

УДК 616.15 (035)

Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 1. Под ред. А.И. Воробьева. 3-е изд., перераб. и допол. М.: Ньюдиамед; 2002. 280 с. с ил.

Авторы 1-го тома: М.Г. Абрамов, М.Д. Бриллиант, М.И. Бронштейн, Е.Ю. Варламова, Ю.Э. Виноградова, А.И. Воробьев, П.А. Воробьев, И.А. Грибова, Н.И. Дризе, А.И. Колесникова, Е.А. Лукина, Д. Пинкель, В.Г. Савченко, Я.Ю. Сахибов, А.Н. Смирнов, С.К. Терновой, Н.Н. Тупицин, А.Г. Туркина, Е.В. Флейшман, М.А. Френкель, И.Л. Чертков

Редакторы-составители: Л.Д. Гриншпун, П.А. Воробьев, С.К. Кравченко

Ответственный редактор - профессор П.А. Воробьев

Издательство «Ньюдиамед»
129110, Москва, Проспект Мира, 36, стр. 1
Лицензия ИД № 00169 от 1 октября 1999 года
Гигиеническое заключение на продукцию № 77.99.1.953.П.323.12.98. от 16.12. 1998 г.

Директор издательства В.А. Буланова
Зам. директора издательства по маркетингу Г.С. Рихард
Компьютерная верстка А.Ю. Буланов
Дизайн рисунков Д.В. Харазишвили

Подписано в печать 04.03.2002 г. Формат 60X90/8
Объем 35 печ. л.

Отпечатано в типографии ОАО «Внешторгиздат»
127576, Москва, ул. Илимская, 7
Заказ № 138

Частичное или полное воспроизведение материала возможно только с разрешения издательства
ISBN 5-88107-038-0 ©Ньюдиамед, 2002

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к первому изданию	6
Предисловие ко второму изданию	7
Предисловие к третьему изданию	8
Обозначения	10
ОБЩАЯ ЧАСТЬ	13
КЛЕТКА. И.А. Воробьев	13
Введение	13
Биологические макромолекулы (биополимеры)	13
Структура клетки	14
Клеточные органеллы	16
Митотический цикл	24
Клеточное деление	25
Клеточные популяции и дифференцировка клеток в организме	26
Механизмы клеточной гибели	26
Движение клеток	26
Внутриклеточная среда и клеточные органеллы	27
Программы поведения клеток	27
Исследование клеток в гематологии и патологической анатомии	28
КРОВЕТВОРЕНИЕ. И.Л. Чертков, Н.И. Дризе, А.И. Воробьев, М.Д. Бриллиант	28
Кроветворные органы	29
Клеточные основы кроветворения	31
Кроветворение в антенатальном периоде	37
Регуляция кроветворения	39
ШУНТОВОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ (ГИПОТЕЗА). А.И. Воробьев	43
ВОЗРАСТНАЯ СМЕНА ПЛАСТОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ (ГИПОТЕЗА).	45
КОСТНЫЙ МОЗГ, КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ. М.Г. Абрамов, А.И. Воробьев	47
Клетки паренхимы костного мозга	48
Общая характеристика нормальных клеток лимфатического ряда	52
ПУНКЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА. М.Г. Абрамов, П.А. Воробьев	53
ПРИЖИЗНЕННОЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА. А.Н. Смирнов	55
Гистологическая техника обработки трепанатов	58
Гистоморфология костного мозга в норме	58
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ НОРМА. И.А. Грибова, П.А. Воробьев	61
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ. А.И. Колесникова, А.Н. Смирнов	63
Культуры гемопоэтических клеток в норме	64
Культуры гемопоэтических клеток при некоторых нарушениях гемопоэза	68
Гемопоэтические факторы роста	73
Перспективы клеточных культур в гематологии	73
РАДИОНУКЛИДНЫЕ МЕТОДЫ. Я.Ю. Сахибов	76
Радионуклидная метка эритроцитов	76
Радионуклидная метка тромбоцитов	78
Исследование функционально-топографического состояния костного мозга	79
Гамма-сцинтиграфия печени и селезенки	79
Лимфосцинтиграфия	80
Общеклинические тесты радионуклидной диагностики	80
КОМПЬЮТЕРНАЯ И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ. С.К. Терновой	81
СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ	88
ГРАНУЛОЦИТЫ. Ю.Э. Виноградова	88
Нейтрофилы	88
БАЗОФИЛЫ И ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ	93
ЭОЗИНОФИЛЫ	95
МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ. Е.А. Лукина	100
ЛИМФОЦИТЫ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНАЯ СИСТЕМА. Н.Н. Тулицин	106

Лимфоциты и тимус	113
Лимфоциты в периферических лимфоидных органах	114
Лимфоциты и селезенка	119
Костный мозг как периферический лимфоидный орган	121
Лимфоидная ткань слизистых (MALT) и кожи	122
Лимфоциты и иммунный ответ	123
ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ СИСТЕМЫ	125
ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ. <i>Е.Ю. Варламова</i>	129
Электрофоретические методы исследования	129
Иммунофиксированный электрофорез	132
Иммуноэлектрофорез	132
Методы количественного определения иммуноглобулинов	133
Особенности технологий иммунохимического анализа	136
Современная схема иммунохимического анализа	136
ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА В НОРМЕ.	
<i>М.И. Бронштейн, М.А. Френкель</i>	137
МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ГЕМАТОЛОГИИ. <i>Н.И. Дризе</i>	145
ЧАСТНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ	147
ГЕМОБЛАСТОЗЫ	147
ОБЩИЙ ПАТОГЕНЕЗ ГЕМОБЛАСТОЗОВ. <i>А.И. Воробьев</i>	147
ЭТИОЛОГИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ ЧЕЛОВЕКА. <i>А.И. Воробьев, М.Д. Бриллиант</i>	150
ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ В ГЕМАТОЛОГИИ. <i>Е.В. Флейшман</i>	152
ОСНОВНЫЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕРМИНЫ	153
ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ	153
Флюоресцентная in situ гибридизация(FISH)	154
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	155
ИЗМЕНЕНИЯ КАРИОТИПА ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ	156
Хронический миелолейкоз	156
Миелопролиферативные синдромы	159
Острые лейкозы	159
Опухоли лимфатической системы	169
Хронический лимфолейкоз	171
Миеломная болезнь	172
Лимфогранулематоз	172
Миелодисплазии	172
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. <i>А.И. Воробьев</i>	174
ВОПРОСЫ КЛАССИФИКАЦИИ ЛЕЙКОЗОВ	175
ОСТРЫЕ ЛЕЙКОЗЫ. <i>А.И. Воробьев, М.Д. Бриллиант, В.Г. Савченко</i>	175
ВВЕДЕНИЕ	175
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ	176
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИЦИРОВАНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ	179
ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ	182
Иммунодиагностика нелимфобластных острых лейкозов	183
ПРЕДЛЕЙКОЗ	188
КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПРИ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ	189
Периоды заболевания	189
Внекостномозговые поражения при острых лейкозах	191
ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ	195
ЭТАПЫ И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ	
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ	197
Вспомогательная терапия. Применение ростовых гемопозитических факторов	201
ОСОБЕННОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ	203
Острые миелоидные лейкозы	203
Острый миелобластный, монобластный и миеломонобластный лейкозы	205

Острый монобластный лейкоз	208
Острый промиелоцитарный лейкоз	209
Моноцитарный лейкоз новорожденных (врожденный моноцитарный лейкоз)	212
Острый эритробластный лейкоз (острый эритромиелоз, болезнь Ди Гульельмо)	212
Острый мегакариобластный лейкоз	214
Острый малопроцентный лейкоз	215
Вторичные острые нелимфобластные лейкозы	216
Нелимфобластные острые лейкозы у пожилых больных	216
Острые нелимфобластные лейкозы и беременность	217
Принципы терапии острых миелоидных лейкозов	218
Лечение острого промиелоцитарного лейкоза	221
Профилактика и лечение нейрорлейкемии у больных острыми нелимфобластными лейкозами	224
Лечение пожилых больных	225
Трансплантация костного мозга при острых нелимфобластных лейкозах	225
Рецидивы ОМЛ	226
Острые лимфобластные лейкозы	226
Прогностические факторы	229
Принципы терапии острого лимфобластного лейкоза	229
Профилактика и лечение нейрорлейкемии при остром лимфобластном лейкозе	231
Трансплантация костного мозга	233
Рецидивы острого лимфобластного лейкоза	233
Острый макрофагальный лейкоз	235
Острый плазмобластный лейкоз	235
Острый неклассифицируемый лейкоз	236
НОВЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ	236
ОСТРЫЙ ЛЕЙКОЗ У ДЕТЕЙ. Д. Пинкель	241
ПРОГРАММЫ ХИМИОТЕРАПИИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ. В.Г. Савченко	244
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ОПУХОЛИ	251
ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ. А.Г. Туркина	251
Лечение хронического миелолейкоза	256
Литература	264

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

КЛЕТКА

Введение

Живые системы используют постоянный поток вещества и энергии извне для поддержания гомеостаза - постоянства своей внутренней среды. Минимальной структурой, способной к длительному поддержанию гомеостаза (то есть к самоподдержанию) является клетка. Таким образом, клетка является элементарной структурной и функциональной единицей живых организмов. Отдельные процессы, происходящие на внутриклеточном уровне, поддерживать сами себя не могут. Практически все реакции, происходящие в клетках, в определенных условиях воспроизводятся в пробирке (*in vitro*), и потому внутриклеточные процессы можно рассматривать как совокупность химических реакций.

Клетки ныне живущих на Земле организмов разделяются на две большие группы - прокариотические, то есть лишенные ядра и цитоскелета (бактерии, сине-зеленые водоросли), и эукариотические, содержащие клеточное ядро и имеющие сложную внутреннюю организацию цитоплазмы (все остальные растения и животные, в том числе и человек).

Клетка для своего построения и жизнедеятельности использует пять основных типов малых молекул, из которых построены все ее макромолекулы. Четыре типа молекул - аминокислоты, нуклеотиды, сахара (углеводы) и жирные кислоты - являются органическими соединениями, а один тип - неорганическая молекула фосфата (остаток ортофосфорной кислоты).

Биологические макромолекулы (биополимеры)

Основными макромолекулами (биополимерами) являются нуклеиновые кислоты и белки. Их молекулярный вес достигает 1 000 000 дальтон (1000 кД), а у молекул ДНК, составляющих хромосомы, он еще выше. Общее количество макромолекул в клетке - порядка 10^9 . Количество разных белков в клетке, например в лимфоците, не менее, чем 10^4 . Таким образом, концентрация молекул биополимеров очень невелика, и каждая молекула обладает для клетки самостоятельной ценностью. Из-за большого молекулярного веса макромолекулы не образуют растворов в обычном понимании. В первом прибли-

жении растворы, например чистых белков, можно считать коллоидными. Однако молекулы биополимеров устроены довольно сложно - одна и та же молекула имеет гидрофильные и гидрофобные участки. Гидрофильные области обладают большой константой связывания с водой. В водном растворе (окружении) они гидратированы. Гидрофобные участки обладают малой константой связывания с водой и стремятся "избежать" водного окружения. В водном растворе они "спрятаны", то есть взаимодействуют с другими гидрофобными участками той же молекулы или с гидрофобными участками других молекул. В неполярных растворах ситуация противоположная. В частности, внутри мембраны гидрофобные области молекулы будут развернуты, а гидрофильные - спрятаны.

Пространственная структура биополимеров в значительной мере определяется соотношением их гидрофильных и гидрофобных областей, а также наличием специфических мест взаимодействия с другими молекулами и ионами. В зависимости от того, с чем взаимодействуют биополимеры, их структура может изменяться очень сильно. Например, гигантская (длиной в миллиметры) линейная молекула ДНК в результате взаимодействия с белками гистонами претерпевает сверхскручивание более чем в тысячу раз и помещается в относительно небольшом ядре диаметром около 10 микрон.

В жизни клетки многие молекулы биополимеров претерпевают обратимые изменения, например, фосфорилирование, ацетилирование и т.д. Эти перестройки приводят к изменению пространственной структуры молекул, что, в свою очередь, влияет на их взаимодействие с другими молекулами.

Функции фосфата. Остаток ортофосфорной кислоты обратимо присоединяется к различным органическим молекулам. Это присоединение сопряжено с затратой энергии, а соответственно отделение остатка фосфорной кислоты приводит к высвобождению энергии. С помощью фосфата образуется и поддерживается основное энергетическое депо клетки - АТФ, а также другие макроэнергетические соединения. Кроме того, молекулы фосфорной кислоты обеспечивают одновременное взаимодействие с водой и с не-

ОБОЗНАЧЕНИЯ

АДА	-	аденозиндезаминазы человека
АДФ	-	аденозиндифосфат
АПК	-	антигенпрезентирующая клетка
АТФ	-	аденозинтрифосфат
АЭ	-	α -нафтилацетат-эстераза
БК-ХМЛ	-	бластный криз при хроническом миелолейкозе
БОЕ-Э	-	бурстобразующая единица эритроидная
БЭ	-	α -нафтилбутират
БПА	-	бурст-промоторная активность
ВОЗ	-	Всемирная организация здравоохранения
ВЭВ	-	венулы с высоким эндотелием
ВИЧ	-	вирус иммунодефицита человека
ГЗТ	-	гиперчувствительность замедленного типа
Гр	-	Грэй
Г-6-ФД	-	глюкозо-6 фосфатдегидрогеназа
ДВС-синдром	-	синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНР	-	даунорубин
ИГП	-	иммуноглобулинопатии
ИКД	-	костномозговая диагностическая игла
ИТФ	-	противопоточный изотакхофорез
и-РНК	-	информационная РНК
ИФА	-	иммуноферментный анализ
ИЭФ	-	иммуноэлектрофорез
кДа	-	килодальтон
КИДК	-	клетки, инициирующие длительную культуру
КлОК	-	кластеробразующая клетка
КНЭ	-	кислая неспецифическая эстераза
КОЕ	-	колониеобразующая единица
КОЕ-Баз	-	колониеобразующая единица базофильная
КОЕ-Бл	-	колониеобразующая единица бластная
КОЕ-ВПП	-	колониеобразующая единица с высоким пролиферативным потенциалом
КОЕ-Г	-	колониеобразующая единица гранулоцитарная
КОЕ-ГЕМ	-	мультипотентный предшественник
КОЕ-ГМ	-	колониеобразующая единица гранулоцитарно-макрофагальная
КОЕ-ГММ	-	колониеобразующая единица - предшественница гранулоцитов, макрофагов и мегакариоцитов
КОЕ-ГЭ	-	колониеобразующая единица гранулоцитарно-эритроцитарная
КОЕ-ГЭММ	-	колониеобразующая единица - предшественница гранулоцитов, эритроцитов, макрофагов и мегакариоцитов
КОЕ-ГЭМ	-	колониеобразующая единица - предшественница гранулоцитов, эритроцитов, макрофагов
КОЕ-ДК	-	клетки предшественницы, формирующие колонии в диффузионных камерах <i>in vivo</i>
КОЕ-К	-	колониеобразующая единица в культуре
КОЕ-Л	-	клетка предшественница лимфопоэза
КОЕ-М	-	колониеобразующая единица макрофагальная
КОЕ-Мгкц	-	колониеобразующая единица мегакариоцитарная
КОЕ-ОМЛ	-	колониеобразующая единица клеток острого миелобластного лейкоза
КОЕ-С	-	колониеобразующая единица в селезенке
КОЕсмеш	-	колониеобразующая единица смешанная
КОЕ-Ф	-	стромальные клетки-предшественницы, формирующие колонии фибробластов в культуре
КОЕ-Э	-	колониеобразующая единица эритроидная
КОЕ-ЭМ	-	колониеобразующая единица эритроцитарно-мегакариоцитарная
КОЕ-Эоз	-	колониеобразующая единица эозинофильная
КООБ	-	Клетки, образующие области "бульжника"
КРКМ	-	клетки, реопулирующие костный мозг
КС	-	кондиционная среда
КТ	-	компьютерная томография
КФ	-	кислая фосфатаза
ЛГР	-	лимфогранулематоз
ЛДГ	-	лактатдегидрогеназа
ЛПС	-	липолисахариды
МДС	-	миелодиспластический синдром
МКА	-	моноклональные антитела
МПК	-	мезенхимальная полипотентная клетка-предшественница

