

Материалы

**VII Российского симпозиума
«Биологические основы терапии онкологических
и гематологических заболеваний»**

Москва, 1–4 июня 2011 г.

ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



Уважаемые читатели!

Редакция журнала «Онкогематология» выражает благодарность всем авторам тезисов, присланных участниками Российского симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», которые посвящены широкому кругу теоретических и практических проблем современной медицинской науки. Мы были рады предоставить страницы журнала молодым исследователям и маститым ученым, так как, на наш взгляд, эта информация отражает большие потенциальные возможности научного сообщества из многих регионов и позволяет надеяться на дальнейшее развитие исследовательских программ, появление новых имен и серьезных научных достижений.

Экспертная комиссия провела обсуждение присланных в редакцию материалов и сочла возможным отклонить ряд работ, в основном по причине их вторичности.

Считаем, что возможность представить результаты своих исследований на суд широкой профессиональной аудитории дает молодым ученым стимул к дальнейшему развитию и заставляет строже оценивать значимость и качество своего труда.

Желаем успехов участникам симпозиума.

Редакция журнала «Онкогематология»

Распространенность CMV-инфекции у детей с билиарной атрезией

Ю.В. Аверьянова¹, Е.В. Райкина², В.О. Бобрынина²,
А.Э. Степанов¹, Г.И. Волкова¹, Ю.Н. Иванова¹,
С.П. Макаров¹

¹ФГУ Российская детская клиническая больница
Минздравсоцразвития России;

²ФГУ Федеральный научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравсоцразвития России, Москва

Этиология и патогенез билиарной атрезии (БА) до конца не изучены. В настоящее время наиболее убедительной кажется теория генетически детерминированного и вирус-ассоциированного пускового механизма иммуноопосредованной фиброоблитерации желчных протоков.

Цель работы. Исследование группы больных с БА на наличие гепатотропных герпесвирусов и анализа распространенности вирусной инфекции.

Материалы и методы исследования. С 2004 по 2009 г. было обследовано 52 ребенка с БА в возрасте от 3 недель до 4,5 месяцев. ДНК цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна–Барр (EBV) и вируса простого герпеса 6-го типа (HHV-6) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение ДНК, качественное и количественное определение вирусов проводили коммерческими наборами реагентов фирмы ИнтерЛабСервис, Россия. Для амплификации и определения продуктов ПЦР использовали приборы «Rotor-Gene 6000», Corbett Research, Австралия.

Материалом исследования служили кровь, слюна, моча, биоптат печени пациентов, а с 2007 г. — грудное молоко матерей детей с БА, находящихся на грудном вскармливании. Количественный мониторинг CMV и EBV проводили только в образцах крови и грудном молоке. Положительным результатом считали наличие более 500 копий вируса в 1 мл биологической жидкости.

Результаты. При анализе полученных результатов обнаружено, что EBV и HHV-6 в крови выявлены только у 3,8 % (2) и 1,9 % (1) больных соответственно. В биоптате печени EBV и HHV-6 определены у 1,9 % (1) больных. ДНК CMV присутствовала во всех биологических образцах у 54 % (28) детей.

В 73 % (38) случаев выявлена CMV-инфекция в стадии репликации с титром от 500 до 30 000 копий вируса в 1 мл крови. Из них у 58 % (22) ДНК CMV также обнаружена и в биоптате печени.

Выводы. Наше исследование показало, что в половине случаев у пациентов с БА во всех биологических образцах выявляли CMV. При большом титре CMV в грудном молоке вопрос о прекращении грудного вскармливания решался индивидуально. На этапе эмбриогенеза CMV может служить основным

фактором, приводящим к запуску цепи патологических реакций и формированию врожденных дефектов, связанных с данным заболеванием.

По нашим данным, клинически значимым является определение CMV в крови и биоптате печени, что позволяет своевременно провести специфическую терапию. Эрадикация вируса и адекватное лечение CMV-гепатита у больных с БА оказывают существенное влияние на благоприятный исход заболевания. Выявление CMV в образцах слюны и мочи у пациентов с БА клинически не оправданно, поскольку латентное течение CMV-инфекции не имеет прогностического значения и не требует какого-либо лечения.

Пространственный рост фибринового сгустка как новый метод диагностики кровоточивости и тромбозов

Ф.И. Атауллаханов^{1,2}, А.Н. Баландина^{1,2},
М.А. Пантелеев^{1,2}, В.М. Емельяненко¹, Г.М. Галстян¹,
К.Г. Копылов¹, М.А. Кумскова¹, С.С. Карамзин¹,
О.А. Фадеева¹, Н.С. Сошитова², Е.Н. Липец¹,
И.Д. Тарандовский², И.А. Щербина¹

¹ФГБУ Гематологический научный центр
Минздравсоцразвития России;

²Центр теоретических проблем физико-химической
фармакологии РАН, Москва

Введение. Болезни системы кровообращения — ведущая причина смертности населения в России. Часто непосредственной причиной смерти при этом является нарушение в работе системы свертывания — кровотечение и тромбоз. Поэтому своевременная диагностика и мониторинг состояния пациентов с риском таких нарушений представляют собой одну из актуальных задач современной медицины. Важным аспектом свертывания крови в организме служит его пространственная неоднородность. Свертывание активируется в месте повреждения от экспрессирующих тканевый фактор клеток. Далее сгусток распространяется от места активации вглубь сосуда, образуя объемную структуру, закрывающую место повреждения. Однако до сих пор применяемые в клинической практике тесты для оценки статуса системы свертывания предполагают полное перемешивание образца крови/плазмы с активатором свертывания. Такие тесты не в состоянии корректно оценить работу системы гемостаза.

Цель данной работы — исследовать возможности метода регистрации пространственного роста сгустка в клинической практике и оценить его предсказательную силу.

Материалы и методы. В исследовании участвовали пациенты с различными нарушениями свертывания, включая патологии как с риском тромбоза (сепсис, онкогематологические заболевания, сердечно-сосудис-

тые заболевания), так и с риском кровотечения (гемофилии А и Б). Свертывание крови оценивали стандартными методами (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновый индекс, Д-димеры, тромбоэластография) и с помощью прибора Тромбоимиджер, который позволяет регистрировать формирование и рост фибринового сгустка от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором в тонком перемешиваемом слое свободной от тромбоцитов плазмы. Регистрация производится оптическим методом, по сигналу светорассеяния. Основным параметром данного анализа является скорость распространения сгустка от активирующей поверхности.

Результаты. У части пациентов с рисками тромбоза образование сгустка от активирующей поверхности сопровождается сгустками, формирующимися вдали от места активации в виде спонтанных центров роста. На примере пациентов с сепсисом ($N=18$), химиотерапией при онкогематологических заболеваниях ($N=36$) и сердечно-сосудистыми заболеваниями ($N=90$) показано, что степень спонтанного свертывания коррелирует с тяжестью заболевания и риском тромботических осложнений. Так, появление гиперкоагуляции на одни сутки предшествует увеличению уровня Д-димеров в 80% случаев ($N=6$), при этом не было случая, чтобы пространственный рост сгустка не показал гиперкоагуляцию при увеличении уровня Д-димеров. Это свидетельствует о хорошей предсказательной силе метода пространственного роста сгустка. В 2 случаях переход системы свертывания в состояние гиперкоагуляции сопровождался тромбозом и тромбоэмболией. Во всех вариантах гиперкоагуляции и риска тромбоза стандартные коагулологические тесты показывают существенно меньшую чувствительность к тромботическим осложнениям, а в некоторых случаях показывают нормокоагуляцию. Скорость роста сгустка у пациентов с гемофилией существенно снижена и коррелирует с тяжестью заболевания и частотой кровотечений ($N=9$). При этом уровень фактора VIII не отражает тяжести течения гемофилии и эффективность терапии у данных пациентов. Также метод пространственного роста сгустка имеет высокую чувствительность к корректирующей плазменный гемостаз терапии.

Выводы. Данные проведенного исследования демонстрируют, что учет пространственной неоднородности при формировании сгустка представляет перспективный метод оценки гемостаза у пациентов с широким спектром заболеваний, связанных с патологиями системы свертывания.

Работа была частично поддержана грантом Президента РФ для молодых кандидатов наук МК-155.2010.4 и грантами РФФИ 09-04-00232, 09-04-00357, 09-04-92427, 09-02-00018.

Определение клинически значимых параметров цитомегаловирусной инфекции у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток

И.М. Бархатов, В.Н. Вавилов, А.В. Акимова,
И.С. Соломонова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев
*Институт детской гематологии и трансплатологии
им. Р.М. Горбачевой ГОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова*

Среди патогенов, вызывающих инфекционные осложнения у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), одно из важнейших мест в структуре посттрансплантационной заболеваемости и смертности занимают осложнения, обусловленные цитомегаловирусом (ЦМВ). В то же время, в силу широкого спектра побочных действий противовирусных препаратов является актуальным подбор адекватной стратегии терапии как в зависимости от вирусной нагрузки, так и от серологического статуса донора и реципиента, что может быть достигнуто на основе мониторинга ЦМВ-инфекции (ЦМВИ) методом ПЦР.

Целью нашего исследования — определение клинически значимых параметров ЦМВИ с помощью измерения уровней и динамики вирусной нагрузки (ВН) методом количественной ПЦР в реальном времени для выбора оптимальных схем противовирусного лечения и профилактики.

Материалы и методы. В ходе работы были проанализированы образцы крови и костного мозга 96 пациентов, перенесших аллогенную ТГСК (59 HLA-совместимых неродственных, 32 родственных и 7 от гаплоидентичных доноров). Немиелоаблативные режимы кондиционирования применялись в 61, миелоаблативные — в 35 случаях. Все пациенты, трансплантированные от неродственного или гаплоидентичного донора, получали антиtimoцитарный глобулин (АТГ). Проводилось определение ВН в ликворе и плазме крови (с определением количества копий вируса на 1 мл материала), а также в образцах костного мозга (с нормализацией копий ДНК ЦМВ на 10^6 ядродержащих клеток) с использованием тест-систем АмплиСенс CMV-монитор или АмплиСенс CMV-скрин-титр (ИнтерЛабСервис, Россия).

Результаты. Реактивация ЦМВИ наблюдалась у пациентов в 85% случаев в раннем и в 15% случаев — в позднем посттрансплантационном периоде. Реактивация не зависела от интенсивности режимов кондиционирования, но была существенно выше у пациентов, перенесших неродственную аллогенную трансплантацию по сравнению с трансплантацией от родственного донора (75% и 40% соответственно). Профилактика реакции «трансплантат против хозяи-

на» с использованием АТГ ассоциировалась с увеличенным риском реактивации — 70% с АТГ по сравнению с 34% без АТГ. Частота реактивации ЦМВИ в серонегативных парах была существенно ниже (18%) по сравнению с трансплантациями, где донор или реципиент имели специфические антитела. Копийность ЦМВ в плазме находилась в прямой корреляционной зависимости от количества копий вирусной ДНК, нормализованной на 10^6 клеток костного мозга ($p < 0,01$). Только у 2 пациентов определялся низкий титр ДНК ЦМВ (до 10^3) в костном мозге на фоне неопределяемой ВН в плазме.

Результаты исследований позволили сформулировать следующие выводы:

1. Анализ плазмы не менее информативен по сравнению с исследованием костного мозга и показан при мониторинге инфекции в период цитопении.
2. Поздняя реактивация ЦМВИ происходит значительно реже, чем ранняя.
3. Высокий уровень ВН чаще всего отмечается после неродственной ТГСК, миелоаблативного режима кондиционирования, при комбинации серологического статуса реципиент/донор +/-.
4. Мониторинг развития инфекции позволяет оптимально подбирать схемы противовирусного лечения.

Опыт определения доли мутантного аллеля *JAK2V617F* в клинической практике

О.В. Бердюгина

ГУЗ Свердловская областная клиническая больница № 1,
Екатеринбург

Связь уровня аллельной нагрузки с неблагоприятным течением хронических миелопролиферативных заболеваний — хМПЗ (истинной полицитемии, идиопатической тромбоцитемии и идиопатического миелофиброза) была обнаружена разными авторами и в настоящее время является общепризнанным фактом. В научной литературе встречаются единичные упоминания о наличии мутации *JAK2V617F* у больных с острым мегакариобластным лейкозом, хроническим миеломоноцитарным лейкозом, острым и хроническим миелолейкозом, миелодиспластическим синдромом, а также в единичных случаях при В-клеточном остром лейкозе с болезнью Дауна.

Цель данной работы — определение диагностического значения выявления мутации *JAK2V617F* у больных с признаками поражения миелоидного ростка кроветворения.

Лабораторное исследование проведено у 43 пациентов: 46,5% от общего числа (20 человек) составляли

мужчины, средний возраст которых был 58 ± 18 лет (среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение); 53,5% от числа обследованных составляли женщины (23 больных) со средним возрастом 65 ± 12 лет. Кровь из периферической вены забирали в пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА). Наличие точечного полиморфизма определяли методом полимеразной цепной реакции в TaqMan-варианте с детекцией в режиме реального времени (амплификатор Rotor Gene, Cobbett Research) с использованием реагентов MutaQuant, Ipsogen, Франция. Количественное определение мутантного аллеля *V617F* в гене *JAK2* выражалось в процентах по отношению к дикому типу.

Использование аллель-специфических праймеров, способных различить мутантные варианты исследованного полиморфизма в гене *JAK2*, позволило установить следующее. У мужчин распределение аллельной нагрузки было следующим: при МПЗ *JAK2V617F* встречался у 12,5% больных мужчин, при хМПЗ — у 57%; у женщин при МПЗ — в 42,8%, при хМПЗ — у 75%. Выявлено по одному случаю наличия *JAK2V617F* у мужчин и у женщин при хроническом миелолейкозе. Определение точечной мутации *JAK2V617F* при лимфоме показало величину аллельной нагрузки 0,001%, что подтверждает ранее опубликованные данные. Единичные параллельные исследования на наличие мутации *JAK2V617F* в периферической крови и костном мозге показали их согласованность. Разница в величине аллельной нагрузки составила менее 1,5%. Изучение аллельной нагрузки в контрольной группе (здоровые доноры) показало, что в норме данная величина варьирует в пределах $0,7 \pm 0,2\%$.

Таким образом, использование методов молекулярной диагностики точечной мутации *JAK2V617F* позволяет верно определять даже незначительное увеличение аллельной нагрузки у пациента, что может быть использовано для определения минимальной остаточной болезни.

