

2003;44(3):439–44.

7. Epping M.T., Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006;66(22):10639–42.

8. Proto-Siqueira R., Figueiredo-Pontes L.L., Panepucci R.A. et al. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphoid leukemia and mantle cell lymphoma. *Leukem Res* 2006;30:1333–9.

9. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок

И.А., Мисюрин А.В. Экспрессия гена PRAME при миеломной болезни. *Тер арх* 2004;(7):35–40.

10. Yang L., Han Y., Saiz F.S. et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leucemia* 2007;21:868–76.

11. Gaiger A., Reese V., Disis M.L. et al. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(4):1480–9.

12. Holclic M., Korneluk R.G. X-chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP).

Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:550–6.

13. Sun Y.E. 3 Ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia* 2006;8:645–54.

14. Silke J., Ekert P.G., Day C.L. et al. Direct inhibitor of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *The EMBO J* 2001;20(12):3114–23.

15. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.

ТЯЖЕЛАЯ ВРОЖДЕННАЯ НЕЙТРОПЕНИЯ: ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ЛЕЙКЕМОИДНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Ю. Скокова, К. Вельге

Отдел молекулярной гематологии Высшей медицинской школы, Ганновер, Германия (перевод Ю.В. Румянцевой, ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва)

Контакты: Юлия Скокова Skokova.Julia@mh-hannover.de

Тяжелая врожденная нейтропения (ВН) — это гетерогенная патология гемопоэза, характеризующаяся прекращением созревания гранулоцитов на стадии промиелоцитов с абсолютным количеством нейтрофилов в периферической крови (ANC) $<0,5 \times 10^9/\text{л}$. В обзоре суммированы имеющиеся в настоящий момент сведения о патофизиологии развития острой миелобластной лейкемии (ОМЛ) у пациентов с ВН.

По типу наследования ВН делится на два подтипа: 1) с аутосомно-доминантным наследованием, связанный с мутациями ELA2, наблюдающийся у 60% пациентов и 2) с аутосомно-рецессивным наследованием, встречающийся приблизительно у 30% пациентов. ВН рассматривается как прелейкемический синдром, так как через 10 лет наблюдения кумулятивный риск развития лейкемии составляет 21%. Приобретенные мутации рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФР) обнаружены приблизительно у 80% больных ВН с развившимся ОМЛ. Пациенты с ВН с приобретенными мутациями Г-КСФР составляют группу высокого риска развития лейкемии.

Ключевые слова: тяжелая врожденная нейтропения, мутации рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, острая миелобластная лейкемия

SEVERE CONGENITAL NEUTROPENIA: PATHOPHYSIOLOGY OF LEUKEMOGENIC TRANSFORMATION

J. Skokowa, K. Welte

Department of Molecular Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Severe congenital neutropenia (CN) is a heterogeneous disorder of hematopoiesis characterized by a maturation arrest of granulopoiesis at the level of promyelocytes with peripheral blood absolute neutrophil counts (ANC) below $<0,5 \times 10^9/\text{L}$. In this review we summarize our current knowledge on pathophysiology of AML in CN patients.

There are two major subtypes of CN as judged by inheritance, 1) autosomal dominant trait defined by ELA2 mutations consisting 60% of patients and 2) autosomal recessive trait comprising approximately 30% of patients. CN is considered as a pre-leukemic syndrome, since after ten years of observation the cumulative incidence of acute leukemia is 21%. Acquired G-CSFR mutations are detected in approx. 80% of CN patients who developed AML. CN patients with acquired G-CSFR mutations define a group with high risk for development of leukemia.

Keywords: Severe congenital neutropenia (CN), G-CSFR mutations, AML

Введение

Врожденная нейтропения (ВН) — это мультигенное заболевание с общим гематологическим и клиническим фенотипом. ВН наследуется аутосомно-доминантно или аутосомно-рецессивно. Шведский врач R. Kostmann [1, 2] описал в 1956 г. аутосомно-рецессивную гематологическую патологию с тяжелой нейтропенией, абсолютным количеством нейтрофилов (ANC) $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ и появлением тяжелых бактериальных инфекций в раннем возрасте, позднее названную синдромом Костманна.