MPT	- магнитно-резонансная томография
MЦЭ	- масса циркулирующих эритроцитов
Нм	- нанометры
НЭ	- нафтилацетат-эстераза
ОМЛ	- острый миелобластный лейкоз
ОММЛ	- острый миеломонобластный лейкоз
ОмоЛ	- острый монобластный лейкоз
ОЛ	- острый лейкоз
ОЛЛ	- острый лимфобластный лейкоз
ОНЛЛ	- острый нелимфобластный лейкоз
ОПЛ	- острый промиелоцитарный лейкоз
ПЛМ	- периартериоллярные лимфоидные муфты
пСКК	- покоящиеся стволовые кроветворные клетки
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
ПЭТ	- позитрон-эмиссионная томография
РНК	- рибонуклеиновая кислота
р-РНК	- рибосомальная РНК
РИД	- радиальная иммунодиффузия
РК	- ретиновая кислота
РОЭ	- реакция (феномен, скорость) оседания эритроцитов
РЧ-импульс	- разночастотный импульс
СМФ	- система мононуклеарных фагоцитов
СКК	- стволовая кроветворная клетка
СПИД -	- синдром приобретенного иммунодефицита
СПК	- слой прилипающих клеток
ТКМ	- трансплантация костного мозга
Т-ОЛЛ	- Т-лимфобластный острый лейкоз
Тпо	- тромбопоэтин
ФГА	- фитогемагглютинин
ФГА ЛКС	- среда, кондиционированная лейкоцитами периферической крови, стимулированными фитогемагглютинином
ФДК -	- фолликулярные дендритические клетки
ФРБ	- фактор роста фибробластов
ФСК	- фактор роста стволовых клеток
ХАЭ	- хлорацетат-эстераза
ХМЛ	- хронический миелолейкоз
ХММЛ	- хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХмоЛ	- хронический моноцитарный лейкоз
ХЛЛ -	- хронический лимфолейкоз
ЦИК	- циркулирующие иммунные комплексы
ЦНТФ	- цилиарный нейтрофильный фактор
ШИК	- ШИК-реакция, реакция с шифф-йодной кислотой
ЩФ	- щелочная фосфатаза
ЭКО	- эффективность колониеобразования
ЭК	- эмбриональные клетки
ЭРП	- эритропоэтин
ЭС	- эмбриональная стволовая клетка
ЭФ	- электрофорез
ЭФГ	- электрофореграмма
ЯМР	- ядерно-магнитный резонанс
Ara-C	- цитозин-арабинозид
AS	- α-нафтил-AS-ацетат
ATRA	- трансретиновая кислота
C	- константная область иммуноглобулина
CAFC	- Cobble Stone Area Forming Fells - клетки, образующие области "булыжника"
CAM	- молекулы клеточной адгезии
CCF	- специфический хемотаксический фактор
CD	- кластер дифференцировки (своего рода порядковый номер лейкоцитарных дифференцировочных антигенов)
CLA	- кожный лимфоцитарно-ассоциированный антиген
CSF	- колониестимулирующий фактор
DC	- дендритные клетки
del	- делеция хромосом
H	- тяжелая цепь иммуноглобулинов
Hb	- гемоглобин
Ht	- гематокрит

HLA	- human leucocyte antigens (антигены главного комплекса гистосовместимости у человека)
I	- инверсия хромосом
ICAM-1	- межклеточная молекула адгезии-1
Ig	- иммуноглобулин
IGF	- инсулиноподобный фактор роста
IL	- Interleukin - интерлейкин
INF	- интерферон
ECP	- эозинофильный катионный протеин
FAB	- ФАБ-классификация (Франция, Америка, Великобритания) острых лейкозов
Fc-Ig	- Fc-фрагменты иммуноглобулинов
FISH	- флюоресцентная гибридизация in situ
FcεR1	- высокоафинный IgE-рецептор
FcγRII	- высокоафинный Igγ-рецептор
FGF	- фактор роста фибробластов
G-CSF	- Granulocyte Colony Stimulating Factor - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	- Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
L	- легкая цепь иммуноглобулинов
LIF	- Leukemia Inhibiting Factor - лейкоз ингибирующий фактор
LT	- Лейкотриен
LTC-IC	- Long-Term Culture Initiating Cells - клетки, иницирующие длительную культуру
LFA	- лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген
LPS	- липополисахарид
LTB ₄	- лейкотриен B ₄
LTC ₄	- лейкотриен C ₄
M	- митотическая фаза клеточного цикла
MALT	- лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками
MCH	- среднее корпускулярное содержание гемоглобина
MCHC	- средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах
M-CSF	- макрофагальный колониестимулирующий фактор
MIP	- макрофагальный белок роста
M-CSF	- Macrophage Colony Stimulating Factor - макрофагальный колониестимулирующий фактор
MHC-I	- I класс комплекса гистосовместимости
MHC-II	- II класс комплекса гистосовместимости
MLL	- Ген myeloid lymphoid leukemia
MRC	- Marrow Repopulating Cells - клетки, репопулирующие костный мозг
NK	- естественные киллеры
PAS	- PAS-реакция, реакция с шифф-йодной кислотой
PAF	- фактор, активирующий тромбоциты
PDGF-β	- тромбоцитарный ростовой фактор β
PH	- концентрация водородных ионов
PGI ₂ , PGF ₂ ...	- простагландин I ₂ , F ₂ ...
PGE ₂	- простагландин E ₂
Ph	- филадельфийская хромосома
PML/RARα	- химерный ген - фрагмент PML из 15-й хромосомы и фрагмент гена, кодирующего рецептор α-ретиновой кислоты
RAG	- Recombination-activating genes - гетеродимерная эндонуклеаза
Rh	- резус фактор эритроцитов
S	- фаза клеточного цикла
SCF	- Stem Cell Factor; c-kit ligand; mast cell factor - фактор стволовых клеток
SKY	- Multicolor spectral karyotyping - мультицветовое спектральное кариотипирование
t	- транслокации хромосом
TCR	- T-клеточный рецептор
TGFβ	- трансформируемый фактор роста β
TdT	- терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза
T _{H1} , T _{H2}	- T-хелперы 1 и 2 типов
T _K	- T-киллеры
TNFα	- опухоленекротический фактор
V	- переменная область иммуноглобулина
VCAM-1	- эндотелиальная молекула адгезии-1
VLA	- очень поздние активационные антигены

полярными растворителями (амфифильности) **макромолекул** - фосфолипидов, нуклеиновых кислот. Присоединение фосфата ведет к обратимому изменению биологических свойств белков (фосфорилирование/дефосфорилирование белков), что используется в регуляции жизнедеятельности клетки.

Химические реакции. Специфическими реакциями живой клетки, которые не встречаются в неживой природе, являются процессы репликации (ДНК-ДНК), транскрипции (ДНК-РНК), трансляции (РНК-белок) и укладки или свертывания белковых молекул (folding).

Поскольку температура и давление в клетках постоянны, то практически для всех химических реакций используются высокоэффективные катализаторы - ферменты. Часто в одной реакции используется несколько последовательных катализаторов, собранных в многомолекулярные комплексы (например, рибосома - комплекс для синтеза белка, протеасома - комплекс для расщепления белка, комплекс ДНК-полимеразы). В результате скорость протекания реакций в клетке очень высока, несмотря на небольшую концентрацию реагирующих молекул. С помощью ферментов клетки эффективно поддерживают внутреннее равновесие и быстро переходят в процессе жизнедеятельности от одного равновесного состояния к другому.

Большинство реакций в клетке идет с затратой энергии, и лишь небольшая часть окислительных реакций снабжает энергией клетку. Основным источником энергии в клетке служат нуклеозидтрифосфаты, чаще всего - АТФ, концентрация которой поддерживается на максимально возможном уровне за счет окисления органических субстратов кислородом или за счет гликолиза. Благодаря этому концентрация АТФ в клетке очень мала (именно она, а не расход энергии, ограничивает скорость потребления кислорода), и реакции, использующие энергию АТФ, идут с максимальной скоростью.

Важнейшей чертой строения молекул белков и нуклеиновых кислот является их полярность, которая проявляется в различии двух концов молекулы. Полярность отражает матричный способ синтеза биополимеров. Существует три основных процесса матричного синтеза: репликация (как правило молекулы ДНК), транскрипция (синтез на ДНК молекулы РНК) и трансляция (синтез по молекуле РНК с помощью рибосомы молекулы белка). Для нуклеиновых кислот концы молекулы обозначаются как 3'- и 5'- концы. Для белков - С-конец и N-конец. Синтез молекулы РНК на матрице ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы всегда идет от 3'-конца к 5'-концу. Соответственно рост молекулы РНК происходит от 5'-конца к 3'-концу. Синтез молекулы белка

на рибосоме происходит всегда от N-конца к С-концу. Аналогично РНК-полимеразе, ДНК-полимераза при репликации ДНК присоединяет нуклеотид к 3'-концу существующей цепи ДНК. Поскольку репликация двухспиральной молекулы ДНК должна происходить одновременно на обеих нитях молекулы, а эти нити антипараллельны, то процесс идет в двух направлениях. В результате в одну сторону (от 3'-конца к 5'-концу материнской нити ДНК) процесс идет так же, как при синтезе РНК (один нуклеотид выстраивается за другим), а на противоположной нити он происходит гораздо сложнее и включает в себя формирование промежуточных фрагментов (вставок) из РНК (фрагменты Оказаки), которые затем замещаются на фрагменты ДНК. Репликация линейной молекулы ДНК из-за этого не может быть полностью завершена - на 5'-конце одной цепи происходит неполная репликация, и новая двойная спираль ДНК оказывается немного короче старой. Этот факт имеет существенные последствия для жизни клетки.

Структура клетки

Простейшая клетка представляет собой мешочек, ограниченный от внешней среды двухслойной мембраной. Такие клетки встречаются сравнительно редко (эритроцит). Даже многие бактерии имеют снаружи вторую мембрану, да еще и клеточную стенку. Клетки эукариот имеют одну наружную мембрану, но, кроме нее, сложную систему внутренних мембран.

Большинство клеток человеческого организма имеет общий план строения (рис. 1, 2). Снаружи клетка ограничена плазматической мембраной - *плазмолеммой*. Внутри располагается протоплазма, в которой выделяют клеточное ядро и цитоплазму с органоидами (митохондрии, эндоплазматическая сеть и т. д.).

Клеточные мембраны. Кроме плазмолеммы, множество мембран находится в цитоплазме клетки. Они отделяют друг от друга большинство клеточных органоидов. Толщина клеточных мембран составляет 6-12 нм. Основные компоненты мембраны - белки и липиды - составляют более 90% ее вещества. Кроме них, в большинстве мембран есть небольшое количество углеводов и полисахаридов. В плазмолемме их содержание доходит до 10 %.

Липиды мембран полярны, они образуют двойной слой (бимолекулярную пленку), хорошо смачиваемый водой снаружи, но малопроницаемый для воды и непроницаемый для большинства растворенных в ней веществ.

Белки мембран связаны с липидным слоем своими гидрофобными участками, часто они проходят липидный слой насквозь. Структура многих мембранных белков такова, что они не

могут в обычном состоянии находиться в водном растворе. Белки вместе с липидами создают непрерывную структуру мембраны.



Рис. 1. Электронограмма части клетки из культуры ткани. Ув. 15 000.

1 - ядро; 2 - ядрышко; 3 - фибриллы хроматина; 4 - поры; 5 - ядерная оболочка; 6 - гранулярный эндоплазматический ретикулум; 7 - аппарат Гольджи (пластинчатый комплекс); 8 - лизосома; 9 - митохондрии; 10 - полисомы; 11 - центриоль.

В целом мембрана находится в жидком состоянии, т. е. липиды и некоторые белки способны свободно перемещаться в ней. Мозаично-жидкостная модель мембраны представлена на рис. 3. Однако многие белки, входящие в состав мембран, закорены своими выступающими участками за другие белки, находящиеся вне мембраны. Подвижность таких белков весьма ограничена. Основным свойством биологических мембран является их полупроницаемость, т. е. способность пропускать одни вещества и задерживать другие. Все мембраны внутри клетки замкнуты сами на себя, что в сочетании с их полупроницаемостью создает возможность для концентрации различных веществ в разных отсеках клетки.

Среди мембран наиболее сложно устроена и наиболее разнообразно функционирует плазмолемма. На ее наружной поверхности находятся

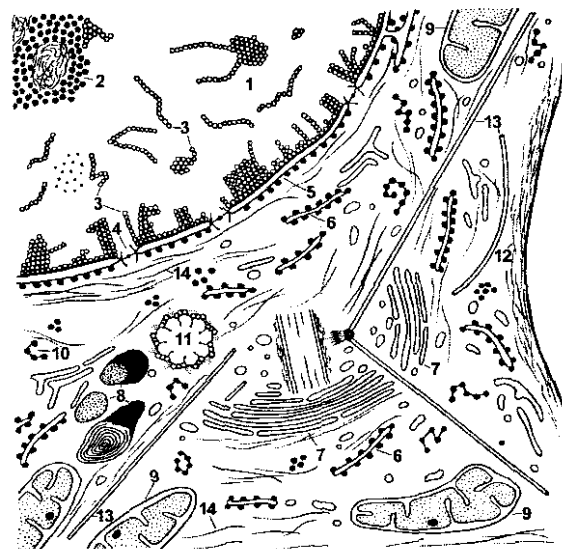


Рис. 2. Схема строения фрагмента клетки, изображенной на рис. 1.