Индукция иммунной толерантности у детей с ингибиторной формой гемофилии А

В.В. Вдовин¹, П.В. Свирин^{1,2}, Е.Э. Шиллер¹,
Э.В. Агеенкова¹, Е.К. Донюш¹, Л.Е. Ларина¹,
Е.Н. Лучинкина¹, О.В. Малкова¹, В.Ю. Петров¹,
Г.И. Сосков¹, Е.А. Яценко¹

¹Измайловская детская городская клиническая
больница № 3; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздрава России, Москва

По современным данным, наиболее эффективным способом лечения ингибиторной формы гемофилии А является индукция иммунной толерантности (ИИТ) по Боннскому протоколу с использованием

концентратов фактора VIII, содержащих фактор Виллебранда.

Мы наблюдали 25 детей из Москвы и Московской области с ингибиторной формой гемофилии А. Из них на ИИТ по Боннскому протоколу были взяты 17 пациентов. К настоящему моменту курс ИИТ закончен у 8 больных с высокореагирующим ингибитором: 2 пациента прекратили терапию в связи с отсутствием эффекта, 1 пациент после получения хорошего ответа прекратил лечение в связи с несоблюдением режима терапии. У этого пациента сохраняется значительно сокращенное время полувыведения и снижен тест восстановления, однако имеется хороший клинический эффект на фоне получаемой им профилактической терапии. У 5 пациентов ИИТ была полностью успешна, и они переведены на высокодозную профилактику. Медиана времени от начала ИИТ до того момента, когда ингибитор перестал определяться прямым методом, у этих пациентов составила 78 дней (14–194). Медиана длительности ИИТ составила 1075 дней (1009–1299). На курс лечения пациентам понадобилось $144362,6 \pm 24040,7$ МЕ/кг.

Выявление поражения костного мозга у больных нейробластомой с использованием молекулярных маркеров

А.Е. Друй^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, А.М. Попов^{1,2},
Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев³, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница № 1;

²Институт медицинских клеточных технологий;

³ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Цель исследования — оценка возможности использования экспрессии генов *TH*, *GD2* и *ELAVL4* для оценки поражения костного мозга (КМ) у пациентов с нейробластомой в сравнении с геном *RHOX2B*.

Методы. Мы проанализировали экспрессию молекулярных маркеров методом ПЦР в реальном времени в 331 образце КМ от 57 больных нейробластомой и 26 образцах КМ пациентов без злокачественных опухолей.

Результаты. Экспрессия *RHOX2B* и *TH* в нормальном КМ не была выявлена, экспрессия *ELAVL4* определялась в 20, а *GD2* — в 15 из 26 образцов КМ пациентов без злокачественных новообразований. Как истинно позитивные на основании обнаружения опухолевых клеток в цитологических препаратах КМ или экспрессии гена *RHOX2B* были расценены 107 образцов КМ больных нейробластомой. Из этого числа ген *RHOX2B* был экспрессирован в 105 образцах, *TH* — в 96, *ELAVL4* и *GD2* — в 107 образцах. Экспрессия гена *TH* была выявлена в 5 из 224 негативных образцов, *ELAVL4* — в 209, *GD2* — в 197. Экспрессия *TH* в позитивных образцах была выше, чем в негативных, а экспрессия *GD2* и *ELAVL4* в позитивных образцах была достоверно выше экспрессии этих маркеров как в негативных, так и в контрольных образцах. Экспрессия *RHOX2B*, *TH* и *GD2* оставалась стабильной во время терапии нейробластомы, а экспрессия *ELAVL4* — снижалась. С помощью ROC-анализа выявлена сходная диагностическая информативность *RHOX2B* и *TH*. Определение экспрессии генов *RHOX2B* и *TH* характеризовалось высокими значениями прогностической ценности положительного (1,000 и 0,950) и отрицательного (0,991 и 0,952) результатов, а также диагностической эффективности теста (ДЭТ, 0,994 и 0,952 соответственно). Сочетанное применение *RHOX2B* и *TH* не имело преимуществ перед использованием только *RHOX2B* (ДЭТ=0,985). Значения ДЭТ генов *GD2* и *ELAVL4* были относительно низкими (0,828 и 0,767) в силу невысоких значений диагностической чувствительности (0,589 и 0,467). Конвергентность между данными цитологического исследования и определения экспрессии *RHOX2B* составила 80,1%, *TH* — 80,3%. Экспрессия данных генов была выявлена в 4 случаях локализованной нейробластомы: у 2 пациентов с I стадией, и 2 — с III. В силу малого количества наблюдений не удалось выявить прогностического значения *RHOX2B* и *TH* в случаях нейробластомы, в которых по данным цитологии опухолевые клетки в КМ не выявлялись.

прессия гена *TH* была выявлена в 5 из 224 негативных образцов, *ELAVL4* — в 209, *GD2* — в 197. Экспрессия *TH* в позитивных образцах была выше, чем в негативных, а экспрессия *GD2* и *ELAVL4* в позитивных образцах была достоверно выше экспрессии этих маркеров как в негативных, так и в контрольных образцах. Экспрессия *RHOX2B*, *TH* и *GD2* оставалась стабильной во время терапии нейробластомы, а экспрессия *ELAVL4* — снижалась. С помощью ROC-анализа выявлена сходная диагностическая информативность *RHOX2B* и *TH*. Определение экспрессии генов *RHOX2B* и *TH* характеризовалось высокими значениями прогностической ценности положительного (1,000 и 0,950) и отрицательного (0,991 и 0,952) результатов, а также диагностической эффективности теста (ДЭТ, 0,994 и 0,952 соответственно). Сочетанное применение *RHOX2B* и *TH* не имело преимуществ перед использованием только *RHOX2B* (ДЭТ=0,985). Значения ДЭТ генов *GD2* и *ELAVL4* были относительно низкими (0,828 и 0,767) в силу невысоких значений диагностической чувствительности (0,589 и 0,467). Конвергентность между данными цитологического исследования и определения экспрессии *RHOX2B* составила 80,1%, *TH* — 80,3%. Экспрессия данных генов была выявлена в 4 случаях локализованной нейробластомы: у 2 пациентов с I стадией, и 2 — с III. В силу малого количества наблюдений не удалось выявить прогностического значения *RHOX2B* и *TH* в случаях нейробластомы, в которых по данным цитологии опухолевые клетки в КМ не выявлялись.

Использование экспрессии генов *NKX2*, *STEAP1* и *CCND1* для оценки поражения костного мозга у пациентов с опухолями семейства саркомы Юинга

А.Е. Друй^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, А.М. Попов^{1,2},
Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев³, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница № 1;

²Институт медицинских клеточных технологий;

³ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Опухоли семейства саркомы Юинга у детей характеризуются агрессивным течением и ранним появлением отдаленных метастазов. Наиболее частыми объектами метастазирования являются легкие, кости скелета, костный мозг (КМ).

Цель исследования — оценка возможности использования экспрессии генов *NKX2*, *STEAP1* и *CCND1* для оценки поражения КМ у пациентов с саркомой Юинга и примитивными нейроэктодермальными опухолями.

Методы. Нами была проанализирована экспрессия молекулярных маркеров методом ПЦР в реальном времени в 59 образцах КМ больных и 8 образцах КМ здоровых пациентов без злокачественных опухолей.

Результаты. Экспрессия *NKX2* в нормальном КМ не была выявлена, а экспрессия *STEAP1* и *CCND1* определялась в 8 образцах КМ пациентов без злокачественных новообразований. Как истинно позитивные на основании обнаружения опухолевых клеток в цитологических препаратах КМ или химерного транскрипта (*EWS1-FLI* или *EWS1-ERG*) методом гнездной ПЦР были расценены 17 образцов КМ больных. Из этого числа ген *NKX2* был экспрессирован в 16 образцах, *STEAP1* и *CCND1* — в 17 образцах. В 2 негативных образцах определялась мРНК гена *NKX2*, а экспрессия *STEAP1* и *CCND1* была выявлена во всех 42 негативных образцах. С помощью ROC-анализа выявлена наибольшая диагностическая информативность определения экспрессии *NKX2*. Были получены высокие значения прогностической ценности положительного (0,889), отрицательного (0,976) результатов, диагностической чувствительности (0,941), специфичности (0,952), а также диагностической эффективности теста (ДЭТ=0,949). Значения ДЭТ генов *STEAP1* и *CCND1* были низкими (0,695 и 0,763), при этом диагностическая чувствительность составила 0,824 и 0,588, а специфичность — 0,643 и 0,833 соответственно. Единственный позитивный образец КМ, в котором отсутствовала экспрессия гена *NKX2*, был получен в момент первичной диагностики. Опухолевые клетки в нем не были выявлены цитологически, но обнаруживался химерный транскрипт *EWS1-FLI*. При этом в одновременно взятых образцах КМ из двух других локализаций определялась экспрессия и *NKX2*, и *EWS1-FLI*, а цитологически они были негативны. Таким образом, *NKX2* имеет наилучшие диагностические характеристики при выявлении поражения КМ у пациентов с опухолями семейства саркомы Юинга, как на момент диагностики, так и в ходе терапии. *STEAP1* и *CCND1* имеют достоверно более низкие диагностические характеристики и их применение для оценки поражения КМ нецелесообразно.

Цитотоксическая активность водорастворимых порфирин-фуллеренов и аминоспиртов в отношении лейкемических клеток *in vitro*

М.В. Ефименко, Н.А. Хрипкова, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России, Москва

Совершенствование химиотерапии идет по пути повышения эффективности и снижения токсичности химиопрепаратов. Препараты на основе водорастворимых порфирин-фуллеренов (ВПФ) обладают способностью селективно связываться с мембраной лейкемических клеток (ЛК) и таким образом могут проявлять селективную противолейкемическую активность. Препараты на основе аминоспиртов (АС) способны проявлять прямое цитотоксическое действие на раковые клетки *in vitro*.

Цель работы. Оценить чувствительность ЛК и нормальных клеток крови и костного мозга (КМ) к препаратам на основе ВПФ и АС *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании были использованы ЛК, выделенные из образцов КМ пациентов в возрасте от 10 мес до 16 лет с впервые диагностированными нелечеными ОЛЛ — 25 образцов. В качестве контрольной группы использовались моноклеарные клетки, выделенные из крови здоровых доноров в возрасте от 20 до 25 лет ($n=7$). Объектом исследования являлись 3 химиопрепарата на основе ВПФ (РМС16 в комплексе с ионами Co , ^{24}Mg и ^{25}Mg) и 2 производных АС (In445 и In449). Чувствительность клеток оценивалась с помощью МТТ-теста. Определяли полулетальные концентрации препаратов (LC50) и сравнивали цитотоксическую активность на ЛК КМ и моноклеарные клетки крови здоровых доноров.

Результаты. Были получены статистически достоверные различия между чувствительностью ЛК КМ и нормальных лимфоцитов крови к препаратам РМС16(Co), РМС16(^{25}Mg) и к препаратам In445 и In449; медианы LC50 составляют 0,44 мг/мл; 33,43 мг/мл; 52,9 мкг/мл и 57,9 мкг/мл соответственно. Препарат РМС16(^{24}Mg) также проявляет цитотоксическую активность в отношении ЛК (медиана LC50 — 3,79 мг/мл). Однако не было получено статистически значимых различий LC50 этого препарата для ЛК и нормальных клеток крови. Наибольшей цитотоксической активностью из группы ВПФ обладает препарат РМС16(Co). Производные АС обладают примерно одинаковой цитотоксичностью на ЛК КМ.

Выводы. Препараты ВПФ и АС проявляют селективную цитотоксическую активность в отношении

лейкемических клеток *in vitro* и являются перспективными для дальнейшего изучения в качестве противолейкемических средств.

Применение рекомбинантного человеческого эритропоэтина для лечения анемии при туберкулезе легких (пилотное исследование)

Н.В. Инякова¹, В.Г. Демихов¹, Е.Н. Долженко², Т.А. Кокунова², Т.Ю. Мисюрева², Е.Ф. Морщакова¹

¹Рязанский филиал ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России;

²Рязанский областной клинический противотуберкулезный диспансер

Цель исследования — оценить эффективность терапии анемий у пациентов с туберкулезом легких (ТБ) рекомбинантным человеческим эритропоэтином (рч-ЭПО).

Материалы и методы. В исследование вошли 13 взрослых пациентов с ТБ легких и анемией (9 мужчин и 4 женщины), в возрасте 22–78 ($40,46 \pm 4,45$) лет. Средний уровень Hb до начала лечения составил $83,23 \pm 2,30$ г/л. Для коррекции анемии мы использовали рч-ЭПО (эпоэтин-альфа). Путь введения рч-ЭПО у 8 пациентов был подкожный и у 5 пациентов внутривенный. Подкожно рч-ЭПО вводили 3 раза в неделю в течение 3–6 недель в стартовой разовой дозе 200 МЕ/кг. При отсутствии полного терапевтического ответа через 2 недели лечения, определяемого как повышение уровня гемоглобина (Hb) на 5–7 г/л от исходного, отсутствию трансфузий эритроцитарной массы, разовая доза препарата увеличивалась до 300 МЕ/кг. Внутривенно рч-ЭПО вводили 1 раз в неделю в дозе 600 МЕ/кг. При достижении целевого уровня Hb 115–120 г/л введение препарата прекращали. Дополнительно всем пациентам назначали 200 мг сульфата железа (Fe^{2+}) в сутки перорально (Сорбифер дурулес). При неэффективности терапии в течение 2 недель в группе с внутривенным введением рч-ЭПО и наличием у пациента анемии, определяемой как ЖДА, пероральный препарат железа заменялся на железа (III)-гидроксид сахарозный комплекс (Венофер).

Результаты. У 10 (76,9%) из 13 больных ТБ на фоне лечения рч-ЭПО было отмечено достоверное повышение уровня Hb. В группе пациентов с подкожным введением рч-ЭПО 6 (75%) из 8 человек ответили на терапию. В группе больных с внутривенным введением рч-ЭПО у 4 (80%) из 5 пациентов отмечалась положительная динамика. У пациентов, ответивших на терапию, средний недельный прирост Hb составил $6,62 \pm 0,88$ г/л. Максимальный средний уровень ретикулоцитов составил $2,91 \pm 0,42\%$ и от-

мечался на 2-й неделе рч-ЭПО-терапии. У 3 пациентов повышение уровня Hb на фоне лечения рч-ЭПО не отмечалось, однако увеличение количества ретикулоцитов на 2-й неделе терапии (ретикулоцитарный криз) наблюдалось у всех пациентов. Побочных эффектов на фоне лечения выявлено не было.

Выводы. Отмеченное повышение уровня Hb у 10 из 13 пациентов с ТБ свидетельствует о высокой эффективности рч-ЭПО в терапии анемий у пациентов с ТБ.