И прогноз, и качество жизни пациентов с ВН существенно улучшились после появления в 1987 г. терапии гранулоцитарным колониестимулиру-

ющим фактором (Г-КСФ) [3–6]. Более 90% пациентов с ВН отвечают на терапию Г-КСФ повышением ANC $>1,0 \times 10^9/\text{л}$. Следует отметить, что всем ответившим пациентам потребовалось значительно меньшее число антибиотиков и дней госпитализации [6–10]. Несмотря на это, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от HLA-совместимого донора остается единственным способом лечения пациентов, рефрактерных к Г-КСФ, и больных с трансформацией в миелодиспластический синдром — МДС/лейкемию [11].

Диагностика

ВН — редкое заболевание (1–2 случая на 1 млн родившихся). ВН обычно диагностируется уже в пе-

риод новорожденности или в первые месяцы жизни в связи с развитием повторных тяжелых инфекций (например, пневмонии, абсцессы и т.д.). Необходимо проведение повторных анализов крови с подсчетом количества нейтрофилов, в которых выявляется персистенция ANC в пределах диапазона $0-0,2 \times 10^9/\text{л}$. В анализе крови часто отмечаются также анемия легкой степени и тромбоцитоз. Обычно в 2–4 раза по сравнению с нормой увеличено число моноцитов и эозинофилов. Специфические антинейтрофильные антитела отсутствуют [12]. В костном мозге, как правило, обнаруживается «обрыв созревания» нейтрофильных предшественников на стадии промиелоцита/миелоцита вне зависимости от типа наследования. Количество промиелоцитов слегка увеличено, нередко в них выявляются морфологически атипичные ядра и вакуолизация цитоплазмы [9]. Эозинофилия и моноцитоз в костном мозге встречаются часто и не исчезают в процессе терапии. Клеточность костного мозга обычно нормальная или слегка снижена. Число и морфология мегакариоцитов не изменены. Нередко имеют место нарушения роста гранулоцитарных колоний *in vitro* с формированием небольшого числа колоний и признаками «нарушения созревания», несмотря на максимальную стимуляцию факторами роста и другими добавками.

Терапия

Доза Г-КСФ для достижения и поддержания $\text{ANC} > 1000/\text{мкл}$ варьирует между 1 и 120 мкг/кг/сут ; большинство пациентов отвечают на дозы Г-КСФ $< 25 \text{ мкг/кг/сут}$ [10, 13–15].

Для больных, не отвечающих на терапию Г-КСФ, единственным доступным на сегодняшний день способом лечения является ТГСК [11]. Однако по-прежнему сложно рекомендовать проведение трансплантации пациентам с ВН, отвечающим на терапию Г-КСФ и не имеющим признаков надвигающейся злокачественной трансформации.

Лейкемия

Некоторые описания, сделанные до начала применения терапии Г-КСФ, также свидетельствуют о том, что у пациентов с ВН имеется риск развития лейкемической трансформации [16, 17]. Были описаны 5 пациентов с ВН, у которых развилась лейкемия до начала терапии Г-КСФ [18]. Однако неизвестно, приведет ли увеличение выживаемости этих пациентов при использовании Г-КСФ к проявлению более высокого риска лейкемогенеза в этой популяции. Общая частота перехода в МДС/ОМЛ (острая миелобластная лейкемия) составляет 11,5% для больных ВН со средним сроком катамнеза приблизительно 5–6 лет [19]. Лейкемическая трансформация развивается и у пациентов с аутосомно-доминантным (с мутациями *ELA2*) и аутосомно-рецессивным (с мутациями *HAX1*) типом наследования ВН.