12 - микрофиламенты; 13 - микротрубочки; 14 - 10-нанометровые филаменты. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

специализированные молекулы клеточных рецепторов. Рецепторы служат для «узнавания» одними клетками других (например, по специфическим рецепторам лимфоцит-киллер «узнает» чужеродные клетки-мишени среди всех клеток организма и избирательно уничтожает их), с их помощью клетка воспринимает разные сигналы из внешней среды (сигналами служат главным образом химические вещества - гормоны, медиаторы, простагландины и т. д.).

Большинство рецепторов представляет собой сложные молекулы гликопротеидов. Белковая часть молекулы входит внутрь липидного бислоя мембраны. Углеводная часть молекулы расположена целиком снаружи. В совокупности гликопротеиды образуют на поверхности плазматической мембраны сплошной рыхлый слой, толщина которого может в несколько раз превосходить толщину самой мембраны. Этот слой получил название гликокаликса. Состав гликокаликса уникален для каждого типа клеток, он играет основную роль в «узнавании» клетками друг друга и в образовании межклеточных контактов.

Второй функцией плазмолеммы, общей для всех клеточных мембран, является избирательный перенос молекул различных веществ внутрь клетки и выведение их из нее. Существует четыре способа проникновения веществ внутрь клетки (рис. 4): простая диффузия через липидный бислой (так в клетку попадают вода, кислород,

из нее выходят углекислый газ, мочевины); облегченная диффузия - она отличается от простой тем, что для нее в мембране имеются специальные белки (пермеазы), облегчающие движение через мембрану тех веществ, для которых ее проницаемость мала. С помощью пермеаз в клетки входят глюкоза и многие аминокислоты. И простая, и облегченная диффузия идет через плазмолемму без затраты энергии.

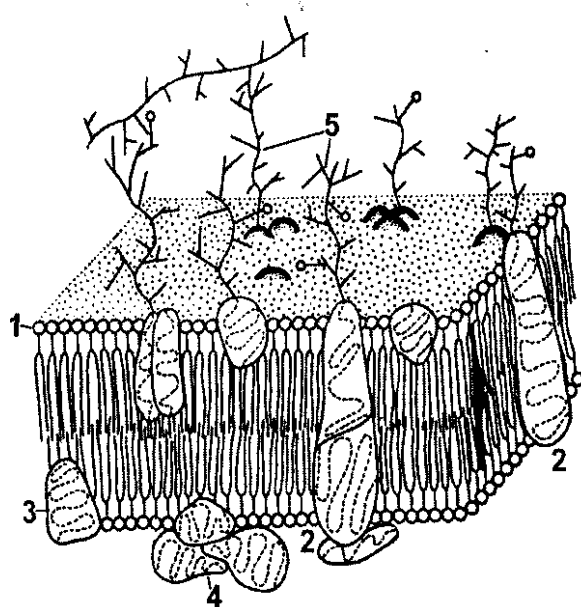


Рис. 3. Модель строения плазматической мембраны (по Singer, Nicolson, 1972; рис. И.Н. Першиной). 1 - липидный слой; 2 - интегральные белки; 3 - полуинтегральные белки; 4 - поверхностные белки; 5 - гликокаликс.

Активный транспорт требует затраты энергии (как правило это энергия расщепления АТФ). Наибольшие затраты энергии идут на транспорт против градиента концентрации ионов калия и натрия. За счет энергии, высвобождающейся при расщеплении АТФ, клетка поддерживает внутри себя концентрацию натрия в 10 раз меньше, а калия в 30 раз больше, чем снаружи. Аналогичным образом внутри клетки мембраны эндоплазматической сети «откачивают» кальций, забирая его из цитозоля.

Наиболее сложным способом попадают в клетку крупные молекулы белков и ряда других веществ, которые не могут быть непосредственно перенесены сквозь мембрану, или же их перенос неблагоприятен для клетки. Этот перенос осуществляется путем *вворачивания* плазмолеммы внутрь и отпочковывания от нее мелких пузырьков. Он получил название *эндоцитоза*. Обратный процесс *экзоцитозом*.

Эндоцитоз начинается с того, что молекулы вещества взаимодействуют с рецепторами на поверхности клетки, затем участок мембраны с

прикрепившимися к его поверхности молекулами *вворачивается* внутрь и отшнуровывается от плазмолеммы. Образовавшийся мембранный пузырек чаще всего сливается с лизосомой и содержащееся в нем вещество *расщепляется* ферментами на более мелкие молекулы, уже непосредственно поступающие в цитоплазму. Необходимо подчеркнуть, что при этом поступающее внутрь клетки вещество не попадает в цитозоль.

Клеточные органеллы

Ядро - самая крупная и важная из всех внутриклеточных структур. В большинстве клеток имеется одно ядро, хотя в организме человека есть дву- и многоядерные клетки (гепатоциты, мегакариоциты, остеокласты). Ядро является основным местом хранения и считывания генетической информации. Наличие ядра является необходимым условием для размножения клетки. Кроме ядра, небольшое количество ДНК находится в митохондриях.

От цитоплазмы ядро отделено ядерной оболочкой. Ядерная оболочка - *кариолема* - состоит из двух мембран - наружной, непосредственно контактирующей с цитоплазмой, и внутренней. На наружной мембране расположены рибосомы, она может непосредственно переходить в мембраны эндоплазматической сети, а межмембранное пространство ядерной оболочки переходит во внутреннее пространство эндоплазматической сети. Ядерная оболочка пронизана ядерными порами. Ядерная пора представляет собой многокомпонентную структуру диаметром около 100 нм. В ее состав входят центральная «диафрагма» и 8 пар периферических субъединиц. Ядерные поры проницаемы для низкомолекулярных веществ и небольших белков (до 30 кД) и обеспечивают избирательный перенос макромолекул (больших белков и РНК). Для переноса имеется система белков, «узнающая» специальные участки молекул, которые называются «сигналы ядерной локализации». Такие «сигнальные» последовательности имеются в составе входящих в ядро белков и на информационных РНК. Регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта осуществляется за счет модификации сигнального участка.

К внутренней ядерной мембране примыкает специальный белковый слой - *ламина*. Этот слой состоит из нескольких белков (ламинов), которые фосфорилируются во время деления и дефосфорилируются после его окончания. Изнутри к ламине примыкает сплошной слой периферического хроматина. Ламины обеспечивают ассоциацию хроматина с ядерной мембраной и отвечают за распад и реконструкцию ядерной оболочки в процессе деления.

Внутреннее содержимое ядра традиционно разделяют на хроматин, ядрышки (нуклеолы) и кариоплазму.

Хроматин является основным веществом, которое окрашивается в ядре при использовании стандартных гистологических красителей. Он представляет собой комплекс белков и ДНК - нуклеопротеид. В состав хроматина входят ДНК и белки в соотношении 1: 1,5 и небольшое количество РНК. Белки хроматина подразделяются на 2 большие группы: основные белки (гистоны) и кислые (негистоновые) белки.

Гистоны представлены молекулами 5 основных типов, которые в определенном порядке равномерно располагаются по длине молекулы ДНК, обеспечивая ее упаковку в элементарную фибриллу хроматина (рис. 5). Элементарная фибрилла хроматина имеет толщину около 30 нм; гигантская молекула ДНК (одна молекула на целую хромосому!) свернута с помощью гистонов таким образом, что ее длина уменьшается в 40 раз. Входящие в состав элементарной фибриллы глобулы, в свою очередь, можно разделить на более мелкие глобулы (диаметром 10 нм), получившие название нуклеосом.

В ядре фибриллы хроматина могут быть расположены относительно рыхло, формируя видимый в световой микроскоп диффузный хроматин (эухроматин). Частично они собраны вместе, образуя глыбки хроматина - конденсированный хроматин (гетерохроматин). В большинстве клеток взрослого организма много конденсированного хроматина. Исключение составляют некоторые интенсивно делящиеся клетки. Как правило специализированные клетки имеют более конденсированный хроматин в ядрах, чем клетки-предшественницы. Диффузный хроматин характерен для эмбриональных клеток, его количество возрастает при перенесении клеток из организма в культуру *in vitro*.

Общее количество хроматина в ядре клетки постоянно - оно определяется количеством ДНК. Большинство ядер в клетках организма содержат количество ДНК, соответствующее диплоидному набору хромосом. Клетки, способные к размножению, удваивают свою ДНК и хроматин при подготовке к делению. Новая ДНК синтезируется на нитях существующей ДНК, как на матрицах (полуконсервативный механизм репликации), и две двуспиральные молекулы разделяются друг от друга с помощью специального фермента - топоизомеразы. Разделенные молекулы ДНК сразу же покрываются гистонами и сворачиваются в нуклеосомы. Для кольцевых молекул ДНК полуконсервативный механизм работает идеально. Но молекулы ДНК у эукариот линейны, и описанный выше полуконсервативный механизм синтеза не может обеспечить правильного удвоения всей молекулы, так как сви-

вается на концах. Поэтому для правильной надстройки концов молекулы ДНК существует специальный фермент - теломераза. В отличие от ДНК-полимераз и топоизомераз этот фермент работает далеко не во всех клетках. В отсутствие теломеразы ДНК при каждом цикле удвоения немного укорачивается. В результате постепенного укорочения ДНК нарушается работа генов, расположенных на концах хромосомы, что может быть одним из механизмов клеточного старения.

На ДНК-матрице осуществляется синтез РНК - информационных (и-РНК), транспортных и рибосомальных, которые участвуют в биосинтезе белка (рис. 6). Кроме них, в ядре синтезируются так называемые низкомолекулярные РНК, чьи функции связаны с ядерно-цитоплазматическим транспортом.

После синтеза и-РНК претерпевают ряд превращений, когда части молекулы удаляются (сплайсинг, процессинг), и, наконец, надстраиваются с одного конца полиаденином, поэтому и-РНК не являются точной копией ДНК. Надстройка полиаденином увеличивает время жизни и-РНК в цитоплазме, где постоянно работают РНК-азы. Синтезированные на одной и той же матрице ДНК и-РНК в разное время могут отличаться друг от друга - так возникают изоформы белков. В некоторых случаях в результате превращений на базе одной и той же матрицы (альтернативный сплайсинг) могут получаться совершенно разные молекулы РНК.

В отличие от и-РНК, рибосомальные РНК (р-РНК) всегда формируются одинаково и образуют частицы - субъединицы рибосом. Образование рибосомных частиц происходит в *ядрышке*. В состав ядрышка входит небольшое количество ДНК (гены, на которых записаны во множестве копий последовательности для р-РНК), а основную массу составляют р-РНК и белки. Вскоре после синтеза на ДНК р-РНК покрывается входящими из цитоплазмы белками и уже в ядрышке образуются практически готовые субъединицы рибосом (большая и малая), которые затем выходят в цитоплазму. Полностью рибосомы собираются только в цитоплазме и только на период синтеза белка (трансляции). Как правило ядрышки в клетках хорошо различимы в световой микроскоп. Они окружены плотным хроматином и контактируют с ядерной оболочкой. Общее число ядрышек в клетках непостоянно, обычно от 1 до 4, редко больше. В клетках, где биосинтез белка практически подавлен, ядрышек может вообще не быть (гранулоциты). Максимально возможное число ядрышек ограничено числом хромосом, где содержатся гены (матрицы) для р-РНК - ядрышковые организаторы. Четвертый компонент ядра, *кариоплазма*, до последнего времени представлялась жидкой

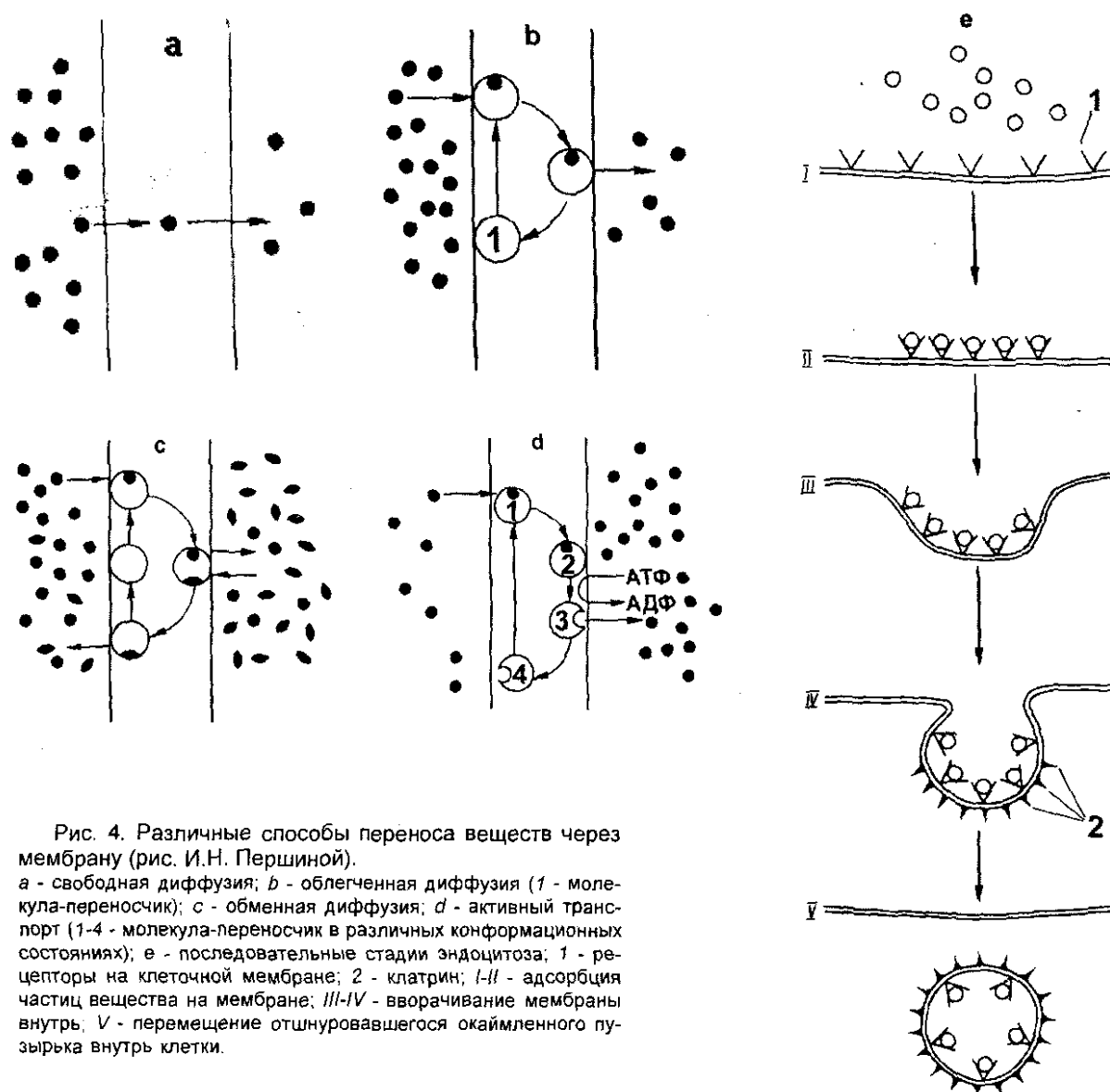


Рис. 4. Различные способы переноса веществ через мембрану (рис. И.Н. Першиной).
 а - свободная диффузия; б - облегченная диффузия (1 - молекула-переносчик); с - обменная диффузия; д - активный транспорт (1-4 - молекула-переносчик в различных конформационных состояниях); е - последовательные стадии эндоцитоза; 1 - рецепторы на клеточной мембране; 2 - клатрин; I-II - адсорбция частиц вещества на мембране; III-IV - вворачивание мембраны внутрь; V - перемещение отшнуровавшегося окаймленного пузырька внутрь клетки.