Эффективность высокодозной терапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у детей с саркомой Юинга/PNET

И.В. Казанцев¹, Т.В. Юхта², А.Ю. Зинченко¹, А.Г. Геворгян¹, Е.В. Морозова¹, С.А. Сафонова², Л.С. Зубаровская¹, Ю.А. Пунанов², Б.В. Афанасьев¹

¹Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;

²ФГУ Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

Введение. Клиническое течение саркомы Юинга/PNET у детей и подростков характеризуется быстрым ростом опухолевой массы и ранним метастазированием, что обуславливает неблагоприятный прогноз у значительной части пациентов. Современные программы, совмещающие полихимиотерапию (ПХТ) с хирургическим лечением и лучевой терапией, позволяют достичь 70–80% 5-летней безрецидивной выживаемости у детей с локализованной формой заболевания, но в группе неблагоприятного прогноза 5-летняя бессобытийная выживаемость не превышает 20–30%. Согласно данным отдельных исследований возможно улучшение прогноза для данной группы пациентов за счет использования высокодозной ПХТ (ВДПХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК).

Материалы и методы. С февраля 2003 по март 2010 г. на базе НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова получили терапию 23 ребенка и подростка с саркомой Юинга/PNET: 16 пациентов мужского и 7 женского пола (соотношение М:Ж — 2,8:1), средний возраст на момент постановки диагноза составил 12,6 (3–18) года. Во всех случаях диагноз был подтвержден гистологически. У 17 были выявлены отдаленные метастазы и у 6 больных диагностирована локализованная форма заболевания. У всех пациентов с локализованной формой объем исходной опухоли превышал 200 см³. Программа лечения включала в себя 6 курсов ПХТ (ифосфамид, винкристин, доксоруби-

цин и этопозид), хирургическое удаление или локальное облучение первичной опухоли (48–56 Гр). Восемь пациентов, достигшие полной ремиссии, получили 8 курсов поддерживающей ПХТ (винкристин, дактиномицин, ифосфамид). ВДПХТ с ауто-ТГСК проведена 15 пациентам. Применены следующие режимы кондиционирования: бусульфан 16 мг/кг и мелфалан 140 мг/м² (у 13 пациентов), мелфалан 140–200 мг/м² (у 2 пациентов). Использованы различные источники гемопоэтических стволовых клеток: костный мозг (КМ) — у 7, стволовые клетки периферической крови (СКПК) — у 3, КМ и СКПК — у 4 пациентов. Средняя доза CD34⁺-клеток в трансплантате составила $3,15 \times 10^6$ ($1,0$ – $8,9 \times 10^6$).

Результаты. В группе пациентов, получавших поддерживающую терапию ($n=8$), у 5 больных произошел рецидив с обширным метастатическим поражением, все они умерли от прогрессии основного заболевания через 19–36 мес с момента первичного заболевания. У 3 пациентов выявлен локальный рецидив (12 и 32 мес), они получили терапию 2-й линии (одному проведена ВДПХТ с ауто-ТГСК), 1 из пациентов умер от инфекционных осложнений терапии.

В группе пациентов, получивших ВДПХТ с ауто-ТГСК ($n=15$), 12 живы (7–43 мес после ВДПХТ), у 6 сохраняется полная ремиссия. Рецидив зафиксирован у всех пациентов, не достигших ремиссии к моменту проведения ВДПХТ. Из пациентов, находившихся на момент проведения ВДПХТ в полной ремиссии ($n=10$), поздние рецидивы выявлены у 4, 1 умер от прогрессии заболевания. Использованные режимы ВДПХТ характеризовались приемлемой токсичностью: у всех больных развился мукозит II–III степени, у 12 пациентов — фебрильная нейтропения, у 3 наблюдался токсический гепатит.

При сравнении групп пациентов, получавших поддерживающую терапию, и пациентов, которым была выполнена ВДПХТ с ауто-ТГСК, не выявлено достоверных различий в общей выживаемости (0,78 и 0,22; $p=0,7$) и безрецидивной выживаемости (0,32 и 0,0; $p=0,9$). Тем не менее, следует отметить разницу в прогнозе между группами реципиентов ТГСК, находившихся на момент ВДПХТ в полной и частичной ремиссии (0,6 и 0,18; $p=0,17$). Также наблюдается достоверная разница в безрецидивной выживаемости между пациентами, достигшими полной ремиссии после индукционной терапии, которые в дальнейшем получали поддерживающую и интенсивную ПХТ (0,6 и 0,0; $p=0,3$).

Выводы. ВДПХТ с ауто-ТГСК для группы высокого риска пациентов с саркомой Юинга / PNET обладает приемлемой токсичностью и позволяет значительно снизить частоту рецидивов у пациентов, достигших полной ремиссии на момент выполнения ВДПХТ. Применение ВДПХТ в качестве терапии «спасения» при резистентных формах заболевания неэффективно.

Актуальность определения В- и Т-лимфоцитарной клональности при верификации диагноза лимфомы

Н.А. Казило¹, Е.С. Захарова¹, Д.Н. Стефанов²,
М.Н. Синицына², А.М. Ковригина²

¹Институт биологии гена РАН;

²Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Лимфомы — опухоли, происходящие из лимфоидных клеток иммунной системы. Своевременная диагностика лимфопролиферативных заболеваний актуальна в свете появления новых терапевтических препаратов, нацеленных на определенные мишени в опухолевой клетке. Одной из задач диагностики В- и Т-клеточных лимфом является применение молекулярно-генетических методов верификации диагноза, в частности метода определения клональности в популяции лимфоцитов. Определение В- и Т-лимфоцитарной клональности часто играет значительную роль при верификации диагноза в сложных и спорных случаях лимфопролиферативных заболеваний, когда другие методы исследования не могут однозначно отличить лимфому от реактивных состояний.

В норме в тканях присутствует поликлональная популяция В- и/или Т-лимфоцитов с разными вариантами генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. При злокачественной трансформации одна из клеток с одной конкретной конфигурацией генов начинает размножаться, образуя моноклональную популяцию.

Цель данной работы — исследование на лимфоцитарную клональность образцов тканей пациентов в сложных случаях установки и верификации диагноза.

В исследование был включен 41 пациент с лимфопролиферативными заболеваниями различной природы (28 пациентов с В-клеточными лимфомами, 13 — с Т-клеточными). Было исследовано 43 образца биоптата различных тканей пациентов, заключенных в парафиновые блоки. Для определения клональности лимфоцитов использовали ПЦР-метод исследований реаранжировок генетических локусов тяжелых цепей иммуноглобулина (IGH) и γ -цепи Т-клеточного рецептора (TCR γ). Результаты определялись методом капиллярного гель-электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора.

В результате проведенного исследования моноклональные перестановки гена тяжелой цепи иммуноглобулина были выявлены в 70 % случаев (21/30), используя 2 мишени Fr3 (12/30, 40 %) и Fr2 (17/30, 57 %). Моноклональность по двум мишеням выявлялась в 69 % лимфом постгерминального и постфол-

ликулярного происхождения, которые представляют особую сложность при установлении точной нозологической формы заболевания. Данные заболевания характеризуются большим количеством соматических гипермутаций, что может приводить к нарушению сайтов связывания праймеров.

Моноклональные перестановки были обнаружены для гена γ -цепи Т-клеточного рецептора в 46 % случаев (6/13 образцов). В частности, лимфоцитарная клональность, выявленная в тканях пациентов, страдающих грибовидным микозом, составляла 29 %, и в этих случаях подтверждался диагноз злокачественной лимфомы по целому спектру диагностических признаков. Грибовидный микоз, особенно на ранних стадиях заболевания, часто схож по проявлениям с многочисленными доброкачественными кожными заболеваниями. Метод выявления лимфоцитарной клональности при данном заболевании позволяет на ранних стадиях дифференцировать грибовидный микоз от многочисленных кожных нозологий. Рассмотренный метод исследования клональности В- и Т-лимфоцитов помогает установить правильный диагноз в сложных клинических ситуациях, составляющих примерно 10 % от всех лимфоидных пролифераций.

Изоформы лиганда WNT11 и их функциональные свойства

**А.В. Кибардин, А.В. Посвятенко, К.В. Куликова,
Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин**
Институт биологии гена РАН, Москва

Сигнальный путь Wnt является мощным сигнальным каскадом, играющим важную роль как в раннем эмбриональном развитии, так и при развитии онкологических заболеваний. «Каноническим» называют сигнальный путь, регулирующий активность транскрипционных факторов семейства TCF/Lef, ключевой молекулой которого является бета-катенин. В отсутствие активации бета-катенин фосфорилируется в результате связывания с дестабилизирующим комплексом белков, состоящим из APC, Axin, GSK3b и CK1a, что приводит к его протеосомной деградации. Активация «канонического» сигнального пути происходит при связывании лигандов семейства Wnt с трансмембранными рецепторами Frizzled и ко-рецепторами LRP5/6, что приводит к опосредованному Dishevelled разрушению дестабилизирующего комплекса. В результате происходит накопление бета-катенина и его транслокация в клеточное ядро, где он может регулировать транскрипционную активность факторов семейства TCF. Молекулярные механизмы, в которых задействованы компоненты сигнального пути Wnt, также могут оказывать влияние на реорганизацию клеточного цитоскелета, клеточную подвижность и клеточную поля-

ризацию независимо от транскрипционной активности TCF/Lef. Такие процессы относят к «неканоническому» сигнальному пути Wnt. Считается, что «неканонический» сигнальный путь может вызывать активацию малых ГТФ-аз Rac и Rho, кроме того, описана возможность его влияния на уровень внутриклеточного кальция.

Выбор конкретного пути передачи сигнала зависит от набора клеточных рецепторов, и в случае «неканонического» сигнального пути ко-рецепторами для семейства Frizzled вместо LRP5/6 служат ROR1/2 или Ryk. Способность лиганда вызывать взаимодействие рецептора и ко-рецептора определяет выбор между «каноническим» и «неканоническим» путем передачи сигнала, и возможна комбинация рецепторов, при которой «неканонический» лиганд может активировать «канонический» сигнальный путь.

Wnt11 является лигандом, способным активировать «неканонический» сигнальный путь Wnt. В данной работе нами была изучена возможная роль лиганда *Wnt11* в процессах, оказывающих влияние на формирование опухолевого фенотипа. Также был обнаружен механизм регуляции функциональной активности лиганда *Wnt11*, основанный на альтернативном сплайсинге.

Содержание D-димера в периферической крови как один из критериев физиологического течения беременности и раннего послеродового периода

П.А. Кирюшенков, М.А. Тамбовцева, Е.В. Андамова
*ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова
Минздравсоцразвития России, Москва*

Во время беременности происходят адаптационные изменения в системе гемостаза, выражающиеся в повышении общего коагуляционного потенциала крови, снижении содержания естественных ингибиторов свертывания, угнетении фибринолиза, сопровождающиеся повышением содержания конечных продуктов этого процесса.

Среди различных маркеров внутрисосудистого тромбообразования наибольший научно-практический интерес представляет определение D-димера, поскольку его концентрация в периферической крови достаточно высока, а период циркуляции в кровотоке составляет до 8 часов.

Цель исследования — оценка гемостазиологических показателей при физиологической беременности и в раннем послеродовом периоде и динамический контроль содержания D-димера как одного из

основных маркеров внутрисосудистого свертывания.

Материалы и методы. Ретроспективное исследование. Критерии включения: здоровые беременные и роженицы в раннем послеродовом периоде. Критерии исключения: отягощенный тромбеморрагический семейный анамнез, врожденные и приобретенные тромбеморрагические состояния, тяжелые соматические заболевания, осложненное течение предыдущих беременностей.

Взятие образцов крови производилось в сроки 6–8 недель, 23–25 недель, 32–34 недели и на третьи сутки после родоразрешения, что соответствовало так называемым «критическим» срокам беременности и послеродового периода.

Исследование системы гемостаза включало: определение концентрации фибриногена, АЧТВ, АВР, тромбоэластографию, определение уровня РКМФ, оценку функциональной активности тромбоцитов с использованием стимуляторов АДФ $1 \cdot 10^{-3}$ М, коллагена 0,04 мг/мл.

Определение D-димера производилось на коммерческой тест-системе D-Dimer Innovance (Siemens, Германия), которая основана на так называемом методе микролатексной агглютинации (иммунотурбидиметрический метод).

Результаты. Проведенный ретроспективный анализ показал отсутствие существенных отклонений в течении беременности и раннего послеродового периода у обследованных женщин (56 наблюдений). Средний возраст обследованных составлял $25,3 \pm 1,3$ года, первородящих было 39 женщин, повторнородящих — 17.

Динамическое гемостазиологическое исследование выявило адаптационные изменения в системе гемостаза во время беременности, проявляющиеся со II триместра. Это характеризовалось увеличением концентрации фибриногена с $3,5 \pm 0,4$ г/л до $5,7 \pm 0,5$ г/л ($p < 0,05$). По данным тромбоэластографии хронометрические показатели ($r + k$) уменьшились с $20,8 \pm 0,2$ мм до $16,6 \pm 0,2$ мм ($p < 0,05$), показатели структурной коагуляции (И.Т.П.) увеличились с $10,1 \pm 0,5$ у. е. до $14,2 \pm 0,3$ у. е. ($p < 0,05$). По мере прогрессирования беременности отмечалась тенденция к повышению функциональной активности тромбоцитов. Об активности образования тромбина свидетельствовало увеличение частоты встречаемости положительных проб на РКМФ. На третьи сутки после родоразрешения отмечалась даже тенденция к нарастанию тромбофилии.

Наибольший интерес представляют данные о динамике содержания D-димера как маркера внутрисосудистого свертывания. Если в I триместре его содержание практически не отличалось от уровня у небеременных женщин и составляло $341,4 \pm 22,6$ мкг/л, то во II триместре увеличилось до $1085,4 \pm 65,4$ мкг/л ($p < 0,05$), в III триместре — $1705,2 \pm 88,5$ мкг/л, а на третьи

сутки после родов оно достигало максимальных значений — $1884,0 \pm 65,5$ мкг/л. Подобные особенности вне беременности можно было бы охарактеризовать как хроническую форму ДВС-синдрома.

Выводы:

1. Важным преимуществом определения уровня D-димера является отсутствие значительных технических сложностей при выполнении методики, возможность динамического мониторинга, что крайне необходимо в акушерской практике.

2. Превышение содержания D-димера в периферической крови по сравнению с гестационными нормативами и параметрами в раннем послеродовом периоде является маркером патологического тромбообразования и может рассматриваться как предиктор различных акушерских осложнений, таких как преэклампсия, плацентарная недостаточность, преждевременная отслойка плаценты, а также тромботических осложнений в послеродовом периоде.