Международный регистр пациентов с тяжелой хронической нейтропенией (Severe Chronic

Neutropenia International Registry; SCNIR) недавно представил более подробное описание первых 374 пациентов с ВН (зарегистрированных в 1987–2000 гг.), находящихся на длительной терапии Г-КСФ для идентификации риска лейкемической трансформации [15]. Риск МДС/ОМЛ значительно возрастает на терапии Г-КСФ, с 2,9% в год после 6 лет до 8,0% в год после 12 лет наблюдения. Кумулятивная частота МДС/ОМЛ составила 21% после 10 лет наблюдения (рис. 1). Вызывает интерес то, что риск развития

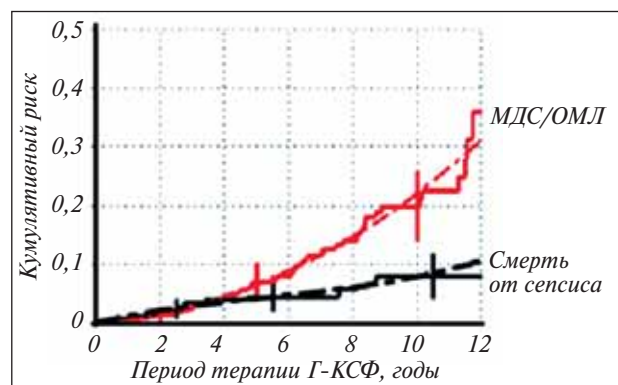


Рис. 1. Кумулятивный риск развития МДС/ОМЛ и смерти от сепсиса у пациентов с ВН [15]

МДС/ОМЛ повышается при увеличении дозы Г-КСФ. У пациентов с плохим ответом, которым требуется более 8 мкг/кг/сут Г-КСФ, кумулятивный риск развития МДС/ОМЛ составил 40% после 10 лет наблюдения по сравнению с 11% у больных с хорошим ответом [15]. Эти данные были интерпретированы таким образом, что плохой ответ на Г-КСФ определяет «группу риска» в популяции пациентов с ВН и является предиктором неблагоприятного исхода.

Трансформация в МДС/ОМЛ у пациентов с ВН оказалась ассоциирована с наличием одной или более клеточных генетических аномалий, например, моносомии 7, мутаций *RAS*, трисомии 21 или мутаций гена рецептора Г-КСФ (*Г-КСФР*), обнаружение которых может быть полезным для идентификации подгрупп пациентов с высоким риском развития МДС/ОМЛ. Интересно, что в клетках костного мозга почти 80% больных ВН с трансформацией в МДС/ОМЛ выявляются точечные мутации гена *Г-КСФР*, приводящие к усечению С-концевой цитоплазматической области рецептора, которая является критической для передачи сигналов созревания [18, 20–26].

В одном из недавних сообщений была выдвинута гипотеза о связи между применением Г-КСФ и развитием моносомии 7 у пациентов с ВН [27] и показано, что клетки с моносомией 7 аномально чувствительны к высоким концентрациям Г-КСФ и использование Г-КСФ приводит к экспансии предсуществующего клона с моносомией 7.

Развитие МДС/ОМЛ — это многоступенчатый процесс, характеризующийся рядом клеточных генетических изменений, свидетельствующих о гене-

тической предрасположенности к злокачественной трансформации. Влияет ли Г-КСФ на эту предрасположенность и каким образом это происходит, остается неясным; кроме того, нет исторического контроля для сравнения и решения этой проблемы. Тем не менее длительная терапия фармакологическими дозами Г-КСФ может вызывать геномную нестабильность в связи с повышением давления при клеточном делении и репликации ДНК. Кроме того, Г-КСФ может приводить к преимущественному вторичному росту предсуществующего клеточного клона с мутациями в гене Г-КСФР [27].

Приобретенные мутации в гене Г-КСФР

Среди больных ВН, у которых развилась лейкемия, исследованных на сегодняшний день,

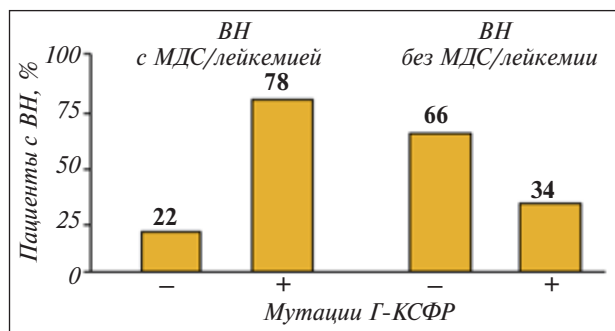


Рис. 2. Доля пациентов с наличием и отсутствием мутаций гена Г-КСФР среди больных ВН с развившейся (или нет) МДС/лейкемией [18]