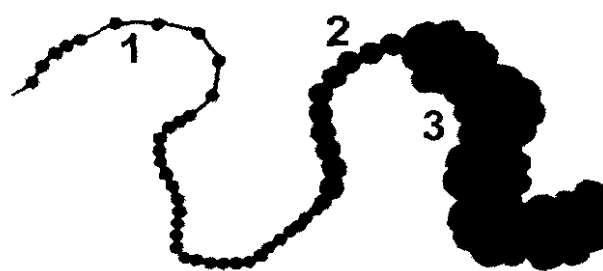


Рис. 5. Организация хроматина и митотической хромосомы.
 1 - нуклеосомы; 2 - нуклеомеры; 3 - хромонема.

субстанцией, в которой "плавали" хроматин и ядрышки. Действительно, форма ядра поддер-

живается в основном хроматином, но синтезируемая, хранимая и транспортируемая внутри ядра РНК распределена в нем закономерным образом. По-видимому, внутри ядра существует лабильная пространственная сеть, наподобие цитоскелета в цитоплазме, которая обеспечивает упорядоченное распределение РНК, комплексов для ее синтеза и комплексов для репликации ДНК.

Структура митотических хромосом. Во время деления клетки (митоза) происходят конденсация хроматина, разрушение ядерной оболочки и растворение ядрышка. Как диффузный, так и конденсированный хроматин перестраивается, образуя плотные, интенсивно красящиеся тельца - хромосомы. Число и форма хромосом

постоянны у одного вида организма, что делает их удобными маркерами для анализа клеток. Число хромосом есть число молекул ядерной ДНК, а перестройки хромосом есть результат разрыва и неправильной сшивки этих молекул. Хромосомы в виде индивидуальных структур существуют в ядре и в промежутках между делениями, но рыхлое расположение хроматиновых фибрилл создает впечатление хаотичной упаковки хроматина в неделящемся (интерфазном) ядре.

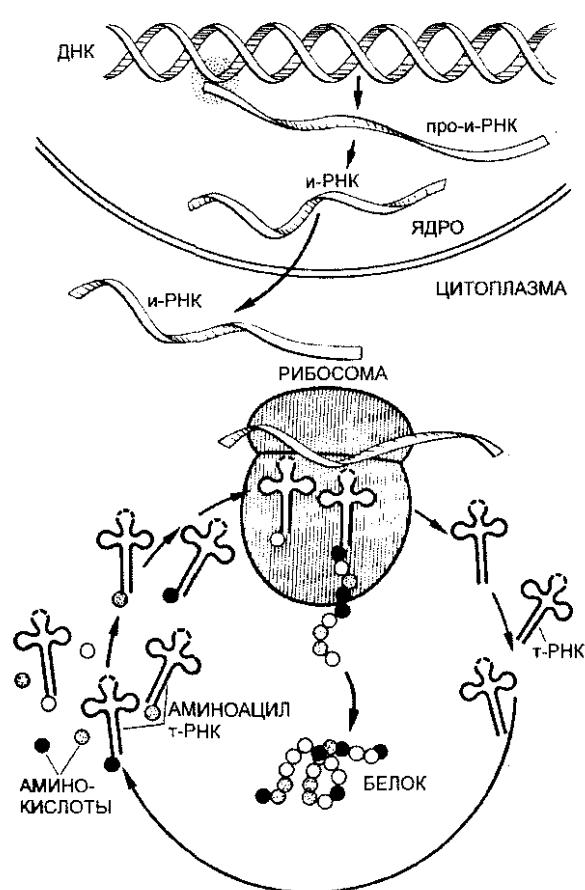


Рис. 6. Схема биосинтеза белка (по А.С. Спирину, Л.П. Гавриловой, 1973).
и-РНК - информационная РНК; т-РНК - транспортная РНК.

В митотической хромосоме с помощью светового микроскопа можно видеть область первичной перетяжки - центромеру и плечи. Если центромера располагается на самом краю хромосомы, то плечо будет одно (acrocentric хромосома). Если посередине, то плечей два, и она называется метацентрической, если центромера сдвинута к одному краю, то получается submetacentric хромосома.

Более подробное изучение строения хромосом проводится с помощью методов дифференциального окрашивания и флуоресцентных зон-

дов, узнающих различные участки ДНК (FISH-анализ).

Вопрос о том, как обеспечивается компактная и упорядоченная укладка элементарной фибриллы хроматина в тело хромосомы, обеспечивающая ее индивидуальность, пока не выяснен. Конденсация хромосом связана с фосфорилированием белков хроматина и запускается тем же каскадом, что и остальные события клеточного деления.

Цитоплазма. Митохондрии видны в живой клетке в виде маленьких шариков, тонких палочек и нитей. В некоторых случаях они имеют сложную форму и даже могут образовывать сеть - митохондриальный ретикулум. Одиночные митохондрии подвижны - они совершают время от времени скачкообразные перемещения в цитоплазме. Форма и объем, занимаемый митохондриями в клетке, непостоянны - могут происходить набухания и сжатия. В живых клетках митохондрии можно наблюдать либо с помощью фазово-контрастной микроскопии, либо (рис. 7) вводя флуоресцентные положительно заряженные красители. На фиксированных препаратах и

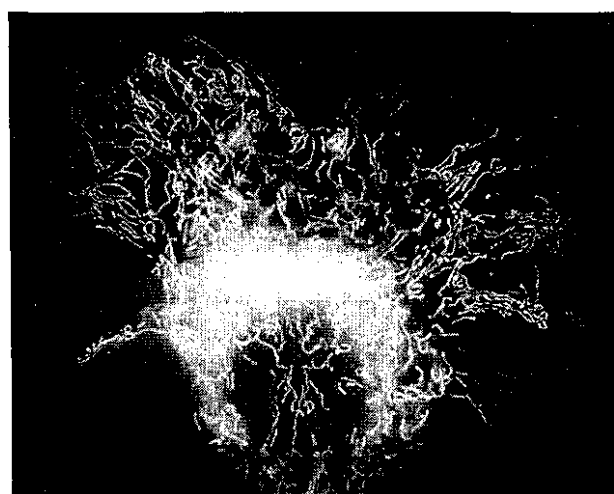


Рис. 7. Прижизненное окрашивание митохондрий этилпроламином в клетках культуры ткани. Флуоресцентная микроскопия (из Vorobjev, Zorov, 1980). Ув. 800.

срезах ткани митохондрии выявляются только при специальных способах фиксации и методов окраски или с помощью иммуноцитохимии.

Митохондрии имеют две мембраны - наружную и внутреннюю. Наружная мембрана гладкая, а внутренняя образует многочисленные складки - кристы. В некоторых местах наружная и внутренняя мембраны контактируют друг с другом, образуя митохондриальные поры, но они не переходят одна в другую. Химический состав двух мембран резко различен. Наружная мембрана содержит мало белка и проницаема для боль-

шинства низкомолекулярных веществ и ионов. Внутренняя мембрана содержит до 60% белка и практически не проницаема для ионов, зато имеет системы активного транспорта для ионов водорода, калия, кальция и некоторых других.

В функциональном отношении митохондрии представляют собой весьма специализированный биохимический комплекс, служащий для извлечения энергии при помощи окислительных реакций и ее превращения в энергию электрохимического потенциала, а затем в энергию фосфорных связей АТФ. Основная часть этого процесса происходит на внутренней митохондриальной мембране, где сконцентрированы ферменты системы окислительного фосфорилирования. В результате работы окислительных ферментов снаружи накапливаются ионы водорода (поэтому внутренняя митохондриальная мембрана заряжена подобно обкладкам конденсатора), а затем, по мере переноса ионов водорода обратно, на встроенной в мембрану АТФ-азе синтезируется АТФ. В нормальных клетках скорость дыхания (уровень потребления кислорода) лимитируется концентрацией АДФ. Таким образом, увеличение уровня потребления АТФ автоматически приводит к повышению скорости дыхания. Если организм нуждается в повышенной выработке тепла, то синтез АТФ подавляется и вся энергия биологического окисления рассеивается в виде тепла; происходит так называемое разобщение окисления и фосфорилирования. Это разобщение сопровождается набуханием митохондрий и снижением разности потенциалов на внутренней митохондриальной мембране. Скорость дыхания при разобщении митохондрий возрастает в несколько раз. Сильно меняется и ультраструктура митохондрий: их внутреннее содержимое (матрикс) становится более плотным, кристы расширяются. Сходные изменения происходят в митохондриях, когда клетки находятся в условиях гипоксии.

Помимо дыхания и выработки энергии, митохондрии участвуют в регуляции поведения клетки. Они являются депо ионов кальция, участвуют в запуске апоптоза.

Митохондрии являются полуавтономными органоидами клетки, так как имеют свою собственную ДНК и аппарат синтеза белка, которые располагаются в матриксе. В отличие от ядерной ДНК, митохондриальная ДНК не образует комплекса с белками (хроматина). Ее длина невелика, и митохондрия сама по себе способна синтезировать лишь белки своих рибосом и несколько белков, входящих в состав внутренней мембраны. Абсолютное большинство митохондриальных белков синтезируется в цитоплазме и кодируется в ДНК ядра. Эти белки попадают в митохондрию потому, что они имеют специальный

участок молекулы - адрес митохондриальной локализации.

Высокая лабильность митохондрий, особенно изменчивость их структуры под действием различных неблагоприятных для клетки факторов, позволяют рассматривать их в качестве индикаторов повреждения или угнетения жизнедеятельности клеток. В большинстве случаев изменения митохондрий обратимы, и они могут вновь вернуться в нормальное состояние. В некоторых случаях изменения в митохондриях способны вызвать программируемую гибель клетки - апоптоз.

Рибосомы представляют собой мультиферментные комплексы, которые в электронном микроскопе видны как гранулы диаметром около 20 нм. Они либо свободно лежат в цитоплазме, либо прикрепляются к наружной ядерной мембране или к мембранам эндоплазматической сети. Рибосомы являются центральным звеном в системе биосинтеза белка (см. рис. 7). Во время синтеза белка через рибосому протягивается молекула и-РНК. Поскольку длина и-РНК в несколько раз больше диаметра рибосомы, то на одной молекуле располагаются подряд несколько частиц. Комплекс рибосом с и-РНК получил название полирибосомы. Наличие полирибосом в клетке является индикатором синтеза белка. При его прекращении полирибосомы быстро распадаются на одиночные рибосомы. Такой распад происходит в клетках, вступающих в деление; он может быть вызван воздействием на клетку различных токсических веществ. Поскольку в составе рибосом довольно много РНК (45% от общей массы частицы), скопления рибосом в цитоплазме клеток обеспечивают ее базофильную окраску, подобно тому, как ДНК хроматина дает базофильную окраску ядра. Пример такой базофилии цитоплазмы мы находим в эритроблесте, где многочисленные рибосомы синтезируют гемоглобин. Базофильная окраска цитоплазмы характерна также для быстрорастущих клеток в зародышах и в некоторых опухолях.

Рибосомы, расположенные в цитоплазме, синтезируют белки цитозоля и ядерные белки. В противоположность им рибосомы на мембранах эндоплазматической сети синтезируют в основном белки, которые идут на построение мембран или выделяются из клеток наружу (пищеварительные ферменты, антитела). Рибосомы эндоплазматической (гранулярной) сети прикрепляются к ее мембранам с помощью специальных белков и этим отличаются от свободных рибосом. В процессе синтеза белка они также группируются в полирибосомы.

Синтезируемые на эндоплазматической сети молекулы белков имеют на переднем конце так называемую сигнальную последовательность -

цепочку аминокислот, обеспечивающую немедленное попадание строящейся молекулы белка в мембрану или прохождение сквозь нее. После окончания синтеза сигнальная последовательность отщепляется от готовой молекулы, не давая ей возможности выйти в цитозоль. В результате синтезируемые на гранулярной эндоплазматической сети белки накапливаются либо в ее мембранах, либо внутри ее цистерн. В дальнейшем эти белки в виде мембранных пузырьков переносятся в аппарат Гольджи, где претерпевают ряд превращений.

В клетках существует две разновидности эндоплазматической сети - уже упоминавшаяся гранулярная и гладкая, лишенная рибосом. Обе системы образованы мембранами толщиной около 6 нм и имеют сходный белковый состав. Вместе они составляют в клетке, по-видимому, общую систему.

Основной функцией эндоплазматической сети является формирование мембран. Все мембраны клетки (кроме митохондрий) ведут свое происхождение из эндоплазматической сети. Вся эндоплазматическая сеть содержит в своих мембранах систему для активного переноса внутрь ионов кальция. Специализированным производным эндоплазматической сети является так называемая гладкая (то есть лишенная рибосом) эндоплазматическая сеть. Непосредственно в гладкой сети происходит синтез некоторых липидов, гормонов небелковой природы (стероиды), разрушение ядов и лекарственных препаратов; она участвует в образовании гранул тликогена (запасного вещества в клетках животных).

Большое количество мембран эндоплазматической сети характерно для специализированных секреторных клеток (например, плазматических).

Аппарат Гольджи (пластинчатый комплекс) - система специализированных мембран, связанная с секрецией, образованием клеточной мембраны и лизосом. Особенно сильное развитие аппарата Гольджи можно видеть в секреторных клетках, например, в бокаловидных клетках тонкой кишки. Мембраны аппарата Гольджи происходят из гранулярной эндоплазматической сети, но располагаются в виде стопок параллельно сложенных и не сообщающихся друг с другом плоских мешочков - диктиосом (рис. 8). Диктиосома полярна - она имеет проксимальный и дистальный концы. Исследования с помощью меченых атомов показали, что в стопке мембранных мешочков отшнуровываются пузырьки с секреторными веществами, а к нижнему краю подставляются мелкие пузырьки из эндоплазматической сети. По мере продвижения мешочка от основания диктиосомы к ее вершине происходит утолщение его мембраны от 6-7 нм в начале до 10

нм в конце. Внутри мешочков в диктиосоме происходит преобразование белков и мембран. В результате этого образуются сложные гликопротеиды, формирующие гликокаликс плазмолеммы; секретируемые белки также преобразуются, они упаковываются в секреторные гранулы столь плотно, что между ними практически не остается молекул воды. Так же плотно упаковываются ферменты в первичных лизосомах.