Аkt/mTOR-зависимое ингибирование супрессора опухолевого роста Pdc4 в клетках рака легкого и его молекулярные механизмы

И.В. Коробко, П.Н. Вихрева, М.В. Шепелев,
Е.В. Коробко

Институт биологии гена РАН, Москва

Экспрессия супрессора опухолевого роста Pdc4 часто снижена или потеряна в опухолевых клетках различного происхождения. Снижение экспрессии Pdc4 коррелирует с прогрессией опухоли и может сопровождаться резистентностью опухолевых клеток к действию ряда химиотерапевтических препаратов. В различных экспериментальных моделях восстановление экспрессии Pdc4 в опухолевых клетках приводило к ряду позитивных с клинической точки зрения эффектов: снижению пролиферативной активности, увеличению чувствительности к химиотерапевтическим препаратам, индукции апоптоза. Это определяет интерес к Pdc4 как к диагностическому и прогностическому маркеру, а также как к мишени для противоопухолевой терапии. Считается, что центральную роль в супрессии Pdc4 играют 2 механизма: микроРНК miR-21-зависимая деградация транскрипта Pdc4 и ингибирование трансляции с него, а также Akt/mTOR/S6K1-зависимая протеолитическая деградация белка Pdc4. Однако существенность этих молекулярных механизмов в клетках рака легкого остается неясной. В то же время именно для опухолей легкого снижение уровня транскрипта Pdc4 является значимым прогностическим фактором, и подобные опухоли рассматриваются как одна из первоочередных мишеней для генной терапии

с использованием Pdcd4. Нами продемонстрировано, что Akt-сигнальный путь действительно играет существенную роль в супрессии Pdcd4 в клетках рака легкого. Однако в отличие от ранее описанных механизмов активация Akt-сигнального пути не вызывает выраженной протеолитической деградации Pdcd4. В то же время нами впервые обнаружено, что ингибирование Akt-сигнального пути приводит к увеличению уровня транскрипта Pdcd4, вероятно, влияя непосредственно на транскрипцию Pdcd4, а не будучи опосредованным изменением стабильности транскрипта. Таким образом, нами выявлена существенная роль Akt/mTOR-сигнального пути в супрессии Pdcd4 в клетках рака легкого и описан новый молекулярный механизм Akt-зависимой супрессии Pdcd4. С практической точки зрения, установленная значимость Akt-зависимой супрессии Pdcd4 в клетках рака легкого в совокупности с противоопухолевыми эффектами от восстановления экспрессии Pdcd4 еще раз подчеркивают значимость Akt-сигнального пути как одной из мишеней в лечении рака легкого.

Частоты аллелей генов главного комплекса гистосовместимости у детей с онкогематологическими заболеваниями и их родственников в Российской Федерации

В.В. Красавина¹, О.А. Шрагина², В.О. Бобрынина¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России;

²ФГУ Российская детская клиническая больница Минздрава России, Москва

Система HLA (Human Leukocyte Antigen) — комплекс генов главного комплекса гистосовместимости человека — обеспечивает регуляцию иммунного ответа, осуществляет такие важнейшие физиологические функции, как взаимодействие иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих, в том числе измененных, и чужеродных клеток, запуск и реализация иммунного ответа и, в целом, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзотической и эндогенной агрессии. Комплекс генов HLA компактно расположен на коротком плече 6-й хромосомы, занимает 3500 kb (тысяч пар оснований) и содержит более 220 генов. Областью практического применения знаний о системе HLA в настоящее время в первую очередь является трансплантация органов и тканей, где совместимость по антигенам HLA важна при подборе доноров.

Цели работы. Определение HLA-генотипов реципиентов для поиска родственного или нерод-

ственного донора костного мозга, а также донорских гемопоэтических клеток пуповинной крови при помощи технологии PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers) — аллель-специфическая амплификация с последующей детекцией методом электрофореза.

Типирование проводилось как в низком, так и в высоком разрешении по 17 группам аллелей локуса HLA-A, по 28 группам аллелей локуса HLA-B, по 15 группам аллелей локуса HLA-Cw, по 13 группам аллелей локуса HLA-DRB1 и по 5 группам аллелей локуса HLA-DQB1.

Результаты. За период 05.2009—04.2011 в лаборатории молекулярной биологии ФГУ ФНКЦ ДГОИ проведено определение HLA-антигенов 608 реципиентов и возможных доноров. Для поиска неродственного донора 168 пациентам было проведено типирование высокого разрешения по 5 локусам. Для поиска донорских гемопоэтических клеток пуповинной крови 23 пациента были типированы в низком разрешении по 5 локусам и в высоком разрешении — по локусу DRB1.

Были обследованы 150 пациентов и их сиблинги для поиска родственного HLA-совместимого донора костного мозга. Все пациенты и сиблинги были типированы в низком разрешении по II классу HLA-антигенов (HLA-DRB1 и HLA-DQB1), а при совпадении полученных результатов и по I классу (HLA-A, HLA-B и HLA-Cw). По данным исследования полностью идентичными HLA-фенотипами обладали 40 пар сиблингов (24 % от общего числа обследованных групп), что полностью соотносится с законом расщепления признаков при условии наследования генов главного комплекса гистосовместимости как гаплотипов. В одной семье была выявлена двойная рекомбинация, произошедшая у матери, в результате чего гены HLA-B, HLA-C и DRB4 были перемешены с одной хромосомы на другую.

Частоты аллелей генов HLA-системы представлены в таблице. Для определения полного спектра аллелей генов главного комплекса гистосовместимости представителей российской популяции потребуются дальнейшее типирование.

Ошибки в диагностике острых лейкозов на догоспитальном этапе у детей в Москве и Московской области

Я.А. Круглова, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, Е.В. Клейна, Н.В. Евдачева

ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения города Москвы

Одну из главных ролей в своевременной диагностике острых лейкозов играет онкологическая насто-

A*	%	A*	%	B*	%	B*	%	DRB1*	%	DRB1*	%
01	10,65	0101	9,79	41	2	4101	1,22	01	11,41	0101	9,67
		0103	0,3			4102	1,52			0102	2,54
02	26,75	0201	24,33	44	8,44	4402	5,79			0103	0,51
		0205	2,08			4403	1,22	03	8,95	0301	8,14
		0206	1,19			4405	0,3			0401	4,33
03	14,98	0301	11,28			4411	0,3	04	15,02	0402	1,78
		0302	1,19			4427	0,61			0403	1,53
		0368	0,3			4501	0,61			0404	2,54
11	6,44	1101	4,15			4601	0,61			0405	1,02
		1166	0,3							0407	1,27
23	1,33	2301	0,59							0408	0,25
		2402	13,35	45	0,33			07	14,7	0701	15,01
24	11,65	2403	0,3			4901	1,83			0801	2,8
		2404	0,59	50	2	5001	1,83	08	3,12	0803	0,51
		2430	0,3			5101	6,4			0901	1,27
				51	6,22	5105	0,3	09	2,13	0906	0,25
25	4,66	2501	6,23			5201	3,05			1001	3,05
		2601	5,64	52	3,55	5301	0,91	10	1,07	1101	5,6
26	5,66	2608	0,3			5501	0,61			1102	0,25
		2902	1,19	53	0,33	5601	0,91	11	12,89	1103	0,51
30	2	3001	1,48			5701	3,35			1104	5,09
		3002	0,59	56	0,67	5702	0,3			1116	0,25
		3004	0,59			5801	1,83			1201	2,54
31	3,22	3101	2,97	57	3,33	7301	0,3			1206	0,25
		3106	0,59					12	1,89	1301	6,36
		3108	0,3	73	0,22					1302	3,56
32	2,66	3201	1,19					13	10,43	1303	1,27
		3301	1,48	01	4,64	0102	4,79			1401	0,51
33	1,66	3303	0,89			0103	0,19			1403	0,76
43	0,22			02	5,59	0202	4,41	14	3,45	1435	0,25
						0208	0,19			1454	1,02
66	0,44	6601	0,89	03	14,05	0302	1,53			1501	9,67
		6801	2,97			0303	4,02	15	12,07	1502	2,8
68	6,33	6802	1,19			0304	6,51			1601	2,8
		6824	1,19			0316	0,38	02	20,32	0201	7,39
69	0,11	6901	0,3	04	11,05	0401	11,49			0202	10,84
						0501	4,21			0204	0,25
B*	%	B*	%	05	4,23	0520	0,38	03	38,05	0301	20,94
						0602	13,6			0302	10,59
07	9,66	0702	7,01	06	12,82	0701	10,34			0303	6,16
		0705	0,3			0702	10,73			0304	0,25
08	5,88	0801	6,71	07	23,33	0704	1,53			0306	0,49
		1302	6,4			0802	1,34			0308	0,25
14	1,89	1402	2,74	08	2,05	0825	0,38			0313	0,25
		1501	4,57			1104	0,38			0319	0,25
		1505	0,61	11	0,27	1202	3,45	04	2,16	0401	0,49
15	7,88	1511	0,61			1203	10,73			0402	2,22
		1801	8,23	12	12,41	1402	0,77	05	18,4	0501	14,29
		2702	0,61			1403	0,38			0502	1,97
27	5,88	2703	0,3	14	1,36	1502	1,34			0503	1,72
		2705	2,44			1504	0,19			0504	0,99
		2714	0,3	15	3	1505	1,15	06	21,07	0601	3,45
		3501	4,88			1506	0,19			0602	10,34
35	9,43	3502	2,44			1513	0,19			0603	4,68
		3503	3,35			1601	0,77			0604	1,97
37	1,11	3701	2,13			1602	0,96			0609	0,25
		3801	4,27			1604	0,77				
38	4,22	3901	0,61	16	2,86	1701	0,57				
		3906	0,61			1703	1,72				
39	1,89	4001	2,74	17	2,05	1802	0,38				
		4002	4,27								
40	6,44			18	0,27						

роженность врачей первичного звена. Крайне необходимо знание начальных клинических проявлений заболевания, «масок» острого лейкоза и показателей периферической крови при данной патологии.

Цель исследования — проанализировать возможные ошибки, связанные с интерпретацией гемограмм и начальными клиническими проявлениями, в диагностике острых лейкозов у детей.

Материалы и методы. Были проанализированы данные анамнеза заболевания 220 детей МДКБ № 1 (Москва) и МООД (Балашиха) за период с 01.10.2008 по 31.05.2010. Выполнен анализ количества дней от начала клинических проявлений до госпитализации детей больных острым лейкозом (ОЛ) в специализированные гематологические отделения.

Результаты. Интервал времени от начала проявления клинической симптоматики до госпитализации ребенка в специализированное гематологическое отделение составил от 3 дней до 4 месяцев, в зависимости от клинической картины и тяжести состояния больного. Основной причиной диагностических ошибок было несвоевременное назначение исследования общего анализа периферической крови (ОАК). У 9 (4,09 %) пациентов диагноз ОЛ был выявлен при диспансерном плановом обследовании и при плановом патронаже педиатра. Самый короткий период постановки диагноза у 16 (7,27 %) детей с геморрагическим и острым абдоминальным синдромами составил 3–4 дня. В хирургическое отделение с подозрением на острый аппендицит были госпитализированы 7 (3,18 %) пациентов с острым абдоминальным синдромом, одному (0,35 %) из них провели аппендэктомию. Самый длительный период до госпитализации в стационар у 21 (9,55 %) пациента с артралгическим и оссалгическим синдромами составил 3–4 мес. У 124 (56,36 %) пациентов с вирусной инфекцией (ОРВИ, пневмония, бронхит, рецидивирующий отит, ларинготрахеит, лимфоаденопатия) период госпитализации составил от 2 до 6 недель. У 4 (1,81 %) пациентов ОЛ дебютировал с экзофтальма, обследование проходило в МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца. У 3 (1,36 %) пациентов заболевание начиналось с инфекции мочеполовых путей. Неврологическая симптоматика наблюдалась у 3 (1,36 %) пациентов и период до госпитализации составил в среднем 4–6 недель. Родители 3 (1,36 %) детей самостоятельно обратились к гематологу в связи с нарастающей бледностью ребенка. Пять пациентов (2,27 %) лечились амбулаторно по месту жительства с диагнозом анемия в течение 4–8 недель. Одному больному (0,45 %) через месяц от начала заболевания был установлен диагноз менингококцемия с последующей госпитализацией в инфекционное отделение, где был поставлен диагноз ОЛ. Практически во всех случаях ОАК назначали не ранее чем через 3–5 недель от начала клинических проявлений или первично уже в стационаре. Очень часто дети поступали в специализированный стационар пролечен-

ные гормональной терапией, что значительно затрудняло окончательную диагностику с верификацией варианта по FAB-классификации и отягощало течение заболевания с ухудшением прогноза. При проведении ОАК в диагностических лабораториях диагностика ОЛ была затруднена в связи с использованием гематологических автоматических анализаторов без подсчета количества бластных клеток в ПК. Выявлять бластные клетки можно только при банальной иммерсионной микроскопии, которая в клинической диагностической лаборатории делается выборочно.

Заключение. Основной причиной ошибок несвоевременной диагностики ОЛ является недостаточное обследование детей (ОАК), отсутствие индивидуального подхода к лабораторным исследованиям и отсутствие онкологической настороженности у врачей первичного звена. Необходимо помнить, что: «нет такого заболевания, маску которого не принял бы острый лейкоз» (И.А. Кассирский).

Выявление роли лигандов WNT в формировании агрессивного опухолевого фенотипа линий меланомы человека

К.В. Куликова, А.В. Кибардин, А.В. Посвятенко,
Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин
Институт биологии гена РАН, Москва

Несмотря на то, что меланома составляет лишь небольшую часть всех кожных новообразований, она является основной причиной смерти среди пациентов с заболеваниями кожи. Высокая смертность больных меланомой связана с агрессивным характером опухолей данного вида. Разрушение межклеточных контактов, перестройка цитоскелета, увеличение подвижности клеток и устойчивость к апоптозу дают возможность трансформированным клеткам распространиться по всему организму. На молекулярном уровне эти процессы сопровождаются ингибированием экспрессии маркеров эпителиальных клеток и супрессора метастазирования KISS-1, усилением продукции маркеров, ассоциированных с клеточной подвижностью, и протеаз, деградирующих внеклеточный матрикс, а также изменениями в экспрессии генов *WNT*. Считается, что сигнальный путь, активируемый белками семейства WNT, принимает участие в формировании и развитии меланом. В процессе эмбрионального развития сигнальный путь WNT задействован в регуляции межклеточных взаимодействий, кроме того, существуют данные, описывающие его роль в контроле подвижности клеток. Известно, что при меланоме экспрессия лигандов сигнального пути WNT часто повышена. Изучение экспрессии маркеров, ассоциированных с изменениями клеточной подвижности, может дать ценные знания для пред-

сказания степени прогрессии заболевания, а также для оценки шансов на выживание пациентов.