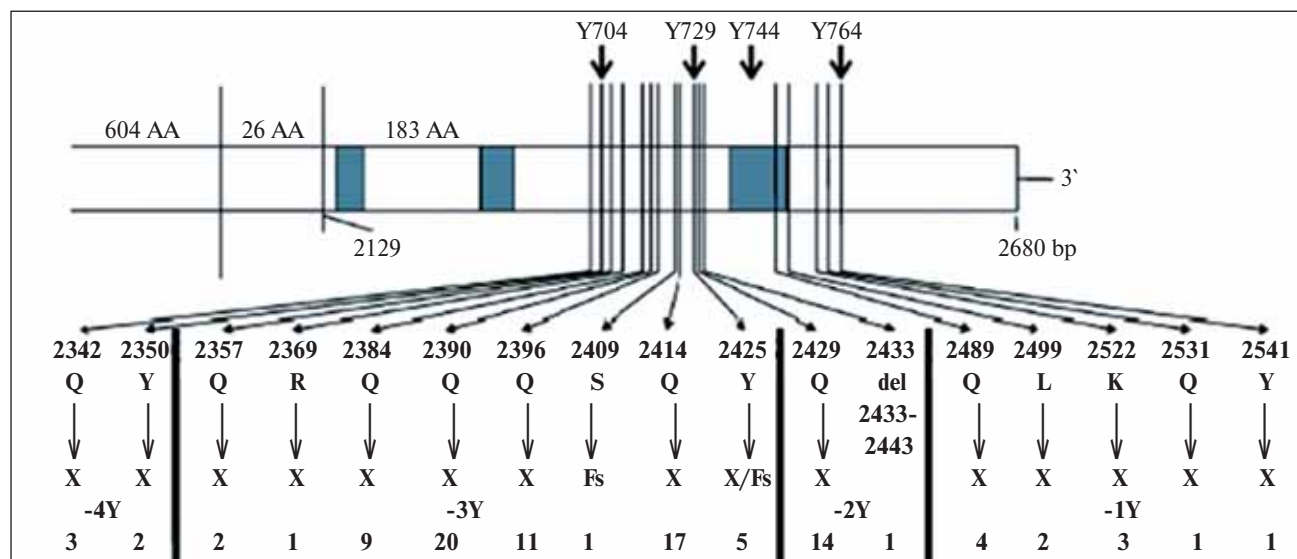


Рис. 3. Локализация приобретенных мутаций в гене Г-КСФР, ассоциированных с развитием лейкемии у больных ВН, леченных Г-КСФ [18]

приобретенные мутации гена Г-КСФР присутствуют почти у 80% (рис. 2) [18, 20–26, 28], что свидетельствует о важной роли этих мутаций в лейкемогенезе. У пациентов, у которых не развилась лейкемия, частота выявления этих мутаций значительно ниже (приблизительно 30%). Мутации рецептора локализируются преимущественно в 17 различных нуклеотидных позициях между нуклеотидами 2342 и 2541 гена Г-КСФР (рис. 3), кодирующими критическую область в пределах цитоплазматической части белка Г-КСФР, содержащей 4 остатка тирозина. Большая часть мутаций приводит к потере 2, 3 или даже 4 тирозиновых остатков, которые являются важным местом для прикрепления SH2-содержащих сигнальных молекул и вовлечены в дифференцировку миелоидных клеток [29]. Мутации Г-КСФР до сих пор никогда не обнаруживали при рождении, что говорит о том, что они, по-видимому, не ответственны за развитие нейтропении, а появляются в течение