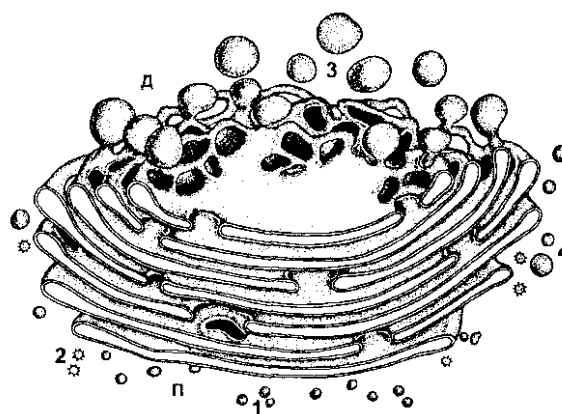


Рис. 8. Схема строения аппарата Гольджи или диктиосомы (рис. И.Н. Першиной). п - проксимальный конец; д - дистальный конец; 1 - транспортные пузырьки из эндоплазматического ретикулума; 2 - оокисленный пузырек; 3 - секреторные гранулы; 4 - лизосомы.

После отделения от дистальной части диктиосомы секреторные пузырьки движутся по направлению к плазмолемме и сливаются с ней. Мембрана пузырьков выворачивается наизнанку, и ее внутренняя поверхность оказывается наружной поверхностью плазмолеммы. В итоге белки, синтезированные на рибосомах гранулярной эндоплазматической сети, оказываются встроенными в плазмолемму или выделенными наружу из клетки, ни разу не побывав в ее цитоплазме. Лизосомы представляют собой мелкие (диаметром 0,1-0,4 мкм) пузырьки, ограниченные одинарной мембраной и содержащие внутри набор гидролитических ферментов. Лизосомы являются производными аппарата Гольджи. Некоторое время после образования лизосом ферменты в них находятся в неактивном состоянии (I лизосомы). Активация ферментов происходит либо при повреждении мембраны лизосом (клеточный аутолиз), либо при слиянии I лизосом с эндоцитозным пузырьком или при поглощении ею «состарившегося» клеточного органоида (например, митохондрии). В результате образуется более обширный пузырек - фагоцитирующая вакуоль, или II лизосома. Лизосомальные ферменты в фагоцитирующей вакуоли расщепляют высокомолекулярные вещества - белки, нуклеино-

вые кислоты, полисахариды до мономеров, а они через мембрану фагосомы попадают в цитоплазму.

В лизосомах отсутствуют липазы, и поэтому в фагосоме не происходит полного распада мембран. В результате переваривания образуется небольшое, так называемое остаточное тельце, которое или остается в клетке, или выводится наружу. Накапливающиеся во II лизосомах мембраны могут давать так называемые миелоновые фигуры. Накопление миелоновых фигур считается одним из признаков старения клетки; оно характерно для некоторых заболеваний. Общий цикл превращений лизосом представлен на рис. 9.

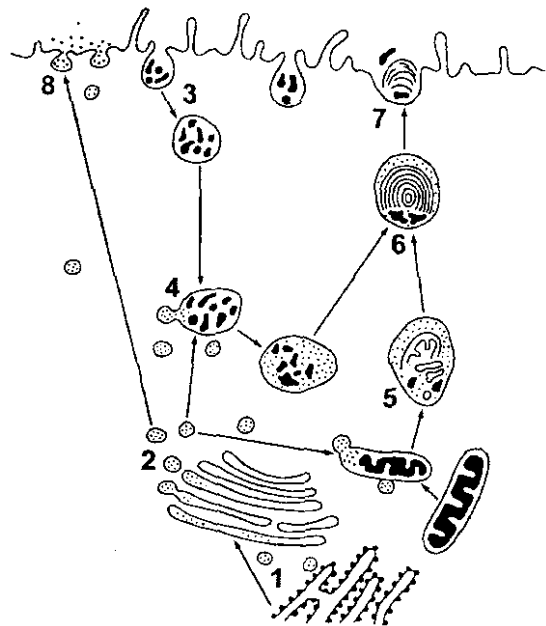


Рис. 9. Образование и превращение лизосом в клетке.

1 - пузырьки с гидролитическими ферментами переходят от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи; 2 - образование первичных лизосом; 3 - эндоцитозные пузырьки; 4 - образование вторичных лизосом; 5 - образование аутофагосом; 6 - телоллизосома; 7 - выброс остаточных телец; 8 - выделение лизосомальных ферментов во внешнюю среду (внеклеточное пищеварение).

Кроме перечисленных выше органоидов, в клетках присутствуют и другие образованные мембранами структуры. Наиболее распространенные среди них - мультивезикулярные тельца, микротельца (пероксисомы) и окаймленные пузырьки.

Мультивезикулярные тельца представляют собой, по-видимому, одно из производных II лизосом, а свое название они получили из-за множества мелких пузырьков, ограниченных мембраной внутри одного большого пузырька.

Микротельца содержат в основном один фермент - каталазу, с помощью которой они окисляют перекись водорода до воды. Каталаза может до некоторой степени замещать работу нескольких митохондриальных ферментов, а главное, она препятствует накоплению в клетке перекисных соединений, что могло бы приводить к нежелательному окислению различных органических веществ и повреждению мембран.

В отличие от большинства клеточных органоидов *центриоли* не имеют в своем составе мембран. Их форма и размеры удивительно постоянны (рис. 10). Они представляют собой цилиндр длиной 0,4 мкм и диаметром 0,2 мкм. Число центриолей в клетке постоянно - их 2 (в

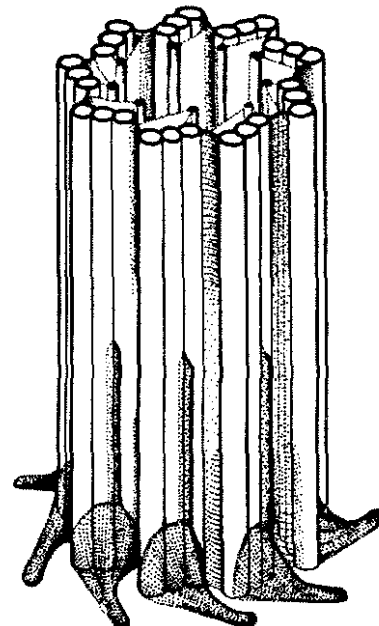


Рис. 10. Трехмерная модель строения центриоли (из Vorobjev, Chentsov, 1980).

полиплоидных клетках центриолей может быть больше - 4, 8, 16). В процессе подготовки клетки к делению центриоли удваиваются, образуя 2 пары. Удвоение центриолей происходит в интерфазе и совпадает по времени с периодом синтеза ДНК. Рост дочерних центриолей в длину заканчивается к середине митоза, но созревание продолжается еще в течение всего следующего клеточного цикла. Таким образом, после деления в клетке оказываются одна зрелая и одна незрелая центриоли.

Основная функция центриолей состоит в организации радиальной системы микротрубочек, с помощью которых осуществляется транспорт от периферии клетки к центру и обратно. В клетках крови и соединительной ткани центриоли ассоциированы с комплексом Гольджи. В митозе

расходящиеся пары центриолей определяют расположение полюсов веретена деления. Вокруг материнских центриолей располагается облако - митотическое гало, которое является местом образования микротрубочек веретена. После деления вокруг материнской центриоли скапливаются электронно-плотные сгустки диаметром 40-80 нм, от которых растут микротрубочки в цитоплазме. Кроме того, во многих клетках (но не в клетках крови) материнская центриоль образует неподвижную ресничку.

Цитоскелет - это система пронизывающих цитоплазму нитчатых (фибриллярных) структур, обеспечивающая опорно-двигательные функции в клетке. Большинство элементов цитоскелета (за исключением промежуточных филаментов) более или менее лабильны и довольно быстро обновляются. Цитоскелет обеспечивает как сохранение, так и изменение формы клетки. Основными элементами цитоскелета в клетках позвоночных животных и человека являются микротрубочки, промежуточные (толщиной 10 нм) филаменты и микрофиламенты (рис. 11). По-видимому, все слагающие цитоскелет структуры связаны в клетке в единую общую сеть.

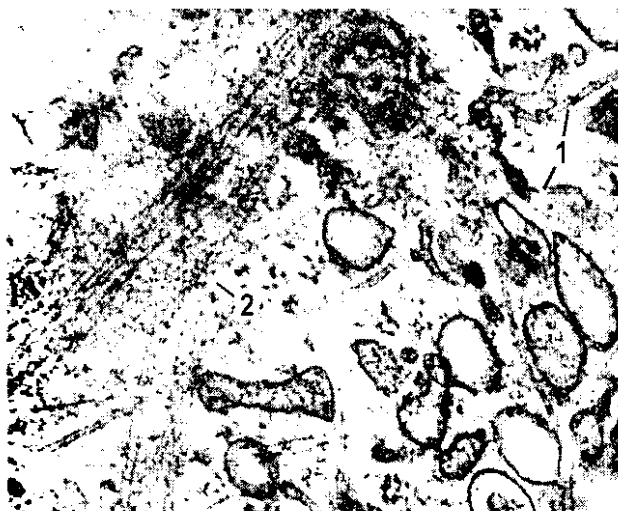


Рис. 11. Элементы цитоскелета. Электронограмма. Ув. 75 000.
1 - микротрубочки; 2 - микрофиламенты.

Микротрубочки представляют собой полярные цилиндрические образования диаметром 22-24 нм и длиной до нескольких десятков микрометров. Основной компонент микротрубочек - белок тубулин. В клетке микротрубочки определяют направление движения внутриклеточных структур (митохондрий, секреторных гранул и т. п.); они обеспечивают, в частности, поддержание асимметричной формы фибробластов, участвуют в процессе секреции и всасывания. Во время деления микротрубочки формируют мито-

тический аппарат, обеспечивающий расхождение хромосом. Микротрубочки являются чрезвычайно лабильными структурами. Время жизни отдельной микротрубочки составляет от нескольких минут (в интерфазе) до нескольких секунд (во время деления). Любые изменения динамики микротрубочек приводят к нарушению их функции. Наиболее отчетливо это видно на примере клеточного деления, которое останавливается как при стабилизации микротрубочек, так и при их дестабилизации.

Моторные белки микротрубочек. Перемещения различных пузырьков и некоторых оргanelл вдоль микротрубочек осуществляются специальными белками - моторами (кинезины, цитоплазматический динеин), использующими энергию АТФ. Некоторые моторные белки могут находиться на поверхности самих микротрубочек, и тогда они переносят любые частицы, которые оказываются вблизи. Другие моторные белки (динеин) постоянно прикреплены к частицам, которые они должны переносить. В последнем случае транспорт является строго специфичным. Каждый тип мотора переносит свой груз вдоль микротрубочки только в одном направлении. Транспорт вдоль микротрубочек происходит на расстояния, сравнимые с диаметром клетки, со скоростью до нескольких микрон в секунду.

Промежуточные филаменты получили свое название из-за толщины (8-11 нм), которая ставит их между микротрубочками (22-24 нм) и микрофиламентами (5-7 нм). В отличие от микротрубочек и микрофиламентов, промежуточные филаменты в клетках разных типов состоят из разных белков и выполняют, по-видимому, различные функции. Наиболее распространены филаменты, состоящие из белка виментина. Они встречаются во всех эмбриональных клетках, во взрослом организме - в клетках соединительной ткани, крови, в небольшом количестве в эпителиальных и мышечных клетках. Несмотря на их повсеместное распространение, функции виментиновых филаментов не ясны, по крайней мере, эти структуры не являются жизненно необходимыми. Показано, что животные (мыши), у которых экспрессия виментина полностью подавлена, не только нормально живут, но и дают плодовитое потомство.

Из тканеспецифических промежуточных филаментов наиболее распространены кератиновые филаменты. Они встречаются во всех эпителиальных клетках. Кератиновые филаменты входят в состав десмосом - специальных структур, скрепляющих эпителиальные клетки между собой. В клетках ороговевающего эпителия из кератиновых филаментов образуется кератин. В коже многочисленные кератиновые филаменты выполняют механическую функцию, обеспечи-

вая прочную связь клеток в пласт. Выключение хотя бы одного гена из семейства кератинов приводит к тяжелым повреждениям кожи - расщеплению, образованию мозолей, отеков и т.п. В соединительнотканых клетках кератина нет.

Микрофиламенты состоят, в основном, из белка актина. В клетке они организованы в трехмерную сеть - актиновый гель - либо собраны в пучки. Кроме того, сплошная сеть актиновых филаментов подстилает плазмолемму. Кроме актина, в состав микрофиламентов входят и другие белки, похожие на мышечные (миозин), а также множество актинсвязывающих белков. Микрофиламенты выполняют две основные функции: актин в комплексе с миозином и некоторыми другими белками создает внутри цитоплазмы сократительную сеть, подобно тому, как это происходит в гладкой мышце; актин в комплексе с актинсвязывающими белками обеспечивает переход участков цитоплазмы из жидкого состояния (золь) в твердое (гель). Микрофиламенты через актинсвязывающие белки связываются с некоторыми интегральными белками плазмолеммы и контролируют их подвижность. Кроме того, актиновые филаменты обеспечивают перемещение внутриклеточных частиц, которые имеют на своей поверхности миозин. В отличие от микротрубочек, транспорт по актиновой системе происходит на сравнительно короткие расстояния (один - несколько микрон). В быстро движущихся клетках (нейтрофилы, тромбоциты, подвижные лимфоциты) актомиозиновый комплекс является основной системой, обеспечивающей перемещение клеток.

Вместе система микротрубочек и микрофиламентов образуют в цитоплазме единую транспортную систему. Активный транспорт различных белков и мембранных структур, который можно сравнить с непрерывным перемешиванием цитоплазмы, играет важную роль в интеграции клеточного метаболизма.

Митотический цикл

Представление о митотическом, или клеточном, цикле возникло в результате изучения выращиваемых в культуре клеток. Многие клетки в культуре делятся приблизительно через одинаковые промежутки времени (12-30 ч). Отрезок времени между концом одного митоза и концом следующего называется клеточным циклом. Весь цикл распадается, таким образом, на 2 части: процесс деления (митоз) и подготовку к нему (интерфаза). Удвоение ДНК происходит в интерфазе, причем начинается задолго до митоза и оканчивается также до его начала. Период синтеза ДНК был назван S-периодом; промежуток между окончанием митоза и началом S-периода получил название G₁-периода, проме-

жуток между окончанием S-периода и началом митоза получил название G₂-периода. В интерфазе происходит удвоение не только ДНК, но и всей массы клетки. Рост клетки идет в течение всех периодов интерфазы, но особенно быстро во второй ее половине - в S- и G₂-периодах. В это время очень интенсивно синтезируются РНК и белки. В начале деления синтетические процессы замирают и возобновляются в следующей интерфазе. Большинство специализированных клеток взрослого организма либо не делятся совсем, либо делятся чрезвычайно редко и не находятся, строго говоря, в митотическом цикле. Теоретически выход из митотического цикла возможен в любой период интерфазы (G₁, S и G₂), но практически абсолютное большинство клеток выходят из цикла сразу после деления. Выход из цикла может быть обратимым - под воздействием каких-то факторов клетка может приступить к синтезу ДНК иделиться (например, лимфоциты периферической крови входят в цикл и делятся под действием фитогемагглютинаина) или необратимым (гранулоциты крови, нервные клетки).