В рамках данной работы набор клеточных линий меланомы человека был охарактеризован на основании наличия и уровня экспрессии маркеров, ассоциированных с регуляцией клеточной подвижности, а также по наличию и уровню экспрессии различных лигандов сигнального пути WNT. Было обнаружено, что, несмотря на то, что характер экспрессии изученных генов значительно варьирует в исследованных клеточных линиях, экспрессия некоторых маркеров, ассоциированных с повышенной клеточной подвижностью, коррелирует с экспрессией лигандов сигнального пути WNT. Полученные данные говорят как о возможном существовании различных механизмов формирования агрессивного опухолевого фенотипа меланом, так и о характере участия белков семейства WNT в формировании агрессивного фенотипа клеточных линий меланомы человека.

Тромболизат как альтернатива фетальной бычьей сыворотке при экспансии стромальных клеток костного мозга *in vitro*

**К.В. Лепик, О.В. Бурданова, И.М. Бархатов,
Б.В. Афанасьев**

*Институт детской гематологии и трансплантологии
им. Р.М. Горбачевой ГОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова*

В настоящее время в большинстве протоколов для экспансии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга используются питательные среды с добавлением фетальной телячьей сыворотки (ФТС), которая может являться источником ксеногенных антигенов и инфекционных агентов. В качестве альтернативы ФТС можно рассматривать тромболизат (ТЛ), получаемый из обогащенной тромбоцитами плазмы человека.

Цель работы. Оработка методики получения ТЛ, оценка его биологической активности и возможности использования в качестве альтернативы ФТС.

Материалы и методы. Изучалась пролиферативная активность МСК; оценивался иммунофенотип, экспрессия ряда генов, способность к дифференцировке и поддержке гемопоэза при использовании ФТС в качестве супплемента, ТЛ, а также бессывороточной среды.

Результаты. При оценке колониеобразования в первичной культуре МСК было выявлено, что при использовании ТЛ количество колониеобразующих единиц фибробластов было выше по сравнению с ФТС. При долговременном культивировании различий в пролиферативной активности МСК не на-

блюдалось. На фоне культивирования в среде с ТЛ по сравнению с ФТС отмечалось снижение доли CD14⁺-клеток, а также снижение экспрессии генов *NGF*, *osteopontin*, *ITGA7*, *NTF3*. Способность к дифференцировке в остеобласты у МСК после экспансии с использованием ТЛ была выше по сравнению с ФТС.

Выводы. При экспансии с использованием ТЛ отмечается изменение дифференцировочного потенциала МСК, сопровождаемого снижением экспрессии ряда генов на фоне сопоставимых с ФТС пролиферативных характеристик.

Анализ динамики плавления продуктов полимеразной цепной реакции для поиска гистосовместимого родственного донора

В.В. Мустяца¹, В.О. Бобрынина²

¹*Физический факультет Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова;*

²*ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской
гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравсоцразвития России, Москва*

Цель исследования. Разработать условия применения метода анализа динамики плавления в высоком разрешении (HRM) для поиска гистосовместимого родственного донора.

Материалы и методы. В ходе исследования были проанализированы образцы ДНК 57 человек из 20 семей. Для каждого образца были проведены 3 независимые полимеразные цепные реакции (ПЦР) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя EvaGreen для амплификации вторых экзонов генов *DRB1* и *DQB1* II класса главного комплекса гистосовместимости (HLA): одна ПЦР для *DRB1* и две — для *DQB1*. После ПЦР полученные фрагменты плавилась в диапазоне 75–95 °С. ПЦР и плавление в высоком разрешении (HRM) проводились на приборе Rotor Gene 6000 производства Corbett Research (Австралия). Анализ динамики плавления продуктов ПЦР осуществлялся при помощи стандартного программного обеспечения прибора.

Результаты. Анализ динамики плавления ПЦР-продуктов проводился внутри каждой семьи, были определены сибсы, имеющие такие же кривые плавления в трех ПЦР, как и пациенты. В дальнейшем эти данные были сопоставлены с результатами сиквенс-специфической ПЦР (PCR-SSP) генов *DRB1* и *DQB1*, полученных с использованием реактивов для HLA-типирования производства Invitrogen. При совпадении кривых плавления совпадали и аллели, определенные методом PCR-SSP, а при различии в динамике плавления результаты HLA-типирования также различались. Таким образом, результаты груп-

пировки, полученные методом HRM, полностью совпали с группировкой по результатам сиквенс-специфической ПЦР.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют, что метод HRM позволяет устанавливать совпадение или несовпадение аллелей генов *DRB1* и *DQB1* HLA II класса у пациентов и их родственников.

Данный метод имеет следующие преимущества перед стандартным HLA-типированием:

- возможность одновременного тестирования большого количества образцов;
- отсутствие необходимости проведения фореа;
- снижение вероятности контаминации лаборатории ПЦР-продуктом;
- снижение фактической стоимости данного этапа исследования.

Получаемый методом HRM качественный результат позволяет быстро выявить возможного родственного донора. Применение данного метода не исключает необходимости дальнейшего типирования всех генов главного комплекса гистосовместимости, но дает возможность проводить это исследование только для гистосовместимых родственников пациента.

Значение теста генерации тромбина в клинической практике

Ю.А. Наместников, О.Г. Головина, Л.П. Папаян
ФГУ Российский научно-исследовательский
институт гематологии и трансфузиологии
ФМБА России, Санкт-Петербург

Значимость лабораторной оценки состояния системы свертывания крови в современной клинической практике сложно переоценить. Сегодня на 1-е место среди причин смертности выступают заболевания, в патогенезе которых большую роль играет повышенная способность крови к образованию тромбов — состояние гиперкоагуляции. Поэтому особенно важным представляется выявление именно гиперкоагуляционных проявлений при различных заболеваниях.

Для широкой клинической практики важными представляются данные так называемых супрамолекулярных методов исследования гемостаза — таких тестов, которые оценивают систему в целом, во взаимодействии, и дают функциональную характеристику ее состояния. Одним из таких методов является тест генерации тромбина (ТГТ). В этом исследовании оценивается динамика образования и инактивации ключевого фермента гемостаза — тромбина. Показатели этого процесса отражают функциональное состояние, возникающее при взаимодействии между собой как про-, так и антикоагулянтных факторов. Показатели коагулограммы могут находиться в пределах нормы, в то время как в функциональном ТГТ

выявляется повышение параметров, что свидетельствует о наличии гиперкоагуляции.

Обратную ситуацию можно наблюдать в случае, когда изменения отдельных показателей коагулограммы не сопровождаются изменением ТГТ. Так, например, у пациента могут быть повышены фактор VIII, фактор Виллебранда и уровень D-димера, на основании чего клиницист может предположить наличие гиперкоагуляции и назначить антикоагулянтную терапию для профилактики тромбоза. Но увеличение активности отдельных прокоагулянтных факторов может быть нивелировано повышением активности антикоагулянтных факторов. Показатели ТГТ в таком случае будут в пределах нормы. Следовательно, руководствуясь данными коагулограммы, можно получить ложноположительное представление о наличии у пациента гиперкоагуляции при ее реальном отсутствии.

Другая клиническая проблема связана с мониторингом антикоагулянтной терапии. Например, у пациентов, получающих варфарин, руководствуются правилом достижения целевого значения МНО, при котором терапия считается адекватной. Но как объяснить, что у пациентов с одинаковыми значениями МНО показатели ТГТ могут значительно отличаться? Равнозначен ли эффект при достижении одного и того же целевого значения МНО у 2 пациентов. Можно ли считать терапию у них одинаково эффективной?

Существует мнение, что мониторинг терапии низкомолекулярными гепаринами (НМГ) не обязателен по причине линейной зависимости их влияния на активный фактор X. В случае необходимости предлагается проводить мониторинг по исследованию изменения анти-Xa активности. Об изменении свойств системы гемостаза предлагается судить по изменению активности только одного фактора. Как показали Al Dieri et al. (2006), при назначении одинаковых доз фраксипарина даже здоровым лицам недостаточная доза наблюдалась в 13%, а передозировка — в 11% случаев. Эта работа демонстрирует необходимость лабораторного контроля за эффектом от введения НМГ с помощью глобальных тестов, а также неправомерность суждения о гемостазе в целом по изменению всего лишь одного показателя — анти-Xa-активности.

Большое значение в клинической практике сегодня придается выявлению у пациентов врожденной тромбофилии. Но всегда ли их присутствие сопровождается развитием гиперкоагуляции? Какие результаты можно получить при функциональном исследовании гемостаза, например у гетерозиготных носителей мутации фактора V Лейден, которая на сегодняшний день признана клинически значимой в развитии гиперкоагуляционного состояния. Известен следующий факт: у одного из сибсов, у которых выявлена данная мутация, развиваются тромбоэмболические осложнения, а у другого нет. Как показыва-

ет ТГТ, у одного из них имеет место гиперкоагуляция и АРС-резистентность, в то время как у другого показатели ТГТ в норме. Это позволяет объяснить различную реализацию одного и того же генетического дефекта компенсаторными механизмами.

Таким образом, использование метода глобальной оценки системы гемостаза, в данном случае ТГТ, позволяет получить представление о состоянии гемостаза в целом, выявить гиперкоагуляцию, а также оценить эффективность антитромботической терапии.

Иммуногенная эффективность вакцинопрофилактики вирусного гепатита В среди детей с онкогематологическими заболеваниями: сравнительная оценка двух режимов

Н.В. Опалева¹, Е.В. Полевиченко², К.С. Асланян¹,
Е.В. Васильева¹, Л.Д. Орешкина¹, А.Х. Хаспекян¹,
И.В. Яценко¹, О.В. Салмашова², Л.В. Гончарова¹,
Н.В. Краснянская¹

¹Областная детская больница;

²ГОУ ВПО Ростовский государственный
медицинский университет, Ростов-на-Дону

Высокое медико-социальное значение вирусного гепатита В (ВГВ), вакциноуправляемый характер данной инфекции и отсутствие единых национальных рекомендаций по вакцинопрофилактике для детей с онкогематологическими заболеваниями (ОГЗ) определяют поиск оптимальных протоколов специфической иммунопрофилактики ВГВ в комплексе сопроводительной терапии.

Цель исследования. Сравнительное изучение иммуногенной эффективности 2 режимов вакцинопрофилактики (ВП) ВГВ: 1) рутинной ВП ВГВ, проведенной в анамнезе больных ОГЗ на первом году жизни; 2) ВП ВГВ, выполненной по эпидпоказаниям у ранее не привитых пациентов на фоне программной ПХТ гемобластозов и солидных опухолей.

Материалы и методы. Проведено динамическое ИФА-исследование диагностической панели серологических маркеров ВГВ (HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe, anti-HB-corAgIgG, anti-HB-cor-AGIgM) и количественная оценка уровня anti-HBs (мМЕ/мл) в 2 группах больных: 1-я группа — дети с ОГЗ ($n=192$), без ВП в анамнезе, привитые по схеме 0–1–2–6–12 месяцев удвоенной дозой рекомбинантной вакцины для профилактики ВГВ с первых дней программной ПХТ; 2-я группа — дети с ОГЗ ($n=47$), ранее рутинно вакцинированные по схеме 0–3–6 месяцев.

Результаты. При оценке иммуногенной эффективности ВП ВГВ через 3 месяца после ее завершения у детей с ОГЗ в 1-й группе уровень серопротек-

ции (> 10 мМЕ/мл) составил 58,0% при среднем показателе anti-HBs — $54,3 \pm 9,8$ мМЕ/мл, что свидетельствовало о достаточной эффективности ВП. Во 2-й группе уровень серопротекции составил 42,6%, а средние значения anti-HBs — $57,8 \pm 12,2$ мМЕ/мл на сроке после завершения ВП ВГВ, равном $36,8 \pm 5,7$ мес. Отмечена умеренная отрицательная корреляция по Пирсону ($p < 0,05$) между уровнем anti-HBs, количеством CD3⁺-лимфоцитов ($\times 10^9$ /л) и IgG (г/л) у детей 2-й группы. Таким образом, в дебюте ОГЗ отмечен относительно невысокий уровень серопротекции против ВГВ у детей с завершённой в анамнезе ВП ВГВ, проведенной в рамках Национального календаря, хотя средние значения anti-HBs в данной группе достоверно превышают протективный уровень, принятый у здоровых лиц (10 мМЕ/мл). Можно предположить, что оптимальное сочетание двух режимов вакцинации в дебюте ОГЗ у детей, не имеющих серопротективного уровня защиты против ВГВ (т. е. их ревакцинация по эпидпоказаниям), успешно модифицировало бы стандартный подход к иммунопрофилактике ВГВ для данной категории иммуносупрессированных лиц.

β -подобная ДНК-полимераза клеток HL-60

А.П. Орлов¹, Д.А. Кузнецов¹, В.П. Чехонин¹,
И.С. Берсенева², Л.Дж. Немер-Гергели³, Ш. Удварди³

¹Кафедра медицинских нанобиотехнологий, Российский государственный медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва;

²Институт белка РАН, Пуццино;

³Биологический исследовательский центр Венгерской академии наук, Сегед, Венгрия

Несмотря на серьезное внимание, уделяемое роли ДНК-полимераз семейства «Бета» в процессах канцерогенеза, ни один из ферментов этой группы не был до сих пор выделен и охарактеризован в случае широко используемой линии клеток миелоидного лейкоза человека HL-60.

В настоящей работе эта задача впервые решена благодаря оригинальной методике фракционирования хроматина, включающей ряд этапов его нуклеазной и химической обработки (нуклеаза S/рибонуклеаза А; 0,5 М NaCl/фенол-хлороформная экстракция; ацетон-преципитация; +37 °С/80 КПа/60 мин; ступенчатый 30–70% градиент насыщения сульфатом аммония; диализ; лиофилизация), завершающихся гель-хроматографией на колонке TOYOPEARL HW-55F 1,6 × 70 см. В результате был выделен высокоочищенный SDS-PAGE-гомогенный белок-мономер (66,5 кДа, $pI=8.35$), обладающий высокой ДНК-полимеразной каталитической активностью.

При этом для данного фермента характерны такие идентификационные параметры, специфиче-

ские для представителей семейства «Бета» (К.Ф. 2.7.7.7.), как:

- отсутствие 3',5'-экзонуклеазной активности мономера;
 - гиперактивация в присутствии 200 mM KCl;
 - устойчивость к Амфидиколу (5,0 мкг/мл) и N-этилмалеимиду (0,5 mM);
 - низкий уровень процессирования при ограничении размеров формируемых фрагментов ДНК до 300 п.
- Степень очистки фермента по отношению к общему белку клеток составила 1:122 000.