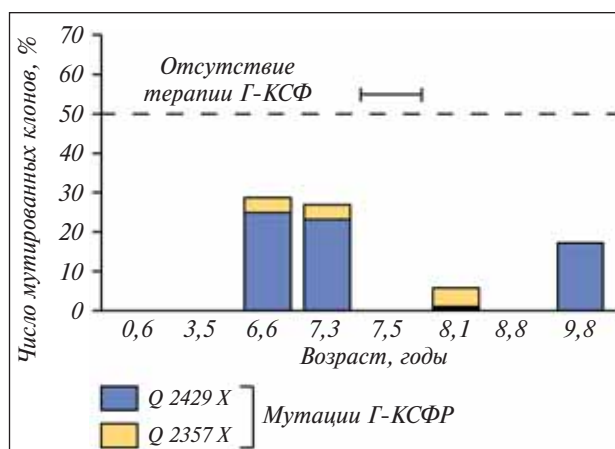


Рис. 4. Выявление мутаций гена Г-КСФР у пациентов на фоне терапии Г-КСФ [18]

жизни, наиболее вероятно в связи с геномной нестабильностью. Примечательно, что существуют пациенты с мутациями Г-КСФР, которые потеряли «мутированный» клон после прекращения вве-

дения Г-КСФ и у которых отмечена повторная экспансия этого клона после возобновления терапии Г-КСФ (рис. 4) [18, 30]. Эти данные документируют связь между появлением клеточных клонов, несущих мутации Г-КСФР, и терапией Г-КСФ. Аномальные сигналы мутированного Г-КСФР могут быть объяснены, по крайней мере отчасти, повышением соотношения активации STAT5/STAT3 [31] или потерей негативных регуляторов типа SOCS3 [31] или Src киназ [32].

Временной интервал между обнаружением мутации(й) Г-КСФР и развитием лейкемии значительно варьирует. У некоторых пациентов мутации гена Г-КСФР присутствуют только в лейкоэмических клетках. У других одиночные или множественные мутации гена Г-КСФР выявляются за несколько лет до лейкоэмической трансформации [18, 26]. У большинства больных мутации гена Г-КСФР затрагивают только один аллель. По этой причине

анализ Г-КСФР не может быть использован для диагностики лежащего в основе заболевания, но полезен для скрининга риска роста прелейкемических клеточных клонов и явной лейкемии. Интересно, что у пациентов с ВН, у которых обнаружены мутации Г-КСФР, может развиваться не только ОМЛ, но также острая лимфобластная и хроническая миеломоноцитарная лейкемия [18, 28, 33].

Заключение

Использование Г-КСФ остается терапией 1-й линии для большинства пациентов с ВН. ТГСК от НЛА-идентичного сиблинга является опцией для пациентов, рефрактерных к Г-КСФ. У больных с идентифицированными приобретенными мутациями Г-КСФР риск развития лейкемии увеличивается с 20 до 80%. Пациентам, у которых развивается моносомия 7, другие значимые хромосомные aberrации или МДС/лейкемия, ТГСК должна проводиться немедленно.