Клетки организма, которые находятся в митотическом цикле, могут проходить его с различной скоростью. Быстрее всего проходят клетки-предшественницы зрелых форм (у морфологически недифференцируемых клеток-предшественниц гемопоэза цикл составляет около 8 ч). Пролиферирующие клетки, выполняющие специализированные функции, делятся медленнее - их клеточный цикл может составлять до 6-10 суток. Удлинение цикла всегда связано с увеличением G₁-периода, а S- и G₂-периоды сравнительно постоянны.

Прохождение клетки по митотическому циклу многократно контролируется. Узловые моменты получили название контрольных точек (check-points). Важнейшими являются контрольные точки перед началом синтеза ДНК, после окончания его (чтобы синтез ДНК не повторился до деления), перед началом митоза (вход в митоз) и в середине митоза (выход из митоза).

Прохождение клеток по циклу строго регулируется согласованной работой большого числа белков. Часть этих белков является короткоживущими (циклины), и их синтез или распад позволяет клетке перейти в следующую стадию цикла.

Для быстрого расщепления циклинов и некоторых других белков в клетке имеется специальная система. Она состоит из низкомолекулярного белка убиквитина и белков, узнающих молекулы-"жертвы" и обеспечивающих их связывание с убиквитином. Специальные протеазы, постоянно находящиеся в цитоплазме, быстро рас-

щепляют белки в комплексе с убиквитином, высвобождая молекулы убиквитина.

Клеточное деление

Митоз в клетках млекопитающих затрагивает все без исключения органеллы, но наиболее заметные изменения происходят в ядре. Запуск митоза осуществляется каскадом реакций, в конце которого образуется активный комплекс циклина В и белка с массой 34 кД. Этот комплекс (протеинкиназа) фосфорилирует различные белки, что приводит к переходу клетки из интерфазного состояния в митотическое. В ядре еще сохраняются ядрышки, но постепенно становятся видны отдельные сравнительно толстые нити - хромосомы (их толщина около 0,6-1 мкм). В цитоплазме микротрубочки становятся гораздо более лабильными, и вместо интерфазной сети вокруг 2 пар центриолей образуются 2 динамичные системы радиально расходящихся микротрубочек - звезды. Следующая стадия - прометафаза - начинается с разрушения ядерной оболочки. Затем хромосомы начинают двигаться, исчезает ядрышко, часть его материала попадает на хромосомы и в дальнейшем переносится в дочерние ядра. В области центромеры на хромосомах образуется кинетохор - структура, связывающая хромосомы с микротрубочками веретена. Пары центриолей расходятся друг от друга, и отходящие от них микротрубочки устанавливают контакты с кинетохорами хромосом. Хромосомы после некоторого периода случайных перемещений по направлению то к одному полюсу, то к другому выстраиваются в пластинку в центральной части клетки, на равном удалении от полюсов. Со времени образования центральной пластинки - метафазы, хромосомы с двух сторон закреплены в веретене, причем местами прикрепления являются их кинетохоры. Ключевым моментом для метафазы является установление контактов противоположных кинетохоров с противоположными полюсами. Отсутствие таких контактов (свободные кинетохоры) является сигналом, задерживающим начало расхождения хромосом. В метафазе половинки хромосом (хроматиды) связаны по всей длине, но прочно скреплены только в районе первичной перетяжки (центромеры). При выделении хромосом из клеток связь между плечами легко разрушается, и хромосомы приобретают крестообразную форму.

В следующей фазе (анафаза) хромосомы расщепляются, начиная с области перетяжки, и расходятся к полюсам. Процесс расхождения хромосом складывается из двух - движения самих хромосом к полюсам (анафаза А) и расхождения полюсов друг от друга (анафаза Б). В редких случаях два движения происходят последо-

вательно (сначала А, потом Б), но обычно они перекрываются по времени. Оба этих процесса обеспечиваются микротрубочками веретена, хотя их механизмы значительно отличаются друг от друга. Анафаза А связана с работой кинетохоров хромосом, которые обеспечивают укорочение микротрубочек, прикрепленных к ним и подтягивание хромосом. Анафаза Б связана с удлинением микротрубочек, отходящих от противоположных полюсов и не связанных с хромосомами. В ней кинетохоры лишь удерживают хромосомы в прикрепленном состоянии. После расхождения хромосом начинается их деконденсация - они теряют кинетохоры, окружаются мембранными мешочками, из которых вновь образуется ядерная оболочка. Центросомы (полюса) перестают на время быть центрами организации микротрубочек, что приводит к быстрому распаду веретена. Скорость обновления микротрубочек вновь уменьшается. Последний этап митоза получил название телофазы.

Во время телофазы происходит событие, завершающее деление клетки - образование перетяжки и деление цитоплазмы (цитотомия). В основе цитотомии лежит образование во время деления сократительного кольца из актиновых микрофиламентов. После расхождения хромосом кольцо начинает сокращаться, перетягивая клетку пополам. Некоторое время после этого клетки остаются соединенными тонким мостиком с утолщением посередине - остаточным тельцем. В состав остаточного тельца входят микротрубочки веретена, сохраняющиеся в телофазе. В дальнейшем остаточное тельце отрывается от обеих дочерних клеток, которые получают полную самостоятельность.

С точки зрения регуляции, митоз можно разделить на две части - когда клетка запрограммирована на вход в митоз (профаза-метафаза) и когда она запрограммирована на выход из него (с конца метафазы или с начала анафазы). Переход от метафазы к анафазе контролируется работой большого числа систем и является событием необратимым. Фактически запуск анафазы является для клетки сигналом к выходу из митотического состояния и к переходу в интерфазу. Этот процесс начинается с разрушения активного комплекса митотической протеинкиназы и гидролиза циклина В. Любой сбой в процессе первой половины митоза приводит к остановке клетки на стадии метафазы. Сбой в анафазе приводит лишь к неправильному распределению хромосом между дочерними клетками. Клетки, у которых контроль за организацией митотического аппарата и точностью деления хромосом нарушен, являются для организма источником возникновения опухолей. Поэтому случайное появление в результате ошибок во время деления неправильных клеток запускает в них меха-

низм самоубийства (апоптоз), либо приводит к таким нарушениям, которые позволяют распознать эти клетки как чужеродные для данного организма.

В культуре ткани клетки в меньшей степени подвержены отбору, чем *in vivo* и можно всегда наблюдать довольно значительное число неправильных митозов (до нескольких процентов).

В интерфазе клетка может пребывать неопределенно продолжительное время, тогда как в митотическом состоянии - не более суток. Задержка нормальных клеток на стадии митоза (без расхождения хромосом) индуцирует их программируемую смерть.

Клеточные популяции и дифференцировка клеток в организме

Совокупность клеток, выполняющих одинаковые функции, составляет ткань. По соотношению делящихся и специализированных клеток все ткани организма можно разделить на 3 категории. К первой относятся ткани, клетки которых, достигнув высокоспециализированного состояния, полностью утрачивают способность размножаться; классическим примером такой популяции являются нейроны. Ко второй категории относятся клеточные популяции, где высокоспециализированные клетки имеют сравнительно небольшой срок жизни и постоянно должны замещаться новыми (например, в кишечнике, в крови). В тканях млекопитающих источником новых клеток являются специальные недифференцированные или малодифференцированные клетки, не утратившие способности к размножению. Как правило в популяциях этого типа присутствует ряд клеток, постепенно специализирующихся и одновременно утрачивающих способность к делению (по мере созревания такие клетки могут разделиться все меньшее число раз). Родоначальными клетками обновляющихся популяций служат так называемые стволовые клетки. Они способны делиться, но при этом из их потомков могут образоваться лишь определенные типы зрелых клеток.

Третий тип клеточных популяций образуют клетки, срок жизни которых в организме достаточно велик, но меньше продолжительности жизни всего организма. В результате эти клетки изредка делятся, но в основном выполняют свои специфические функции. Деление клеток можно стимулировать внешними воздействиями, но при этом обнаружить специальные стволовые клетки не удастся - делятся сами специализированные клетки. К популяциям третьего типа относятся клетки печени, надпочечников и, вероятно, фибробласты.

Механизмы клеточной гибели

В жизни клеточных популяций значительную роль играет программируемая гибель клеток (апоптоз) - своеобразный механизм клеточного самоубийства. Апоптоз ответствен за поддержание правильной численности клеток в быстро размножающихся тканях эмбриона (например, в головном мозге). Кроме того, он запускается практически всегда, когда происходят нарушения в прохождении клеточного цикла (задержка в митозе, неправильная репликация ДНК). Нарушение механизма программируемой клеточной гибели характерно для многих опухолевых клеток и, возможно, является одним из фундаментальных отличий их от нормальных.

Движение клеток

За исключением эпителиальных клеток, связанных в пласт, все остальные клетки организма способны перемещать себя целиком или свои отростки. Существует два основных способа перемещения клеток - с помощью ресничек или жгутиков (плавание сперматозоидов) или "амебное" движение по твердому субстрату. В основе движения по субстрату лежат адгезия и преобразования актомиозиновой системы клеток. Если клеточная мембрана не может прилипнуть к субстрату (слабая адгезия), то движения нет. Если адгезия слишком сильная, то клетка расплывается на таком субстрате и также не движется. Из-за слишком сильной адгезии не могут, например, двигаться фибробласты в толще соединительной ткани. Но эти же фибробласты отлично движутся по покровному стеклу. Движение большинства клеток можно описать как последовательность локомоторных циклов. Рассмотрим для примера локомоторный цикл нейтрофила. На первом этапе клетка выдвигает вперед тонкую ламеллу. Затем в нее перетекают основная часть цитоплазмы и ядро. Наконец, сильно вытянувшаяся задняя часть клетки («хвост») отрывается от субстрата и подтягивается. Заметим, что для перемещения по субстрату клетка должна быть поляризована, то есть иметь передний и задний конец. Эксперименты последних лет показали, что поляризация клетки может возникать в силу случайных событий, а наиболее существенным моментом является способность клетки сохранять возникшую асимметрию. Например, нейтрофилы и моноциты из периферической крови не способны сохранять свою поляризацию и в результате часто меняют направление движения. Однако после контакта с аттрактантом эти клетки приобретают постоянную полярность, которая сохраняется в них вне зависимости от внешних воздействий.

На переднем конце движущейся клетки постоянно выбрасываются отростки цитоплазмы -

филоподии и ламеллоподии. Когда новые отростки прикрепляются к поверхности, они не могут втянуться, и позади них в клетке возникает натяжение, а передний край клетки оказывается растянутым. Таким образом, возникает ламелла. Ламелла представляет собой уплощенный участок цитоплазмы, обедненный митохондриями и другими органеллами. На переднем краю ламеллы полимеризуется миозин, который увеличивает натяжение актинового цитоскелета. Если прикрепление слабое, то край клетки отрывается и ламелла втягивается. В этом случае перемещения клетки не происходит. Если прикрепление достаточно сильное, то постепенно возникает все более сильное натяжение в теле клетки, в результате чего задняя часть клетки подтягивается. Внешне подтягивание клетки проявляется в том, что в ламеллу перетекает эндоплазма со множеством гранул, а затем и ядро. После перемещения ядра, для завершения цикла клетке остается только оторвать от субстрата заднюю часть цитоплазмы ("хвост"). Сделать это удастся не всегда. В ряде случаев хвостовой участок клетки также сильно прикреплен к субстрату, как и передний конец. Тогда часть хвоста отрывается от основного тела клетки и остается на субстрате, а сама клетка перемещается вперед.

Внутриклеточная среда и клеточные органеллы

Содержимое клетки, включая ее мембраны, нельзя назвать ни жидким, ни твердым. Если пользоваться физическими терминами, то большая часть клеточного содержимого находится вблизи фазового перехода, а учитывая огромное разнообразие молекул и их низкую концентрацию, можно говорить о сосуществовании жидкой и твердой фаз. В первом приближении это состояние описывается мозаичной моделью, когда одни участки обладают большой вязкостью и являются "твердыми", а другие обладают меньшей вязкостью, и их можно считать "жидкими". Если говорить об экспериментальном определении свойств внутриклеточной среды, то чем крупнее молекула, тем меньше жидкости она найдет в клетке, и/или тем более вязкой окажется эта жидкость. Поэтому перемещение многих крупных молекул в цитоплазме происходит не пассивно, за счет Броуновского движения, а с затратой энергии.

Общепринятым является выделение в клетках животных и растений относительно самостоятельных структур - клеточных органелл. Данное разделение восходит к первооткрывателям - цитологам конца XIX столетия. Большинство органелл было описано на светооптическом уровне на окрашенных препаратах фиксирован-

ных тканей подобных тем, которые используются в настоящее время в патологоанатомической службе. С появлением электронной микроскопии и препаративной биохимии принцип разделения клеточного содержимого на дискретные части (органеллы) сохранился, и их список слегка пополнился (эндоплазматический ретикулум, лизосомы и др.). Однако вопрос о том, считать ли пероксисомы, микротельца, мультивезикулярные тельца и т.д. самостоятельными органеллами, четкого ответа не имеет. Исследования последних 15-20 лет показывают, что живая клетка может быть разбита на дискретные фрагменты не полностью.

По существу только клеточное ядро и митохондрии (а также хлоропласты у растений) постоянно обособлены от остальной цитоплазмы как пространственно, так и, в значительной степени, химически. Что же касается других органелл (эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, лизосомы и др.), то они существуют в непрерывном взаимодействии друг с другом. В результате во многих типах клеток один вид органелл бывает хорошо выражен, но при этом часто плохо выражены остальные. Такие различия используются, в частности, для морфологической диагностики. Так, плазмодиты имеют хорошо выраженный эндоплазматический ретикулум и в результате - базофильную цитоплазму.

Сегодня можно сказать, что в каждой клетке человека (за исключением эритроцитов, которые представляют собой вырожденные клетки, приспособленные только для транспорта кислорода и углекислого газа) существуют несколько постоянных компартментов, отделенных мембранами друг от друга. В этих отсеках (компартаментах) самостоятельно регулируется не только состав макромолекул, но также и внутренняя среда (рН, концентрация ионов кальция, и т.п.). Первый компартмент - цитозоль, второй - матрикс митохондрий, третий - внутренняя среда эндоплазматического ретикулума/аппарата Гольджи (диктиосом). Кроме того, во многих клетках от ретикулума и аппарата Гольджи обособляются и другие мембранные компартменты (лизосомы, мультивезикулярные тельца, пероксисомы). Время их полужизни невелико по сравнению со временем жизни целой клетки. Отдельным отсеком является клеточное ядро, но в его оболочке имеются поры, проницаемые для молекул массой до 30 кД. Поэтому химически состав ядра и цитозоля отличается только на уровне макромолекул.