Реакция системы крови на различные варианты воспаления

М.В. Пешикова, Е.В. Жуковская, И.И. Долгушин
ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

Цель. Изучить пролиферативный потенциал CD34⁺-клеток у людей на фоне различных воспалительных процессов с учетом типа (острый или хронический) и распространенности (локальный или генерализованный) воспалительного ответа.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование вошли 933 женщины от 16 до 85 лет (средний возраст $38,9 \pm 0,5$ года) и 767 мужчин от 17 до 88 лет (средний возраст $37,5 \pm 0,5$ года) с различными воспалительными заболеваниями (острые инфекционные заболевания, хронические неспецифические гнойно-воспалительные заболевания в стадии ремиссии, хронические аллергические заболевания в стадии ремиссии). Группу контроля составили 63 здоровые женщины от 16 до 50 лет (средний возраст $19,8 \pm 0,4$ года) и 63 здоровых мужчины от 17 до 67 лет (средний возраст $28,2 \pm 1,8$ года). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом флуоресцентной микроскопии с помощью реакции прямой иммунофлуоресценции в модификации С.В. Сибиряка и соавт. (1997).

Результаты. Анализ особенностей мобилизации CD34⁺-клеток у людей на фоне различных воспалительных процессов выявил следующие тенденции:

1. Достоверное повышение процентного числа CD34-лимфоцитов в периферической крови пациентов на фоне острых тяжелых вирусных инфекций.
2. У пациентов на фоне различных хронических заболеваний в периоде ремиссии процентное число CD34-лимфоцитов в кровотоке не отличается от показателей здоровых людей.
3. Не отмечено значительных колебаний в процентном соотношении циркулирующих CD34-лимфоцитов у исследуемого контингента в зависимости от возрастных параметров человека.
4. У пациентов на фоне ареактивных состояний, как и у здоровых лиц, существуют различия в соот-

ношении данной популяции лимфоцитов в зависимости от пола, а именно: у женщин процентное число циркулирующих CD34⁺-клеток выше, чем у мужчин.

Заключение. Соответствие между содержанием CD34⁺-клеток в периферической крови и особенностью воспалительного ответа формирует предпосылки для использования кинетики клеточного пула стволовых кроветворных клеток для биомониторирования тяжести воспаления.

Определение минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта в ходе ПЦР у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников: результаты сравнения методов

А.М. Попов^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2},
Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев³, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница № 1;

²Институт медицинских клеточных технологий;

³ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Цель исследования — оценить сопоставимость результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) при остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) у детей методами многоцветной проточной цитометрии и ПЦР с выявлением химерных транскриптов (ХТр).

Материалы и методы. Было исследовано 229 образцов костного мозга, взятых на разных стадиях программной терапии, а также непрограммного лечения у 56 пациентов. МОБ определяли одновременно методом проточной цитометрии, ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Результаты. При использовании всех методов МОБ-положительны были 130 образцов, а МОБ-негативны — 77. В 20 образцах МОБ была выявлена только методом ПЦР, в 2 — только методом проточной цитометрии. Качественная сходимость результатов проточной цитометрии и ОТ-ПЦР составила 90,4 %. Детальный анализ результатов показал, что сходимость результатов определения МОБ не зависела от типа определяемой молекулярной перестройки, иммунофенотипа опухолевых клеток и наличия в образце нормальных В-линейных предшественников. Однако во время индукционной терапии сопоставимость результатов оказалась достоверно ниже, чем на более поздних этапах лечения (83,8 % и 93,9 % соответственно, $p=0,024$). В образцах, в которых МОБ была выявлена только ме-

тодом ПЦР, уровень МОБ был достоверно ниже, чем в конкордатных образцах ($p < 0,001$). Несмотря на то, что прямое количественное сопоставление результатов определения МОБ методами проточной цитометрии и ПЦР-РВ невозможно, кинетика величины МОБ во время терапии была сходна. Вследствие этого одновременное применение данных методов может с успехом использоваться у пациентов, у которых определяется ХТр. У таких больных, с нашей точки зрения, во время индукционной терапии и в начале консолидации/интенсификации, когда необходимо количественное определение МОБ, предпочтительнее использовать данные проточной цитометрии. В то же время в последующих точках наблюдения, когда достаточно качественного определения МОБ, предпочтительнее использовать результаты определения ХТр в ходе ПЦР вследствие более высокой чувствительности метода.

Экспрессия сплайс-вариантов WNT11 в клетках линии колоректального рака (HT29)

А.В. Посвятенко, К.В. Куликова, А.В. Кибардин,
Г.П. Георгиев, Н.В. Гнучев, С.С. Ларин
Институт биологии гена РАН, Москва

Аномальная активация сигнального пути Wnt показана при различных онкологических заболеваниях, включая 90 % случаев колоректального рака. Аберрантная активация канонического сигнального каскада в большинстве случаев происходит в результате мутаций генов *APC*, *CTNNB1* или *Axin*. Показано, что при колоректальном раке также активирован путь планарной клеточной полярности (Caldwell et al., 2008). Установлено, что в клетках линий опухолей прямой и ободочной кишки экспрессируются различные лиганды семейства Wnt, включая Wnt11 (Suzuki et al., 2004). Белок Wnt11 считается лигандом, активирующим путь планарной клеточной полярности, определяющим поляризацию клеток и их миграцию в процессе гаструляции.

Наша работа посвящена изучению особенностей экспрессии Wnt11 в клетках линии колоректального рака.

ОТ-ПЦР анализ экспрессии Wnt11 в клетках линии колоректального рака (HT29) выявил, что использование разных пар праймеров приводит к амплификации разных вариантов кДНК. Секвенирование последовательности обнаруженных кДНК показало, что они являются результатом альтернативного сплайсинга. Используя экспрессионные конструкции с полученными сплайс-вариантами, мы установили, что белок дикого типа и сплайс-варианты обладают разными свойствами. Новый сплайс-вариант Wnt11 не детектируется в кондиционированной среде, благодаря чему мы предполагаем, что он не явля-

ется секретлируемым белком. Использование двойного люциферазного теста (репортерный ген под контролем TCF/LEF промотора и отрицательный контроль с мутантной областью связывания TCF/LEF) продемонстрировало, что сплайс-вариант теряет способность ингибировать канонический сигнальный путь, присущий Wnt11 дикого типа.

Эти данные дают возможность предположить существование нового механизма взаимного влияния различных ветвей сигнального пути Wnt в процессе формирования и прогрессии опухоли. В то же время возникают новые вопросы, касающиеся причин и последствий альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках.

Клиническая гемостазиология. Рекомендации, регистры, экономика

Е.В. Ройтман

Научное общество «Клиническая гемостазиология»,
ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской
гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравсоцразвития России, Москва

Актуальность проблем патологии свертывания крови при различных заболеваниях и состояниях в дополнительной аргументации не нуждается. Прошедшие 10 лет показали интенсивное развитие гемостазиологии в РФ, позволившее свести к минимуму отставание от развитых стран по доступности для применения современных средств диагностики и коррекции патологии гемостаза. Патология гемостаза не является специфичной для какой-то одной области медицины. Всеобщее внимание к данной проблеме обуславливает интенсивное развитие ее доказательной базы, которая становится основой для международных и российских Рекомендаций. Также все шире в рутинную практику внедряется и другой подход — Регистры, декларирующие индивидуализацию оценки. Данные подходы (на основе Рекомендаций и на основе Регистров) не противоположны, не взаимоисключают друг друга. Оба подхода обладают своими достоинствами и своими недостатками, но оптимальный для пациента результат достигается именно при их совместном применении. Другое дело, что специалист, ежедневно сталкивающийся с нарушениями свертывания крови у своих больных, должен разбираться в обоих подходах и научиться адекватно их применять. Постепенно эти подходы внедряются и в нашей стране, о чем свидетельствует разработка российских Рекомендаций и формирование отечественных Регистров (например, по тромбозам и тромбофилиям).

Клиническая гемостазиология во многом основана на неразрывной связи между «клиникой» и «лабораторией», предполагающей тесное взаимодействие лечащих врачей и специалистов по лабора-

торной диагностике. Такой комплекс определяет потребность в одинаковой подготовке и тех, и других по вопросам патологии гемостаза. Приятно, что в нашей стране отмечается положительная динамика в направлении подобной кооперации.

Применение нового доплерографического временного показателя для выявления начальных проявлений диастолической дисфункции левого желудочка у детей с острым лимфобластным лейкозом

А.А. Сависько, Н.Ю. Неласов, Е.Д. Теплякова,
С.П. Пармон, Н.Е. Тарасова, А.В. Шестопалов
ГОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Одним из серьезных неблагоприятных действий полихимиотерапии (ПХТ) и токсико-инфекционных процессов у детей с острыми лейкозами является развитие сердечно-сосудистых осложнений, которые возникают на разных этапах терапии и в тяжелых случаях могут приводить к развитию прогрессирующей дисфункции миокарда и сердечной недостаточности. Своевременная диагностика появляющейся минимальной дисфункции миокарда левого желудочка дает возможность начать профилактическую терапию и предупредить появление угрожающих жизни осложнений.

Материалы и методы. Обследовано 94 ребенка в возрасте от 3 до 17 лет (средний возраст 10,4 года) с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Пациенты с ОЛЛ относились к группе стандартного риска и получали ПХТ по протоколам ALL-MB-2002, ALL-MB-2008. Все пациенты обследовались трехкратно: до начала ПХТ, после проведения индукции ремиссии, после окончания интенсивной ПХТ. Контрольную группу составили 47 здоровых детей. Обследованные были сопоставимы по возрасту и полу. Всем детям была проведена доплероэхокардиография (ДЭхоКГ). Измерены следующие стандартные ДЭхоКГ-показатели: фракции выброса (ФВ) и фракции укорочения (ФУ) левого желудочка (ЛЖ), конечный систолический (КСР) и диастолический размеры (КДР) ЛЖ, минутный объем (МО), ударный объем (УО). Диастолическую функцию (ДФ) миокарда оценивали с помощью отношения трансмитрального кровотока Е/А (общепринятый оптимальный положительный критерий $< 1,0$), и В(Е-Еа) (временной интервал Е-Еа от начала периода раннего диастолического наполнения ЛЖ по трансмитральному кровотоку до начала пика Еа высокоамплитудных отраженных сигналов движения (ВОСД)).

Результаты. Данные средних значений традиционных ДЭхоКГ-показателей, характеризующих систолическую функцию миокарда, у здоровых детей мало чем отличались от этих показателей у детей, больных ОЛЛ. Среднее значение ФУ у здоровых обследуемых и детей с ОЛЛ было не меньше 28 %, а значение ФВ — не ниже 50 % ($p > 0,05$). При анализе КДР и КСР ЛЖ установлено, что они находились в зоне возрастной нормы. Это объясняет и отсутствие достоверных различий в показателях МО (здоровые — $5,0 \pm 1,4$ л/мин; больные — $4,8 \pm 1,7$ л/мин; $p=0,63$), УО (здоровые — $62,7 \pm 18,2$ мл; больные — $58,21 \pm 17,7$; $p=0,17$) в изучаемых группах. При анализе ДФ установлено, что при использовании показателя трансмитрального кровотока Е/А ее нарушение у детей с ОЛЛ удалось выявить всего в 4,3 % случаев, а при использовании показателя В(Е-Еа) — в 74,5 % ($p < 0,00001$) случаев. При этом установлено, что среднее значение В(Е-Еа) у детей в контрольной группе составило $20,4 \pm 8,5$ мс, в 1-й группе (пациенты до начала химиотерапии) — $19,1 \pm 11,2$ мс, во 2-й группе (конец индукции ремиссии) — $24,0 \pm 15,8$ мс, а у больных после окончания полихимиотерапии — уже $32,3 \pm 14,4$ мс. Достоверные различия между группой здоровых детей и 1-й и 2-й группой пациентов с ОЛЛ отсутствуют ($p > 0,05$). Но наблюдается явное различие показателей в этих группах с группой детей после проведения полихимиотерапии ($p < 0,001$). Полученные данные позволяют прийти к заключению, что доплерографический параметр В(Е-Еа) дает возможность уловить начальные кардиотоксические эффекты у детей с ОЛЛ, проявляющиеся в изменении ДФ ЛЖ.

Спектр мутаций глобиновых генов у детей в Российской Федерации

И.О. Саделов¹, М.В. Красильникова^{1,2},
В.О. Бобрынина¹, Н.С. Сметанина^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

Минздрава России;

²ФГУ Российская детская клиническая больница
Минздрава России, Москва

Гемоглобинопатии — это гетерогенная группа заболеваний, которые характеризуются качественным (аномальные Hb) или количественным (талассемии) нарушением синтеза гемоглобина. Они являются наиболее распространенными моногенными заболеваниями, создающими главную проблему здравоохранения во многих странах мира.

Цель работы. Анализ спектра мутаций в α - и β -глобиновых локусах у детей РФ, обратившихся в поликлинику РДКБ.

Материалы и методы. С мая 2009 по февраль 2011 г. были обследованы 142 пациента поликлиники РДКБ с подозрением на гемоглобинопатию, а также члены их семей. Общее число обследованных составило 198 че-

людей, анализ их национальной принадлежности не проводился. В 127 случаях анализировались α -глобиновый локус и ген β -глобина, а в 15 случаях исследовался только ген β -глобина. Методом ПЦР с последующим анализом полученных фрагментов методом электрофореза в 1% агарозном геле в α -глобиновом локусе определялись 7 наиболее распространенных делеций (3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, THAI, FIL), а методом прямого секвенирования исследовались мутации в гене β -глобина (*HBB*).

Результаты. В 16 семьях (12,6%) были выявлены делеции в локусе α -глобиновых генов: α 3.7 в 13 семьях (10,2%), α 20.5 в 5 семьях (3,9%) и α 4.2 в 2 семьях (1,6%). В 62 семьях (43,7%) были обнаружены мутации в гене *HBB*, из них 54 (42,5%) описаны в литературе как приводящие к β -талассемии, а 8 (5,6%) связаны с экспрессией аномального гемоглобина (Hb). В таблице приведены мутации, выявленные у обследованных, и их доля от числа всех обнаруженных мутаций в гене *HBB*; частоты этих мутаций в некоторых популяциях по данным HbVar: A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>).

Однократно были зарегистрированы следующие мутации: CD5 –CT, CD6 –A, CD16 –C, CD24 –G, CD26 GAG→AAG, CD28 CTG→CCG, CD29 GGC→GGT, CD30 AGG→AGT, IVS-1-6 T→C, IVS 1-130 G→C, CD30 AGG→AGT, CD36 CCT→TCT, CD 36/37 –T, CD39 CAG→TAG, CD63 CAT→TAT, TermCD +96 T→C. Следует отметить, что в 2 семьях были одновременно выявлены делеции в α -глобиновом локусе и мутации в гене *HBB*, в 4 семьях одновременно обнаружены делеции α 3.7 и α 20.5, и в 6 семьях были зарегистрированы 2 разные мутации в гене *HBB*.