Л и т е р а т у р а

- Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis. *Acta Paediatr Scand* 1956;45:1—78.
- Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis: a review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr Scand* 1975;64:362—8.
- Rappeport J., Parkman R., Newburger P. et al. Correction of infantile granulocytosis (Kostmann syndrome) by allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Med* 1980;68:605—9.
- Souza L., Boone T., Gabrilove J. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 1986;232:61—5.
- Bonilla M., Gillio A., Ruggerio M. et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N Engl J Med* 1989;320:1574—80.
- Bonilla M., Dale D., Zeidler C. et al. Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. *Br J Haematol* 1994;88:723—30.
- Freedman M.H. Safety of long-term administration of granulocyte colony-stimulating factor for severe chronic neutropenia. *Curr Opin Hematol* 1997;4:217—24.
- Welte K., Dale D. Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia. *Ann Hematol* 1996;72:158—65.
- Welte K., Boxer L. Severe chronic neutropenia: Pathophysiology and therapy. *Semin Hematol* 1997;34:267—78.
- Welte K., Zeidler C., Dale D.C. Severe congenital neutropenia. *Semin Hematol* 2006;43:189—95.
- Zeidler C., Welte K., Barak Y. et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. *Blood* 2000;95:1195—8.
- Bux J., Behrens G., Jaeger G., Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood* 1998;91:181—6.
- Dale D., Bonilla M., Davis M. et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993;81:2496—502.
- Welte K., Zeidler C., Reiter A. et al. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood* 1990;75:1056—63.
- Rosenberg P.S., Alter B.P., Bolyard A.A. et al. Severe Chronic Neutropenia International Registry. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood* 2006;107(12):4628—35.
- Gilman P., Jackson D., Guild H. Congenital agranulocytosis: prolonged survival and terminal acute leukemia. *Blood* 1971;36:576—85.
- Rosen R., Kang S. Congenital agranulocytosis terminating in acute myelomonocytic leukemia. *J Pediatr* 1979;94:406—8.
- Germeshausen M., Ballmaier M., Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis — results of a long-term survey. *Blood* 2007;109(1):93—9.
- Zeidler C., Boxer L., Dale D.C. et al. Management of Kostmann syndrome in the G-CSF era. *Br J Haematol* 2000;109:490—5.
- Dong F., Russel K.B., Tidow N. et al. Mutations in the gene for the granulocyte-colony stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med* 1995;333:487—93.
- Tidow N., Pilz C., Teichmann B. et al. Clinical relevance of point mutations in the cytoplasmic domain of the granulocyte-colony stimulating factor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 1997;88:2369—75.
- Bernard T., Gale R., Evans J. et al. Mutations of the granulocyte-colony stimulating factor receptor in patients with severe congenital neutropenia are not required for transformation to acute myeloid leukaemia and may be a bystander phenomenon. *Br J Haematol* 1998;101:141—9.
- Cassinat B., Bellanne-Chantelot C., Notz-Carrere A. et al. Screening for G-CSF receptor mutations in patients with secondary myeloid or lymphoid transformation of severe congenital neutropenia. A report from the French neutropenia register. *Leukemia* 2004;18:1553—5.
- Donadieu J., Leblanc T., Meunier B. et al. on behalf of the French Severe Chronic Neutropenia study group. Analysis of risk factors for myelodysplasia/leukemia and infectious death among patients with congenital neutropenia: experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica* 2005;90:45—53.
- Papadaki H.A., Kosteas T., Gemetzi C. et al. Acute myeloid/NK precursor cell leukemia with trisomy 4 and a novel point mutation in the extracellular domain of the G-CSF receptor in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol* 2004;83:345—8.
- Tschan C.A., Pilz C., Zeidler C. et al. Time course of increasing numbers of mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in a patient with congenital neutropenia who developed leukemia. *Blood* 2001;97:1882—4.
- Sloand E.M., Yong A.S., Ramkissoon S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14483—8.
- Germeshausen M., Schulze H., Kratz C. et al. An acquired G-CSF receptor mutation results in increased proliferation of CMMML cells from a patient with severe congenital neutropenia. *Leukemia* 2005;19:611—7.
- Hermans M.H., van de Geijn G.J., Antonissen C. et al. Signaling mechanisms coupled to tyrosines in the granulocyte colony-stimulating factor receptor orchestrate G-CSF-induced expansion of myeloid progenitor cells. *Blood* 2003;101:2584—90.
- Jeha S., Chan K.W., Aprikan A.G. et al. Spontaneous remission of granulocyte colony-stimulating factor-associated leukemia in a child with severe congenital neutropenia. *Blood* 2000;96:3647—9.
- Van de Geijn G.J., Gits J., Aarts L.H. et al. G-CSF receptor truncations found in SCN/AML relieve SOCS3-controlled inhibition of STAT5 but leave suppression of STAT3 intact. *Blood* 2004;104:667—74.
- Mermel C.H., McLemore M.L., Liu F. et al. Src-family kinases are important negative regulators of G-CSF dependent granulopoiesis. *Blood* 2006;108:2562—8.
- Germeshausen M., Ballmaier M., Schulze H. et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in a patient with acute lymphoblastic leukemia secondary to severe congenital neutropenia. *Blood* 2001;97:829—30.