Программы поведения клеток

Поскольку внутри клетки постоянно поддерживается равновесие, то переход от одного состояния к другому на химическом уровне может

происходить почти мгновенно. Поэтому относительно медленные события (движение по клеточному циклу, апоптоз, секреция в ответ на действие гормона) являются результатом последовательного запуска каскадов реакций. Быстрое достижение равновесия в большинстве реакций позволяет клеткам иметь множественные системы обратной связи, баланс которых выполняет роль химического "контролера" происходящих процессов. Важнейшим является контроль за передачей механического сигнала (например, натяжение мембраны или клеточного отростка) в химический (например, в фосфорилирование).

Исследование клеток в гематологии и патологической анатомии

Основным методом исследования клеток для клинических целей является световая микроскопия. Для исследования изготавливается несколько типов препаратов. В патологической анатомии стандартными препаратами являются срезы толщиной в несколько микрон, приготовленные с зафиксированной формалином и обезвоженной ткани. Эти срезы окрашивают гематоксилин-эозином или специальными красителями для проведения гистохимических или иммунохимических реакций и рассматривают под микроскопом. Анализ состоит в определении относительного расположения пластов клеток, формы и размеров отдельных клеток, а также (при подозрении на опухоль) в поиске характерных опухолевых клеток. В гематологии наиболее распространенным препаратом является мазок периферической крови. Кроме того, в ряде случаев изготавливаются отпечатки органов. При приготовлении мазка/отпечатка клетки на предметном стекле расплаываются, затем фиксируются метиловым спиртом и окрашиваются. Стандартная окраска мазка - азур-эозином по Романовскому-Гимза (двойное название отра-

жает двух авторов метода). В результате распластывания площадь клеток по сравнению со срезом ткани увеличивается в 4-6 раз, что делает их исследование под иммерсионным объективом микроскопа значительно более удобным. Поэтому в случаях, когда для диагностики необходимо исследование тонкого строения ядер клеток, применение мазков или отпечатков является необходимым этапом исследования.

В последние двадцать лет все большее распространение в гематологии и в целом в онкологии приобретают иммунофлуоресцентные методы исследования. Иммунофлуоресцентные методы обладают очень высокой чувствительностью и избирательностью. С их помощью можно определить наличие всего нескольких десятков или сотен молекул в клетке. Для иммунофлуоресцентных исследований используются либо срезы замороженной ткани, либо мазки, либо суспензии клеток (крови, костного мозга, лимфоидных органов). С помощью флуоресцирующих антител под люминесцентным микроскопом или на проточном флуориметре в клетках выявляют определенные белки, которые позволяют охарактеризовать тип клеток, уровень их дифференцировки, а в ряде случаев непосредственно установить опухолевую природу клеток.

Еще один специализированный метод исследования - кариология и анализ последовательностей ДНК (FISH - от английского fluorescent hybridization in situ - флуоресцентная гибридизация на месте). Первый метод состоит в приготовлении хромосомных препаратов и их детальном микроскопическом анализе. Вторым методом базируется на флуоресцентной микроскопии, но вместо антител там используются специальные пробы - флуоресцентные зонды, позволяющие определить специфические (как нормальные, так и патологические) последовательности ДНК и подсчитать их количество в клетке.

КРОВЕТВОРЕНИЕ

Кроветворение (гематопоз) представляет собой тонко регулируемый процесс последовательных дифференцировок родоначальных клеток, приводящий к образованию зрелых клеток крови всех 8 линий (миелоидные: эритроциты, базофильные, нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты, мегакариоциты, моноциты - макрофаги и лимфоидные: Т- и В-лимфоциты).

Образование клеток крови в костном мозге впервые было независимо показано Нейманном [Newmann E.] и Биццоццо [Bizzozzo G.] в

1868 г. Разработанные Эрлихом [Erich P.] методы дифференциальной окраски клеток послужили быстрому накоплению знаний о морфологии клеток крови. В 1898 г. Паппенгейм [Pappenheim A.] использовал улучшенные Романовским Д.Л. методы окраски, что позволило ему описать переходные формы клеток костного мозга. Эти морфологические описания остаются классическими и поныне. Изучение окрашенных клеток не давало возможности установить их происхождение, так как наиболее молодые клетки каждой линии были весьма похожи. На основе клиниче-

ских различий между лимфоидными и миелоидными лейкозами Негели [Naegeli O.] заключил, что существуют две независимые родоначальные кроветворные клетки. Изучая гистогенез эмбриональной кроветворной ткани, Максимов А.А. еще в 1910 г. отстаивал идею монофилитического происхождения клеток крови из единого родоначального предшественника. Только развитие современных методов исследования (радиационная гематология, цитогенетика, молекулярная биология, культура тканей) позволило прямым образом доказать правоту А.А. Максимова. В этом отношении решающую роль сыграли исследования Лоренца [Lorenz E.], Форда [Ford C.], Тилла и МакКаллока [Till J.E., McCulloch E.A.], Меткалфа [Metcalf D.], Мул-лигана [Mulligan R.], Лемишки [Lemischka I.], Минца [Mintz B.] и многих других. В результате удалось четко охарактеризовать последовательность дифференцировок в кроветворной системе, начиная с единой полипотентной стволовой кроветворной клетки. Схема кроветворения представлена на рис. 12 (см. вклейку).

Кроветворные органы

Кроветворные клетки у млекопитающих образуются и распределяются в определенных так называемых органах кроветворения. Они разделяются на эмбриональные органы кроветворения (желточный мешок, эмбриональная печень, селезенка и костный мозг) и взрослые - костный мозг, селезенка, тимус, лимфатические узлы и Пейеровы бляшки.

На примере нормальной мыши можно проследить за «перемещением» популяций кроветворных клеток в различных органах (табл. 1). Особенности развития разных видов животных отразились и на функциональных свойствах ряда кроветворных органов. В частности у мыши,

селезенка - орган активного кроветворения, тогда как у человека в селезенке происходят только лимфопоз, депонирование и разрушение клеток крови. Правда, при напряженном кроветворении, например, на фоне хронических кровопотерь, селезенка иногда становится органом кроветворения, в ней появляются эритрокарициты, мегакариоциты, миелоидные клетки.

Эволюция животных сопровождалась изменениями топографии кроветворения, образованием кроветворных органов, усложнением их структуры и дифференциальных функций. Для млекопитающих характерно четкое разделение миелоидного (костный мозг) и лимфоидного (тимус, селезенка, лимфатические узлы) кроветворения. Основным кроветворным органом становится костный мозг.

Кроветворение в костном мозге. Кроветворение у высших позвоночных и человека происходит в полости всех трубчатых и плоских костей в пространстве между синусами, в так называемом кроветворном микроокружении. В состав микроокружения или стромы кроветворных органов входят клеточные и неклеточные элементы [Фриденштейн А.Я.]. К клеткам микроокружения относятся эндотелиальные клетки, адвентициальные клетки, ретикулярные клетки (фибробласты костного мозга), макрофаги, жировые клетки, остеокласты, остеобласты, остециты и другие. Внеклеточный матрикс представлен набором нерастворимых белков (глюкозаминогликаны, протеоглики, фибронектин, ламинин, гликопротеины и др.), коллагеновыми, эластиновыми волокнами, в сети которых располагаются тяжи кроветворных клеток и основное вещество кости. В морфологической организации костного мозга важную роль играет сосудистая система. Артериальное кровоснабжение

Таблица 1

Распределение кроветворных клеток в эмбриональной и взрослой жизни мыши

	Возраст, дни	Эритропоз	Гранулопоз	Лимфопоз	Мегакариоцитопоз						
Зародыш	0-7	0	0	0	0						
	7-8	Желточный мешок	0	0	0						
	8-13	Желточный мешок	Печень	0	Печень						
		Область аорты и мезонефроса									
		Печень									
	13-15	Печень	Печень	Тимус	Печень						
		Селезенка				Селезенка	Селезенка				
	15-20	Печень	Печень	Тимус	Печень						
		Селезенка				Селезенка	Лимфоузлы	Селезенка			
		Костный мозг							Костный мозг	Костный мозг	
Костный мозг		Тимус									Костный мозг
Селезенка											
Взрослое животное			Лимфоузлы								
			Пейеровы бляшки								
			Аппендикс								
			Костный мозг								

костного мозга осуществляется из двух источников, главный из которых - питающие артерии. Они проникают в кость через питательный канал и делятся на восходящие и нисходящие медуллярные артерии, из которых выходят радиальные артерии. Кортикальные капилляры через эндост выходят в костный мозг, образуя разветвленную систему костномозговых синусов. Костномозговые синусы впадают в больший по калибру центральный синус, из которого кровь попадает в выносящие вены. Так как у млекопитающих гемопоэз происходит во внесосудистом пространстве между синусами, то костномозговые клетки для миграции в кровь должны пройти через стенку синуса, состоящего из сплошного слоя эндотелиальных клеток.

Способность кроветворных клеток узнавать клетки стромы костного мозга и распределяться в нем (хомминг) обусловлена молекулами клеточной адгезии, интегринами и непосредственными межклеточными контактами. Специализированные молекулы на поверхности кроветворных клеток определяют их специфический хомминг. Это свойство кроветворных клеток отчетливо проявляется при внутривенной трансплантации костного мозга: 85% введенных клеток попадает в костный мозг, который составляет всего 6% от массы тела, оставшиеся 15 % распределяются между печенью, легкими, селезенкой и другими органами.

Родоначальные стволовые кроветворные клетки локализуются в костном мозге. Предшественники Т- и В- лимфоцитов также образуются в костном мозге, однако, их окончательная дифференцировка происходит в тимусе (Т-клетки), в селезенке, лимфатических узлах и Пейеровых бляшках (В-клетки).

В онтогенезе происходит постепенное замещение красного костного мозга жировой тканью. Обычно интенсивность кроветворения обратно пропорциональна количеству жировых клеток. Однако жировой костный мозг превращается в кроветворный в условиях сильного гемопоэтического стресса, например, при анемии. Жировые клетки костного мозга не являются жировым депо организма, так как при голодании содержание жира в них не снижается, они несут какие-то связанные с кроветворением функции и являются его необходимым элементом.

Кроветворение и селезенка. Морфологически селезенка состоит из двух отделов: белой и красной пульпы. Красная пульпа представлена сетью синусоидов, заселенных макрофагами и эритроцитами. Основная функция красной пульпы состоит в депонировании и разрушении эритроцитов. Большинство макрофагов красной пульпы фагоцитируют разрушающиеся эритроциты и пигменты железа из деградированного гемоглобина. Белую пульпу

образуют артерии вместе с окружающими их периартериальными лимфоидными футлярами, заселенными главным образом Т-лимфоцитами. Кластеры В-лимфоцитов в первичных фолликулах занимают более удаленную от артерий позицию. После антигенной стимуляции первичные фолликулы, содержащие дендритные клетки, развиваются во вторичные, с герминативными или зародышевыми центрами. В них быстро развиваются В-лимфоциты и плазматические клетки. Из маргинальных зон клетки выходят в афферентные селезеночные артерии.

Тимус и кроветворение. Центральный и высоко специализированный орган лимфопоэза состоит из двух долей, разделенных соединительнотканной трабекулой. Каждая доля состоит из покрытого капсулой коркового вещества, заселенного менее зрелыми тимоцитами, и мозгового - репопулированного более зрелыми тимоцитами. Предшественники Т-клеток попадают в корковое вещество тимуса из костного мозга. Для тимоцитов коркового вещества характерна высокая скорость пролиферации, однако большая часть из них гибнет, а часть популяции приобретает специфические маркеры Т-хелперов и Т-супрессоров и мигрирует через мозговое вещество во вторичные лимфоидные органы (селезенка, лимфатические узлы); небольшая популяция Т-лимфоцитов попадает в кровоток, минуя мозговое вещество. И корковое, и мозговое вещество тесно взаимосвязаны стромальными клетками, представленными эпителиальными, интердигитирующими дендритными клетками и макрофагами. Комплексное взаимодействие стромальных клеток, особенно эпителиальных, с тимоцитами способствует созреванию последних под действием специализированных ростовых факторов тимуса. В корковом веществе располагаются так называемые клетки "кормушки", окруженные тимоцитами (до 50 на одну клетку "кормушку"), которые образуют большие мультиклеточные комплексы. В тимусе происходят созревание и клоная селекция Т-лимфоцитов, а также удаление аутореактивных клонов.

По мере старения организма происходит инволюция тимуса. Максимального объема и активности тимус достигает в период раннего полового созревания, затем паренхиматозная часть тимуса постепенно заменяется жировой тканью. Однако тимус никогда полностью не замещается жировой тканью, стромальные клетки продолжают вырабатывать гуморальные факторы, а его лимфопоэтическую функцию принимают на себя клетки Лангерганса в коже и брыжечные лимфоидные клеточные скопления.

Лимфатические узлы. Эти «органы» состоят из сети ретикулярных клеток, между которыми располагаются лимфоциты, макрофаги и денд-

ритные клетки. Морфологически лимфатические узлы делятся на 3 района: кору, субкапсулярную зону и мозговой слой. В коре располагаются в основном В-лимфоциты и макрофаги, организованные в первичные фолликулы. После антигенной стимуляции образуются вторичные фолликулы с герминативным центром, в которых развиваются лимфобласты, плазматические клетки и макрофаги, взаимодействующие с дендритными клетками. Субкапсулярная зона преимущественно заполнена Т-лимфоцитами. Она также содержит дендритные клетки, несущие большое количество молекул гистосовместимости II класса, необходимых для активации Т-клеток. Медуллярная зона заполнена более зрелыми клетками, большинство из которых секретируют антитела. Аfferентные лимфатические сосуды впадают в субкапсулярный синус. Лимфа из тканей поступает сначала в корковое, а затем в мозговое вещество.

Пейеровы бляшки. По ходу тонкого кишечника располагаются лимфоидные скопления, находящиеся в непосредственной связи с эпителием, называемые Пейеровыми бляшками. Их строение аналогично лимфоидным фолликулам селезенки и лимфатических узлов. Главным компонентом являются большие герминативные центры, окруженные лимфоцитами.

Все кроветворные органы объединены в общую кроветворную систему периферическим кровотоком [Максимов А.А., 1925; Заварзин А.А., 1947; Хэм А., Кормак Д., 1983].

