и и  $10,1 \pm 3,1\%$  на 6-е сутки ( $n = 19$ ).

**Заключение.** При кокультивировании со стромальными клетками уровень спонтанного апоптоза в клетках В-ХЛЛ был в 2-3 раза ниже, чем при использовании как стандартной среды RPMI-1640 с добавлением сыворотки, так и среды Hybridoma SFM. Мы полагаем, что методикой культивирования клеток В-ХЛЛ, обеспечивающей минимальный уровень спонтанного апоптоза, является их кокультивирование с клетками стромы, получаемыми из костного мозга, в среде RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки NBCS.

## Мутации TP53 без делеции 17p могут быть связаны с рефрактерностью к терапии

Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, Т.Н. Обухова, Е.А. Никитин, А.Б. Сударинов

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва.

**Введение.** В настоящее время стандартом в лечении соматически сохраненных больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) является режим FCR (флударабин, циклофосфан, ритуксимаб). Эффективность и хорошая переносимость этого режима продемонстрирована в нескольких клинических испытаниях. Несмотря на высокую эффективность режима, существует категория больных, у которых это лечение не эффективно. В этой группе больных прогноз крайне неблаго-

приятен. Данная работа посвящена изучению молекулярных маркеров рефрактерности к режимам химиотерапии с использованием флударабина.

**Материалы и методы.** В исследование включены 39 первичных больных ХЛЛ (16 женщин и 23 мужчины) в возрасте 51 – 84 лет (медиана возраста 66 лет), получавшие лечение в рамках протокола MSLG08, у которых ответ на терапию, по мнению исследователей, был неудовлетворителен. У 4 (10%)

Больные В-ХЛЛ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	28	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
Делеция 17p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мутации TP 53	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ответ на лечение	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	±	±	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

больных был ХЛЛ в стадии А с прогрессией, у 29 (74%) – стадии В и у 6 (16%) – стадии С. Больные получали терапию по программам FCR, FCR-Lite и LR. Ответ в рамках данной работы оценивали по критериям IWCLL. Для анализа мутационного статуса гена *TP53* использовали метод FASAY (R. Iggo et al., 1993). Принцип метода заключается в экспрессии мРНК опухолевого *TP53* в специальном штамме *S. cerevisiae*, имеющем ген биосинтеза аденина под контролем *TP53*-зависимого промотора. Для анализа берут опухолевые клетки, выделяют мРНК, синтезируют кДНК, амплифицируют кодирующую последовательность *TP53* и трансфецируют в штамм uIG398. В результате гомологичной рекомбинации кодирующая последовательность попадает в экспрессирующую конструкцию pSS16 и происходит синтез белка p53. Если в результате синтезируется функционально-активный белок p53, то соответствующие дрожжевые колонии бесцветны. Экспрессия мутантного p53 приводит к окрашиванию колоний в красный цвет. Соотношение бесцветных и красных колоний позволяет оценить долю мутантных мРНК гена *TP53* в образце опухолевых клеток. За границу, дискриминирующую случаи В-ХЛЛ с мутациями от таковых без мутаций, в соответствии с данными литературы, было принято 30% красных колоний.

**Результаты и обсуждение.** Делеция 17p более чем в 10% ядер была выявлена у 9 больных. У 2 из них, число ядер с делецией составило 10 и 13,5% соответственно; у 1 – 23%, у 6 – более 80%. Медиана красных колоний у больных без

мутаций *TP53* составила 9% (разброс 2–29%); у больных с мутациями – 70% (33–96%). С использованием границы в 30% мутации *TP53* идентифицированы у 12 больных. В группе больных с делецией 17p ( $n = 9$ ) мутации были выявлены у 7 больных. У 5 больных с мутациями *TP53* делеции 17p не было. Из других хромосомных нарушений в этой группе у 2 больных имелась делеция 13q, у 1 – трисомия 12 и у 1 – делеция 11q (см. таблицу).

У 10 (26%) больных из 39 ответ на лечение расценивался как неблагоприятный за счет прогрессии на фоне терапии, у 29 – частичная ремиссия. В группе больных с нарушениями *TP53* ( $n = 14$ ) лечение было неэффективным у 8 (57%) больных. Рефрактерность наблюдалась у 5 из 9 больных с делецией 17p, у 3 из 5 больных с мутациями *TP53* без делеции. В группе больных без мутаций и делеции терапия была неэффективна у 2 (8%) из 25 больных.

**Заключение.** Наше исследование показывает, что мутации *TP53* выявляются у больных ХЛЛ чаще, чем делеция 17p. Мутации ассоциируются с делецией 17p, но могут наблюдаться в отсутствие делеции. Наличие только мутаций *TP53* может быть связано с развитием рефрактерности к терапии с использованием флударабина. При подтверждении полученных закономерностей на большей выборке больных оценка мутаций *TP53* методом FASAY может быть рекомендована в качестве скринингового метода, позволяющего предсказывать рефрактерность к терапии.