Выводы. У детей, обратившихся в поликлинику РДКБ, из 7 исследованных делеций были выявлены только 3: α 3.7, α 20.5 и α 4.2. В гене *HBB* не было выявлено областей с повышенной частотой возникнове-

ния мутаций, что вызвано гетерогенностью группы обследованных. В связи с выраженной национальной гетерогенностью популяции РФ необходимо продолжить определение всех наиболее часто встречаемых делеционных мутаций α -глобиновых генов и проводить секвенирование всей последовательности гена β -глобина, в которых зарегистрированы мутации, имеющие клиническое значение.

Нарушение гемостаза у детей при кардиохирургических операциях

Н.Н. Самсонова

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

Сложность выполняемых операций при врожденных пороках сердца, малый объем циркулирующей крови, несовершенство физиологических и защитных механизмов у младенцев требуют четкого представления о системе гемостаза и реологии крови в периоперационном периоде для прогнозирования возможных осложнений и выбора мер их профилактики и коррекции. Необходимо учитывать, что новорожденные и дети первых месяцев жизни имеют особенности клеточного и плазменного звеньев системы гемостаза. Диффузные микрососудистые кровотечения остаются одной из основных проблем, возникающих после кардиохирургических операций с искусственным кровообращением. Являясь многофакторными коагулопатиями, кровотечения влияют на развитие полиорганной недостаточности и, в конечном счете, на выживаемость пациента. Основные причины кровотечений — хирургические, связанные с гемодилюцией, с избыточной антикоагуляцией гепарином, тромбоцитопенией и тромбоцитопатией, фибринолизом, синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Для дифференциальной диагностики кровотечений

Мутация	% выявленных мутаций	Частоты мутаций в популяциях по данным HbVar			
		Русские	Турки	Итальянцы	Тайцы
Cap +20	3,2	—	—	—	—
CD6 GAG GTG	3,2	—	?	?	—
CD8 -AA	29,0	38,71	6,6	0,05	—
CD 8/9 +G	8,1	—	1,55	—	0,12
CD15 TGG TGA	4,8	6,45	—	—	—
IVS-1-1 G A	6,5	10,59	4,4	3,99	0,24
IVS-1-110 G A	6,5	6,45	42,29	11,21	—
IVS-2-1 G A	12,9	4,84	7,41	1,48	—

нами используется алгоритм, включающий оценку плазменного и клеточного звена гемостаза, выявляющий избыток гепарина в крови, активизацию фибринолиза. В сложных ситуациях дополнительно используется тромбоэластография. В соответствии с результатами лабораторного и клинического исследования рекомендуется дополнительная нейтрализация гепарина, трансфузионная терапия компонентами крови, направленное использование препаратов крови, фармакотерапия или реторакотомия. Высоким является риск тромботических осложнений в послеоперационном периоде у детей при хирургической коррекции, связанной с наложением анастомозов, протезированием клапанов сердца.

Наследственные тромбофилии у беременных

А.В. Соловьева, В.Е. Радзинский

Кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, Москва

Беременность сопровождается повышением свертывающего потенциала, снижением антикоагулянтной активности и фибринолиза. Тромботический потенциал беременности усугубляют венозный застой в нижних конечностях за счет сжатия увеличенной маткой нижней полой и тазовых вен, гормон-опосредованное увеличение венозной емкости, резистентность к инсулину и гиперлипидемия. Венозная тромбоэмболия осложняет беременность с частотой примерно 1 случай на 1600 рождений и приводит к материнской заболеваемости и смертности.

Существует тесная связь между наследственными тромбофилиями и венозной тромбоэмболией, что делает обнаружение этих мутаций логической мишенью для стратегий профилактики. Однако вызывает сомнение, существует ли связь между наследственными тромбофилиями и неблагоприятными исходами беременности.

В то время как метаанализ и ретроспективные когортные исследования выявили ассоциацию между наследственными тромбофилиями и потерями в I триместре беременности, проспективные когортные исследования не обнаружили связи между наследственными тромбофилиями и гибелью плода (Rey E. et al., 2003; Dudding T.E., Attia J., 2004; Lissalde-Lavigne G. et al., 2005).

В некоторых клинических исследованиях сообщалось о связи между содержанием фактора V Лейдена и преэклампсией, тяжелой преэклампсией и преэклампсией до 37 недель беременности (Kupferminc M.J. et al., 1999; Nurk E. et al., 2006). Однако несколько других исследований «контроль-случай» не смогли доказать связь между фактором V мутации Лейдена и преэклампсией (Currie L. et al.,

2002; Dizon-Townson D. et al., 2005; Kahn S.R. et al., 2009). Многочисленные исследования также не смогли установить связь между мутацией протромбина *G20210A* и преэклампсией или тяжелой преэклампсией (Livingston J.C., 2001; Morrison E.R. et al., 2002; Lin J., August P., 2005). В нескольких мета-анализах обнаружена связь между дефицитом протеинов C/S и преэклампсией, однако эти выводы основаны на небольшом числе исследований, которые содержат малое число участников (Alfirevic Z. et al., 2002).

Исследования «случай-контроль», когортные и систематические обзоры не обнаружили значительной связи между фактором V Лейдена и ограничением роста плода (D'Elia A.V. et al., 2002; Howley H.E. et al., 2005). Отсутствие связи было отмечено между мутациями гена *G20210A* протромбина и ЗВУР [Franchi F. et al., 2004; Verspyck E. et al., 2004].

Существует достаточно доказательств, устанавливающих связь между тромбофилией и отслойкой плаценты. Метаанализ исследований «случай-контроль» выявил связь между отслойкой плаценты и гомозиготностью и гетерозиготностью для мутации фактора V Лейдена и связь между гетерозиготностью при мутации гена протромбина *G20210A* и отслойкой плаценты (Alfirevic Z. et al., 2002). Обнаружена связь между плацентарной отслойкой и гипергомоцистеинемией более 15 мкмоль/л (Vollset S.E. et al., 2000), но минимальная связь между гомозиготностью для MTHFR C677T-полиморфизма и отслойкой плаценты (Nurk E. et al., 2004).

Таким образом, увеличение частоты скрининга тромбофилий у беременных не привело к оптимизации исходов беременности.

Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на способность лейкоэмических клеток к спонтанному и индуцированному апоптозу и чувствительность к противолейкемическим препаратам *in vitro*

О.С. Татарина¹, Е.Ю. Осипова¹, Т.В. Шаманская¹, С.А. Плясунова¹, В.В. Калинина¹, З.М. Дышлевая², Е.В. Скоробогатова², С.А. Румянцев¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

Минздравсоцразвития России;

²ФГУ Российская детская клиническая больница

Минздравсоцразвития России, Москва

Введение. В последние годы метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологических, так и аллогенных, все чаще используется в клинической практике в целях ускорения при-

живления гемопоэтических предшественников и для коррекции реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при онкогематологических заболеваниях. Это заставляет задуматься, какое влияние МСК могут оказывать на лейкоэмические клетки, присутствующие в костном мозге в форме минимальной резидуальной болезни.

Цель работы. Определение влияния аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга доноров на пролиферативную активность нормальных гранулоцитарно-макрофагальных (ГМ) предшественников, чувствительность лейкоэмических клеток при острых лейкозах к противолейкемическим препаратам *in vitro* и способность лейкоэмических клеток пациентов к спонтанному и индуцированному цитарабином апоптозу.

Материалы и методы. Лейкемические клетки, выделенные из костного мозга пациентов (6 месяцев — 17 лет) с впервые диагностированными нелечеными острыми лейкозами: В-ОЛЛ — 15, Т-ОЛЛ — 4, ОМЛ — 9. МСК (от 23 здоровых доноров) культивировали в среде ДМЕМ с 20% ЭТС до 3–5-го пассажа по стандартной методике. Клоногенное исследование ГМ-предшественников костного мозга проводили в полутвердой агаровой среде. Чувствительность бластных клеток к цитотоксическим препаратам исследовали в МТТ-тесте. Для определения уровней спонтанного и индуцированного апоптоза в лейкоэмических клетках использовали Apoptosis Detection Kit II (BD). Количественное содержание цитокинов и ростовых факторов в культурах МСК определяли на проточном цитофлуориметре с использованием реагентов Cytometric Bead Array (CBA) BD. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 8.0.

Результаты. Использование подслоя из МСК стимулирует пролиферацию ГМ-предшественников костного мозга более эффективно, чем добавление такого стандартного источника колониестимулирующих факторов, как кондиционированная среда от ФГА-стимулированных лейкоцитов. Эффективность клонирования составляла 27,9 и 22,9 соответственно. При культивировании лейкоэмических клеток на подслое из МСК в течение 4 суток доля жизнеспособных клеток была выше на 47,2% при ОЛЛ и на 63,1% при ОМЛ по сравнению с контрольными культурами. Инкубация лейкоэмических клеток в присутствии МСК приводила к снижению чувствительности к цитозару в 2 раза при В-ОЛЛ. Под влиянием МСК чувствительность к даунорубину снижалась во всех группах лейкоэмических клеток. МСК увеличивали чувствительность бластных клеток при ОЛЛ к метилпреднизолону. При определении уровней спонтанного и индуцированного апоптоза отмечалось снижение доли апоптотических клеток под действием МСК в сравнении с группами, инкубированными без подложки из МСК. Исследование

культур МСК с помощью СВА показало, что МСК продуцируют широкий спектр цитокинов и растворимых молекул адгезии, которые могут опосредовать влияние МСК на жизнеспособность кроветворных предшественников и лейкоэмических клеток. Концентрации цитокинов и растворимых молекул адгезии в кондиционной среде монослойных культур МСК на 6-е сутки после пассирования составили: IL-2 — 38,7 нг/мл; IL-4 — 53,6 нг/мл; IL-6 — 145,2 нг/мл; IL-10 — 145,2 нг/мл; sVCAM — 8,73 нг/мл; ICAM — 13,7 нг/мл; sPECAM — 10,3 нг/мл.

Заключение. В ходе проведенного исследования показано, что МСК костного мозга доноров могут оказывать влияние на чувствительность лейкоэмических клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro*: статистически значимо снижают чувствительность лейкоэмических клеток миелоидного ряда к даунорубину и способствуют выживаемости всех групп лейкоэмических клеток. Широкое применение трансплантации мезенхимальных клеток в клинической практике, особенно у онкогематологических пациентов, диктует необходимость проведения широкомасштабных исследований для изучения механизмов влияния МСК на лейкоэмические клетки.

Стандартизация молекулярного мониторинга хронического миелолейкоза, основанного на количественном определении маркера BCR-ABL (P210) методом ПЦР в реальном времени

О.Б. Трофимова¹, Д.А. Кувед¹, А.Ю. Зарицкий²,
А.С. Улитина², Т.Е. Хомякова³

¹ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФГУ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург;

³ООО «Новартис Фарма», Москва

«Лейкоз Квант М-bcr-FRT» — набор реагентов, позволяющий оценивать количество мРНК транскрипта химерного гена *BCR-ABL* по отношению к количеству транскрипта неизмененного гена *ABL*. Набор был разработан с учетом правил и требований European Leukemia Net (ELN), однако европейский опыт показал, что даже при использовании одинаковых реагентов разные условия работы в лабораториях приводят к возникновению различий в получаемых результатах. Критерии оценки ответа на терапию были определены в ходе широкомасштабных исследований для значений отношения *BCR-ABL/ABL*, выраженных в единой международной шкале. В связи с этим точность и сопоставимость получаемых лабораторией результатов со значением по международ-

ной шкале крайне важны для коррекции терапии и прогноза течения заболевания.

Цель и задачи. Для применения эффективных принципов терапии, разработанных в Европе, необходима стандартизация российской лабораторной сети диагностики хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ): сопоставление и международное шкалирование результатов, получаемых в России по сравнению с референс-лабораторией ELN. В рамках стандартизации исследований предусмотрено 2 основных этапа: 1-й — вычисление конверсионного фактора между значениями *BCR-ABL/ABL*, получаемыми в России и получаемыми в Европе, и 2-й — получение коэффициентов пересчета между всеми лабораториями России.

Материалы и методы. Для выполнения первой задачи в ФГУ ФЦСКИЭ им. В.А. Алмазова собраны 30 образцов от пациентов с ХМЛ с разным процентным содержанием *BCR-ABL* к *ABL*, далее они были дважды измерены в ФГУ ФЦСКИЭ им. В.А. Алмазова, а также в ЦНИИЭ по принятому стандартному протоколу. Порции этих образцов отправлены в лабораторию, аккредитованную ELN, в Германии. По результатам двустороннего тестирования 30 образцов будет вычислен поправочный коэффициент между российскими и европейскими исследованиями. Для выполнения второй задачи в ЦНИИЭ разработаны контрольные панели, приготовленные из крови здорового донора и крови пациента с ХМЛ, смешанной в разных пропорциях для получения образцов с отношением *BCR-ABL/ABL* порядка 10%, 1%, 0,1% и 0,01%. Данные панели разосланы в 15 лабораторий на территории РФ. К настоящему моменту 12 лабораторий успешно измерили контрольные образцы. Также в рамках второй задачи все 15 российских лабораторий в настоящий момент коллекционируют образцы крови пациентов с соотношением *BCR-ABL/ABL* порядка 10%, 1%, 0,1% и 0,01%. Эти образцы будут измерены в каждой лаборатории дважды, порции тех же образцов будут измерены в ЦНИИЭ.

Результаты и выводы. По результатам тестирования 30 образцов в России и Европе, а также по результатам тестирования образцов контрольной панели и 5 образцов пациентов в каждой из российских лабораторий будет вычислен индивидуальный конверсионный фактор пересчета результатов, который обеспечит сопоставимость всех результатов, получаемых в РФ, а также позволит корректировать терапевтические мероприятия, ориентируясь на рекомендации, определенные для значений в рамках единой международной шкалы результатов.

Прогностическое значение определения минимальной остаточной болезни выявлением химерных транскриптов у детей первого года жизни, получавших терапию по протоколу MLL-Baby

Г.А. Цаур^{1,3}, А.М. Попов^{1,3}, Т.В. Наседкина²,
О.В. Каленник², А.М. Кустанович⁴, О.В. Алейникова⁴,
Т.О. Ригер^{1,3}, Е.В. Шориков^{1,3}, Л.И. Савельев⁵,
Л.Г. Фечина^{1,3}

¹Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ³Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург;

⁴Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск; ⁵ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Цель работы — оценка прогностического значения минимальной остаточной болезни (МОБ), выявляемой методом обратнo-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) с определением различных химерных транскриптов (ХТр) гена *MLL* у детей, включенных в протокол MLL-Baby.

Методы. Наличие перестроек гена *MLL* выявлялось методами гнездной ОТ-ПЦР, FISH и подтверждалось длинной инвентированной ПЦР. Выявление ХТр проводилось одновременно методами качественной гнездной ОТ-ПЦР и количественной ПЦР в реальном времени по ранее описанным протоколам. Под МОБ-негативностью понимали отсутствие ХТр в обоих исследованиях с чувствительностью не ниже 1×10^{-4} . В исследование включены 23 пациента, у которых образцы костного мозга были взяты не менее чем в 4 точках наблюдения (ТН). Медиана наблюдения составила 30 (7–90) мес.

Результаты. В исследуемой группе было 13 пациентов с наличием ХТр MLL-AF4, 3 — с MLL-EPS15, по 2 — с MLL-MLLT10 и MLL-MLLT1 и 1 — с MLL-MLLT3. Образцы костного мозга были взяты на момент диагностики, на 15-й (ТН1) и 36-й (ТН2) дни индукционной терапии и далее после каждого курса полностью транс-ретиноевой кислоты. Производился расчет бессобытийной выживаемости (БСВ). Исходя из качественных результатов определения МОБ, пациенты подразделялись на МОБ-позитивных и МОБ-негативных. Самой ранней ТН, для которой были получены статистически значимые различия в БСВ МОБ-позитивных и МОБ-негативных пациентов, являлась ТН3. В зависимости от наличия МОБ в ТН3 и ТН4 пациенты были разделены на 3 группы. Группа стандартного риска, выделенная по результатам определения МОБ,

включала 8 пациентов, которые были МОБ-негативными в обеих ТН. Пять пациентов, оставшихся МОБ-позитивными в ТН4, были отнесены в группу высокого риска. Группа промежуточного риска состояла из 10 пациентов, которые были МОБ-позитивны в ТН3, но стали МОБ-негативными в ТН4. Исходы терапии в этих группах были различны. БСВ в 1-й группе составила 1,00; во 2-й — $0,70 \pm 0,14$ и в 3-й — $0,20 \pm 0,17$ ($p = 0,002$). Таким образом, мониторинг МОБ путем определения ХТр имеет важное прогностическое значение для пациентов первого года жизни с ОЛЛ и наличием перестроек гена *MLL*, получавших терапию по протоколу MLL-Baby. Результаты определения МОБ позволили разделить пациентов на 3 группы с различными исходами терапии.

Результаты цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики острых лейкозов у детей первого года жизни

Г.А. Цаур^{1,2}, Е.В. Флейшман³, А.М. Попов^{1,2,4},
О.И. Сокова³, О.В. Алейникова⁵, Э.Г. Бойченко⁶,
Е.В. Волочник⁵, А.С. Иванова^{1,2}, О.В. Каленник⁷,
Н.П. Кирсанова⁵, К.Л. Кондратчик⁸,
А.М. Кустанович⁵, Е.С. Лапотентова⁵, Д.В. Литвинов⁹,
И.С. Мартынкевич¹⁰, Н.В. Мякова⁹, Т.В. Наседкина⁷,
В.А. Овсепян¹¹, Ю.В. Олышанская⁹, О.М. Плеханова¹,
А.В. Попа³, Т.О. Ригер^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,4},
О.В. Стрелева^{1,2}, М.В. Стригалева¹, И.В. Шмунк¹²,
Е.В. Шориков^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург; ²Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург; ³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;

⁴ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург; ⁵Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск;

⁶Детская городская больница № 1, Санкт-Петербург; ⁷Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ⁸Морозовская детская городская клиническая больница, Москва;

⁹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России, Москва; ¹⁰Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург; ¹¹ФГУ Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России;

¹²Челябинская областная станция переливания крови

В исследуемую группу вошло 155 детей в возрасте от 1 дня до 12 мес (медиана — 6,5 мес), включая 117 пациентов с ОЛЛ, 31 — с ОМЛ и 7 — с другими типами острого лейкоза. Среди выявленных генетических

аббераций наиболее часто обнаруживали транслокации с участием района 11q23/MLL. Они доминировали как при ОЛЛ — 63,2%, так и при ОМЛ — 48,4%. Частота отдельных специфических транслокаций с участием 11q23/MLL различалась при ОЛЛ и ОМЛ. Среди группы с наличием транслокаций 11q23/MLL преобладала $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$ — 63,5% случаев, реже встречались $t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$ — 18,9% случаев, $t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10$ и $t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15$ — по 6,8%. В возрасте младше 6 мес транслокации 11q23/MLL были выявлены в 84,0% случаев, что достоверно чаще, чем в возрасте 6–12 мес — 47,8% случаев ($p < 0,001$). Структура химерного транскрипта определена у 26 пациентов с ОЛЛ. В 14 из 26 (53,8%) случаев точка слияния располагалась в 11 экзоне гена *MLL*. Самой частой перестройкой при ОМЛ была $t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10$, которая обнаружена у 6 (19,4%) пациентов. В 5 случаях ОМЛ выявлена $t(1;22)(p13;q13)$. Сложный кариотип — 3 или более числовых и/или структурных аномалии, в том числе перестройки 11q23 с отсутствием маркеров благоприятного прогноза — обнаружен у 4 пациентов с ОМЛ. В 6 случаях у пациентов с нормальным кариотипом использование ОТ-ПЦР и FISH помогло выявить наличие критических вариантов транслокаций района 11q23. Цитогенетические и молекулярно-генетические изменения, прогностически важные при острых лейкозах у детей более старших возрастных групп, у детей первого года жизни наблюдались чрезвычайно редко: выявлено по 1 случаю $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL$ и $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX$, 2 случая $inv(16)(p13q22)$, 2 случая высокой гипердиплоидии, 1 случай гиподиплоидии.

Особенности энергетического обмена у детей с онкологическими заболеваниями

Г.Я. Цейтлин¹, М.В. Коновалова¹, А.Ю. Вашура¹,
Е.В. Скоробогатова², Д.В. Литвинов¹

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России;

²ФГУ Российская детская клиническая больница Минздрава России, Москва

Питание — важный фактор, влияющий на состояние здоровья и эффективность адаптации организма к неблагоприятным условиям. Рационы питания, разработанные для детских ЛПУ, нельзя считать соответствующими потребностям конкретного пациента онкопедиатрической клиники в энергии и пищевых ингредиентах, поскольку их расчет базируется на усредненных значениях и в минимальной степени позволяет учитывать индивидуальные показатели состояния питания и нарушения метаболизма у кон-

кретного ребенка. По данным разных авторов, нутритивная недостаточность (НН) отмечается у 20–50 % детей со злокачественными новообразованиями уже при первичном поступлении в клинику, а в процессе химиотерапии эти нарушения имеют место практически у 100 % пациентов. В специальных исследованиях установлена существенная связь НН с повышенным риском развития осложнений полихимиотерапии (ПХТ), плохим заживлением операционных ран, нарушениями иммунного статуса и т. д.

Цель работы. Оценить величину энергопотребности покоя (Еп) у детей с онкологическими заболеваниями в процессе химиотерапии и в посттрансплантационном периоде.

Материалы и методы. Еп измерялась в динамике у 37 детей в возрасте от 5 до 17 лет (медиана — 11,7 лет), получавших ПХТ (5 человек) или находившихся в посттрансплантационном периоде (32 ребенка); всего произведено 102 измерения. Еп оценивали методом непрямой калориметрии с использованием метабологафа Ultima CCM (Medgraphics, USA).

Результаты и обсуждение. В 63,7 % наблюдений отмечено существенное снижение Еп по сравнению с расчетным, причем в 25,5 % случаев снижение носило выраженный характер — от 30 до 50 %; в 4,9 % случаев Еп была увеличена на 10–20 %; только в 31,4 % наблюдений значение Еп практически не отличалось от расчетного. Следовательно, оценка Еп детей, получающих ПХТ и/или находящихся в посттрансплантационном периоде, с использованием расчетных формул может приводить к серьезным ошибкам, что нужно учитывать при проведении нутритивной поддержки этих пациентов.

Заключение. Полученные данные обосновывают необходимость постоянного мониторинга энергопотребности детей с онкологическими заболеваниями в процессе специального лечения для выработки индивидуальной программы нутритивной поддержки.

Атипичная Rho ГТФаза Chp/RhoV: новый участник канцерогенеза?

М.В. Шепелев, И.В. Коробко

Институт биологии гена РАН, Москва

Белки семейства Rho ГТФаз участвуют в регуляции многих клеточных процессов, включая перестройку актинового цитоскелета, установление полярности клеток, прогрессию клеточного цикла и др., а также играют существенную роль в прогрессии опухолей. Chp/RhoV является малоизученной атипичной Rho ГТФазой. К настоящему времени было выявлено, что экспрессия Chp индуцирует формирование ламеллиподий и фокальных контактов, а также активирует про-онкогенную протеинкиназу Pak1. Это предполагает, что экспрессия Chp может вносить существенный вклад в процессы

развития и прогрессии опухолей. Действительно, исследование панели опухолей немелкоклеточного рака легкого выявило частое (в 76 % случаев) увеличение экспрессии Chp в ткани опухолей по сравнению с прилегающей нормальной тканью легкого. Таким образом, экспрессия Chp может быть ассоциирована с опухолевыми клетками, что предполагает участие Chp в канцерогенезе. Исследуя молекулярные механизмы действия Chp, нами было установлено, что экспрессия Chp вызывает образование филоподий, что вместе с ранее описанным Chp-зависимым формированием ламеллиподий и фокальных контактов предполагает участие Chp, сходно с другими Rho ГТФазами, в контроле миграционных и инвазивных свойств клеток. Исследуя молекулярные механизмы, лежащие в основе участия Chp в контроле динамики цитоскелета, нами было установлено, что Chp взаимодействует с белком IRSp53, который в зависимости от молекулярного контекста может вызывать формирование как филоподий, так и ламеллиподий. Кроме того, нами было выявлено взаимодействие Chp с тубулином и микротрубочками, что является механистической основой для возможной роли Chp как координатора актинового и микротрубочкового цитоскелетов клеток. Наконец, нами было продемонстрировано, что Chp обладает способностью активировать JNK-сигнальный каскад, играющий важную роль в прогрессии опухолей. Суммируя результаты наших исследований, мы впервые выявили увеличенную экспрессию ГТФазы Chp при раке легкого, что позволяет рассматривать Chp как новый молекулярный маркер опухолей легкого. Полученные нами данные предполагают участие Chp как в контроле миграционных и инвазивных свойств клеток, так и в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, гиперактивация которых наблюдается в опухолевых клетках. Полученные результаты служат основанием для дальнейшего исследования роли Chp в процессах возникновения и прогрессии опухолей и как потенциально новой мишени в противоопухолевой терапии.

Фенотип пациентов с миелопролиферацией, имеющих мутацию V617F гена JAK2

И.В. Шмунк¹, Е.П. Конева¹, Т.А. Суслова¹,

М.Н. Русаков², В.Э. Ботвиновский²,

С.Н. Андриевских³, О.В. Коробицына⁴, А.В. Коробкин⁴

¹ОГУП Челябинская областная станция переливания крови; ²Городская клиническая больница № 1, Челябинск; ³Городская клиническая больница № 8, Челябинск; ⁴Челябинская областная клиническая больница

Введение. Определение мутации V617F гена JAK2 включено в перечень диагностических критериев WHO для миелопролиферативных заболеваний

(MPN): истинной полицитемии (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ЕТ), первичного миелофиброза (PMF). Эта мутация не является специфичной для определенного типа MPN, но подтверждает клональную природу пролиферации.

Материалы и методы. *V617F* определяли в геномной ДНК методом ПЦР в режиме реального времени с использованием реактивов ООО НПФ Синтол (Москва) и Ipsogen (France). Минимальное определяемое количество мутантного аллеля составляет 2 %. Соотношение мутантного аллеля и аллеля дикого типа оценивали по $\Delta Ct = Ct(G) - Ct(T)$. Для оценки статистической значимости различий использовали *t*-тест Стьюдента и точный критерий Фишера.

Результаты. На наличие мутации обследовано 645 пациентов с подозрением на миелопролиферацию. Выявлено 167 пациентов с мутацией *V617F*: 35 — с диагнозом PV (15 мужчин/20 женщин); 43 — с ЕТ (16 мужчин/27 женщин); 9 — с PMF (2 мужчины/7 женщин) и 80 (37 мужчин/43 женщины) — не были верифицированы по конкретному типу MPN. Медиана (*m*) возраста пациентов с мутацией составила 60 (19–84) лет. Пациентов в возрасте до 40 лет в группе с ЕТ было 14 % (только женщины), в группе с PV — 5,7 %, в группе с MPN — 8,8 %. Уровень гемоглобина у пациентов с PV составил $m(Hb) = 179$ (165–216) г/л. Повышенное количество тромбоцитов периферической крови (ПК) имели 60 % пациен-

тов с PV: $m(tr PV) = 567 \times 10^9/л$ ($450 - 1325 \times 10^9/л$), что ниже уровня тромбоцитов у пациентов с ЕТ: $m(tr ET) = 734 \times 10^9/л$ ($480 - 3000 \times 10^9/л$) $p = 0,038$. Также повышенное количество тромбоцитов имели 62 % пациентов с недифференцированной миело-пролиферацией (MPN): $m(tr MPN) = 653 \times 10^9/л$ ($450 - 3420 \times 10^9/л$), достоверные различия с ЕТ отсутствуют. Повышенный уровень лейкоцитов ПК отмечен в группе с MPN: $m(L MPN) = 16,7 \times 10^9/л$ ($4,7 - 74,0 \times 10^9/л$) против $m(L PV) = 10,0 \times 10^9/л$ ($4,9 - 36,5 \times 10^9/л$), $p = 0,011$; $m(L ET) = 11,5 \times 10^9/л$ ($4,8 - 22,7 \times 10^9/л$), $p = 0,001$. Спленомегалия отмечена в 22 % случаев PMF, в 10 % случаев MPN и у 3,8 % пациентов с PV + ЕТ. Соотношение мутантного аллеля и аллеля дикого типа различается в группах с разными типами MPN: более 50 % мутантного аллеля присутствует у 54 % пациентов с PV ($m(\Delta Ct) = 0,9$ ($-8 - +23$)) и 60 % MPN ($m(\Delta Ct) = 0,25$ ($-13 - +23$)). Преобладание аллеля дикого типа над мутантным имело место в группе ЕТ ($m(\Delta Ct) = -1,5$ ($-14 - +3$)) и PMF ($m(\Delta Ct) = -1,7$ ($-10 - +1,5$)) — у 76,7 % и 77,8 % пациентов соответственно. Различия достоверны для ЕТ с PV ($p = 0,001$) и с MPN ($p = 0,001$).

Вывод. Мутация *V617F* гена *JAK2* определяется у пациентов с различным клиническим фенотипом BCR/ABL-негативной миелопролиферации. Более низкая аллельная нагрузка характерна для пациентов с эссенциальной тромбоцитемией.