## Модифицированная программа NHL-BFM-90 в лечении взрослых больных первичными лимфомами кишки

А.А. Сидорова<sup>1</sup>, Е.Е. Звонков<sup>2</sup>, А.К. Морозова<sup>2</sup>, С.К. Кравченко<sup>2</sup>, А.У. Магомедова<sup>2</sup>, Е.А. Барях<sup>2</sup>, Т.Н. Обухова<sup>2</sup>,  
Э. Г. Гемджян<sup>2</sup>, В.И. Воробьев<sup>2</sup>, А.М. Кременецкая<sup>2</sup>, А.И. Воробьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Больница красноярского научного центра СО РАН; <sup>2</sup>ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

**Введение.** Первичная лимфома кишки (ПЛК) – редкая и гетерогенная группа экстра nodальных лимфатических опухолей. Чаще всего встречается диффузная В-крупноклеточная лимфома кишки (В-ККЛК) и лимфома Беркитта кишки (ЛБК), значительно реже целиакияассоциированная Т-крупноклеточная лимфома кишки (Т-ККЛК). Выбор терапии определяется нозологической формой и наличием факторов неблагоприятного прогноза. При стандартном режиме терапии диффузной В-ККЛК по схеме CHOP/RCHOP общая и безрецидивная 5-летняя выживаемость составляет от 40 до 60%. Работы по интенсификации полихимиотерапии (ПХТ) у этой группы больных не многочисленны и противоречивы. Эффективность ПХТ у взрослых больных ЛБК и целиакияассоциированной Т-ККЛК оценить сложно из-за малого числа наблюдений описанных в литературе. Целью исследования явилась оценка эффективности и токсичности модифицированной программы mNHL-BFM-90 у взрослых больных ПЛК.

**Материалы и методы.** С августа 2004 г. по февраль 2012 г. на лечение по программе mNHL-BFM-90 было принято 28 больных ПЛК в возрасте от 15 до 59 лет (средний возраст 34 года). У 18 (64%) больных выявлена диффузная В-ККЛК, у 9 (32%) – ЛБК, у 1 (4%) – целиакияассоциированная Т-ККЛК. У 15 (54%) больных выявлено вовлечение толстой кишки, у 7 (25%) – илеоцекального угла, у 6 (21%) – тонкой кишки. Факторы неблагоприятного прогноза (1 фактор и более) выявлены у всех больных. Согласно классификации Lugano, стадия

IE установлена у 3 (11%) больных, стадия IIE – у 20 (71%), стадия IIIE – у 3 (11%), стадия IVE (сочетанное поражение кишки и миндалины – 1, кишки и оболочек мозга – 1) – у 2 (7%) больных. Повышение концентрации ЛДГ отмечено у 11 (39%), В-симптомы – у 13 (46%) больных. Размер опухоли превышал 10 см у 16 (57%) больных. Резекция пораженной кишки до поступления в клинику проведена 22 (79%) больным. Всем больным проведено от 4 до 6 курсов ПХТ по программе mNHL-BFM-90. Больному целиакияассоциированной Т-ККЛК после 6 курсов mNHL-BFM-90 выполнена высокодозная химиотерапия по схеме BEAM с трансплантацией аутологичных стволовых клеток крови.

**Результаты и обсуждение.** Из 18 больных диффузной В-ККЛК у 15 (83%) больных достигнута полная ремиссия, у 2 больных опухоль прогрессировала сразу после окончания лечения, что послужило причиной смерти больных; 1 больной умер от септических осложнений после 2-го курса ПХТ. При среднем сроке наблюдения 38 мес (2–108 мес) общая и безрецидивная выживаемость составила 83% и 100%. Из 9 больных ЛБК полная ремиссия достигнута у 9 (100%) больных. Общая и безрецидивная выживаемость составила 100% при среднем сроке наблюдения 65 мес (9–108 мес). У больного целиакияассоциированной Т-ККЛК сохраняется ремиссия заболевания в течение 4 мес.

**Заключение.** ПХТ по программе mNHL-BFM-90 показала универсально высокую эффективность в гетерогенной группе больных ПЛК.

## Показатели состояния эндотелия и гемостаза после многократного и однократного введения L-аспарагиназы

О.Ю. Скольская, С.Г. Владимирова, Л.Н. Тарасова, В.В. Черепанова  
ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России

**Введение.** Целью работы явилось сравнение показателей состояния эндотелия и плазменного гемостаза у боль-

ных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) при терапии L-аспарагиназой.