Клеточные основы кроветворения

Кроветворение представляет собой процесс образования лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. В крови взрослого человека в каждый момент времени циркулирует приблизительно 25×10^{12} эритроцитов, около 30×10^9 лейкоцитов, около 15×10^{11} тромбоцитов. Клеточные элементы составляют около 40% объема крови, 60% приходится на ее жидкую часть - плазму. В нормальных условиях эритроцит живет в кровяном русле около 100-120 дней. Продолжительность циркуляции нейтрофила, выражаемая временем полувыведения радиоактивной метки ($T_{1/2}$), - около 4-10 ч (6,3-7,6; 1,2 - 5,7 ч в среднем, по данным Cronkite, 1965; Dancey et al., 1976, соответственно), затем нейтрофил мигрирует в ткани, где его жизнь также исчисляется часами. $T_{1/2}$ моноцита около 72 ч [Stryckmans et al., 1966], затем он переходит в ткани, где может превратиться в блуждающий или фиксированный макрофаг, сохраняющий способность к делению (в отличие от зрелых гранулоцитов, не способных к делению); срок его жизни в тканях не совсем ясен. Эозинофилы находятся в крови около 5 ч; они также мигрируют в ткани. Срок пребывания в крови базофилов не установлен

[Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., 1979]. Тромбоциты находятся в кровяном русле около 8-9 дней. Лимфоциты представляют собой весьма неоднородную группу клеток: среди Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов одни клетки живут часы, другие - годы.

Зрелость клеточных элементов, циркулирующих в крови, может быть различной, так как в зависимости от потребности из кроветворных органов могут выходить и вполне зрелые, и только еще созревающие клетки, но уже выполняющие свою основную задачу: фагоцитирующие инородные частицы, транспортирующие кислород, образующие первичный тромб. Более того, в крови могут находиться и совсем незрелые клеточные элементы, даже стволовые кроветворные клетки и их ранние потомки, способные самостоятельно поддерживать кроветворение после трансплантации реципиенту с уничтоженной кроветворной системой [Micklem et al., 1975; Eaves, 1993; Drize et al., 1997]. В какой-то мере созревание в каждом ростке кроветворения повторяет филогенез кроветворения: если безъядерные эритроциты появились лишь у млекопитающих, а у птиц, рыб они еще содержат ядра, то созревание клеток красного ряда у человека проходит через стадии ядродержащих эритрокариоцитов в костном мозге, а в кровь поступают безъядерные зрелые эритроциты. Первичные фагоцитирующие элементы не имели дифференцированных ядер и специфической зернистости; гранулоциты в своей дифференцировке проходят эту стадию в костном мозге.

Таким образом, своеобразный эмбриогенез крови совершается непрерывно на протяжении всей жизни человека. Несмотря на это, подавляющее большинство клеток крови являются зрелыми и не способными к дальнейшей пролиферации с коротким жизненным циклом. Поэтому в течение всей жизни происходит новообразование клеток крови. Процесс кроветворения исключительно интенсивен и в ходе его производится поистине астрономическое число клеток - более 300 млн. в минуту. В течение жизни человека годовая продукция кроветворной системы составляет такое число клеток, что суммарный их вес, примерно, равен весу человека, а за всю жизнь образуется около 5 тонн клеток крови. Уже сама по себе такая производительность составляет огромную проблему для понимания механизмов поддержания кроветворения. Но этим дело не ограничивается. В организме продуцируются клетки крови по меньшей мере восемью направлениями дифференцировки. При стабильном кроветворении соотношение между ними, пропорция клеток каждой линии, поддерживается более или менее на одном и том же уровне. Однако при возмущающих воздействиях

продукция тех или иных клеток резко меняется - после кровопотери увеличивается выработка эритроцитов, при воспалении - гранулоцитов и т. д. Кроветворная система, прежде всего костный мозг, обеспечивает образование огромного количества клеток нужного вида, в нужное время и в нужном месте. Перед тем как описывать стадии развития кроветворных клеток, в упорядоченном виде представленные на схеме (см. рис. 12), мы рассмотрим основные принципы, лежащие в основе построения клеточных основ кроветворения.

Стволовые кроветворные клетки. Огромная клеточная продукция в кроветворной системе привела к представлению о существовании в ней специальных предшественников, способных созревать до стадии зрелых неделящихся клеток, но, в отличие от всех других соматических (т.е. не половых) клеток, являющихся бессмертными, способными в результате деления образовывать дочерние клетки, полностью идентичные родительской (включая не сниженный в результате деления пролиферативный потенциал) и способными к неограниченному размножению. С другой стороны, родоначальная клетка должна быть полипотентной, т.е. обладать способностью к разнообразным кроветворным дифференцировкам. Эта клетка была названа стволовой кроветворной клеткой (СКК), по аналогии со стволом дерева, из которого развиваются ветви [Till, McCulloch, 1961; Metcalf, Moore, 1971].

Из двух основных свойств СКК - способности к самоподдержанию и к разнообразным дифференцировкам - удалось подтвердить только второе - полипотентность СКК. Систематические исследования последних десятилетий позволили бесспорно доказать различными независимыми методами, что все клетки крови 8 разных линий дифференцировки имеют общего предшественника.

Разработанные методы клонирования кроветворных клеток в организме (метод селезеночных колоний, Till, McCulloch, 1961) или в полужидких культурах (метод бластных колоний, метод смешанных колоний) [Metcalf, Moore, 1971] позволили прийти к тому же выводу - в кроветворной системе действительно существуют полипотентные клетки, способные дифференцироваться по всем линиям кроветворных дифференцировок.

Гораздо сложнее оказался вопрос о пролиферативном потенциале СКК, об их способности к самоподдержанию, хотя интенсивное изучение проблемы современными методами ведется уже четыре десятилетия. Наиболее убедительные данные могли бы быть получены при наблюдении судьбы в организме индивидуальных СКК, для чего необходимо уметь отличать одну СКК (и ее потомство, клеточный клон) от другой. Ус-

пехи молекулярной биологии привели к развитию метода маркирования индивидуальных СКК путем переноса в них чужеродного гена [Capel et al., 1989; Dick et al., 1985; Keller, Snodgrass, 1990; Lemischka et al., 1986]. Осуществляется такой перенос с помощью специально сконструированного ретровируса, не способного к размножению (репликационно дефектного), но могущего встраиваться в ДНК клетки. Так как в геноме содержится несколько тысяч участков, в которые может встроиться ретровирус (сайты интеграции) [Shih et al., 1988], а интеграция является событием случайным, с равновероятным включением по любому сайту, место включения позволяет персонализировать, подобно отпечаткам пальцев, каждую включившую вирус клетку и ее потомков. Этот метод широко используется для изучения судьбы индивидуальных кроветворных клеток.

После введения облученной мыши генетически маркированного костного мозга и "восстановления" ее донорскими СКК, в кроветворной системе часто обнаруживаются только 1-2 клеточных клон, которые легко выявляются как в крови, так и во всех кроветворных территориях - в костном мозге, селезенке, тимусе [Lemishka et al., 1986; Van Zant et al., 1991]. Эти данные доказали полипотентность СКК, ее способность производить клетки всех линий кроветворной дифференцировки. Второй важный результат этих исследований - демонстрация того, что клетки интенсивно мигрируют в различные участки кроветворной системы, в результате чего потомство одной-двух СКК расселяется по всей системе и поддерживает в ней продукцию кроветворных клеток.

В ряде экспериментов через несколько месяцев после восстановления костный мозг переносили к следующему, вторичному облученному реципиенту. У последнего через длительные сроки можно было обнаружить тот же маркерный клон, который обеспечивал кроветворение у первичного реципиента [Capel et al., 1990]. Следовательно, даже одна СКК может обеспечить длительное, в течение всей жизни мыши, поддержание продукции кроветворных клеток. С практической точки зрения можно считать, что речь идет действительно о клетке, обладающей бесконечным пролиферативным потенциалом, способностью к неограниченному по времени размножению и продукции сколь угодно большого числа клеток крови. Это очень редкая категория клеток, которая встречается в костном мозге в концентрации около 1 на 100 000 клеток [Li, Johnson, 1992; Sutherland et al., 1990]. В целом результаты поддерживают идею о том, что в организме существуют бессмертные соматические стволовые клетки, способные к самоподдержанию которых и обеспечивает целост-

ность организма путем продукции зрелых клеток, заменяющих погибшие в результате старения. Тем не менее, эти результаты далеко не бесспорны. В частности кроветворение обычно было олиго-моноклональным, тогда как нормальный гематопозз всегда поликлонален [Abkowitz et al., 1990; Aggarwal, Vilcek 1992; Gale et al., 1998].

Работы с маркированными стволовыми клетками имеют ряд серьезных методических ограничений. Во-первых, для изучения кроветворных тканей мышь приходится забивать и подлинной динамики индивидуального клона СКК установить не удается, всегда речь идет о "моментальной фотографии", о состоянии кроветворной системы в момент забоя животного. Во-вторых, чувствительность метода относительно невелика, маркерный клон можно обнаружить лишь если его размер составляет 5-10% от взятых в анализ клеток, откуда следует, что все относительно меньшие клоны просто ускользают от определения. И, наконец, процесс переноса маркерного гена требует, чтобы СКК в момент переноса находились на стадии синтеза ДНК (иначе вирус не встраивается в геном) [Weiss et al., 1982], т.е. размножались (пролиферировали). Между тем, при нормальном кроветворении подавляющее большинство СКК не пролиферирует, и для эффективного вирусного переноса гена приходится насильственно вызывать вступление клеток в период синтеза ДНК. Для стимуляции пролиферации СКК их культивируют с огромными не физиологическими концентрациями ростовых факторов (обычно используют комбинацию фактора стволовых клеток и ФЛТ-3-лиганда с интерлейкинами-3, 6 и др.). Не очень ясно, как такие воздействия меняют свойства СКК и их поведение после трансплантации.

Недавно была создана методология, которая впервые дала возможность прямого изучения динамики клонов в процессе кроветворения [Чертков И., Дризе Н., 1996; Drize et al., 1996]. Исследования проводятся в течение всей жизни одного животного на новом микроуровне, когда возможно определение не миллионов клеток, а только одной (точнее ее потомков - одного клона). Используемая техника позволила устранить или значительно смягчить дефекты ранее применявшихся методов. Во-первых, для избежания возможных артефактов, связанных с воздействием больших концентраций ростовых факторов, была использована более физиологическая стимуляция СКК, а именно, перед переносом гена кроветворные клетки помещали на облученный подслон стромальных клеток (строющих и составляющих микроокружение) длительной культуры костного мозга. Такая система моделирует кроветворное микроокружение облученного реципиента, и стимуляция СКК дос-

тигается физиологическими концентрациями ростовых факторов, продуцируемых стромальными клетками.

Во-вторых, был разработан метод получения костного мозга из бедра живой наркотизированной мыши. Так как после такого воздействия костный мозг бедра регенерирует за 1-2 месяца, оказалось возможным проследить динамику индивидуальных клонов на протяжении всей жизни восстановленной мыши, повторно аспирируя у нее костный мозг каждые 1-3 месяца.

В-третьих, была увеличена в 100 тыс. - 1 млн. раз чувствительность метода, за счет изучения не только суммарной ДНК, выделенной из костного мозга бедра, как это делалось прежде, но и ДНК селезеночных колоний, образованных индивидуальными стволовыми клетками из изучаемого костного мозга у вторичных облученных реципиентов. Каждая селезеночная колония представляет собой клеточный клон, развившийся из одного предшественника (раннего потомка СКК), колониеобразующей клетки селезеночной, КОЕ-с. Таким образом, чувствительность использованного метода позволяет определить одну клетку, одну КОЕ-с, а не несколько сотен тысяч клеток, как при обычном методе изучения суммарной ДНК из кроветворного органа.

Полученные результаты неожиданно выявили совершенно иную картину кроветворения. Прежде всего, оказалось, что на протяжении всей жизни "восстановленной" мыши кроветворение поддерживалось многими одновременно функционирующими клонами, число которых составляло несколько десятков. Продолжительность жизни индивидуального клона в основной массе невелика и обычно не превышала 1 месяца. Как правило клональный состав кроветворной ткани полностью менялся в течение 1-4 месяцев, и только очень редкие клоны, их примерно 10%, существовали более 3 месяцев, т.е. выявлялись в двух анализах, проведенных с интервалом в 3 месяца. Из 362 изученных клонов только 2 наблюдались более 6 месяцев. Исчезнувшие клоны никогда не появлялись вновь, что говорит об истощении в процессе кроветворения исходной для данного клона стволовой клетки. Как правило, размер клона был невелик, и обнаруженные при анализе индивидуальных клеток (КОЕ-с) клоны очень редко выявлялись при тотальном анализе того же образца костного мозга. Отсюда следует, что размер индивидуального клона обычно меньше 0,5-1 млн. зрелых клеток (это предел чувствительности ранее использованного метода анализа), что и объясняет, почему такая множественность кроветворных клонов не была обнаружена ранее.

В этих исследованиях никогда кроветворение не было представлено только 1-2 клонами, окку-

пирующими все кроветворные территории. Более того, выяснилось, что различные гемопоэтические органы обычно заселены разными клонами. Например, набор клонов оказывался различным в бедре, голени, селезенке и тимусе. Только некоторые клоны достигали существенной величины и могли быть выявлены более чем в одном кроветворном органе, например в тимусе и в бедре, в селезенке и бедре, но никогда не удалось наблюдать клеточный клон, представленный во всех изученных кроветворных тканях [Drize et al., 1996].

Таким образом, хотя, безусловно, могут существовать гигантские клоны, заселяющие всю кроветворную систему, как это было неоднократно показано [Capei et al., 1990; Dick et al., 1985], подавляющее большинство клонов являются небольшими, локально расположенными, занимающими малую часть кроветворной территории. Отсюда следует, что интенсивность обмена кроветворными клетками между различными участками кроветворной системы существенно меньше, чем это думали раньше: кроветворные клетки не находятся в состоянии "постоянной трансплантации", а функционируют локально и выходят в кровь главным образом в виде зрелых клеток. Видимо, даже кратковременное отделение СКК от ее регулирующей сети, кроветворного микроокружения оказывает повреждающее влияние, которое проявляется, например, в том, что выходящие в кровь СКК имеют сниженный репопуляционный потенциал, сниженную способность восстанавливать кроветворную систему, что было показано при сравнении циркулирующих в крови СКК с их костномозговыми аналогами [Micklem et al., 1975; Chertkov et al., 1982].

Другой важный результат этих исследований заключается в изменении наших представлений о числе кроветворных клеток, способных к длительному функционированию в организме облученного животного. В анализируемых исследованиях прямым образом наблюдались несколько десятков кроветворных клонов (50-200), являющихся потомками тех маркированных СКК, которые существовали в момент восстановления облученной мыши. При этом изучали кроветворные клоны только в двух бедрах мыши, в которых содержится около 10% всех клеток кроветворной системы. Изучение ограничивалось периодом 14 месяцев, что составляет половину продолжительности жизни мыши.

Следовательно в вводимой дозе костного мозга содержалось не менее 1-2 тыс. полипотентных СКК, способных к длительному поддержанию кроветворения. Так как вводилось не более 5% всех кроветворных клеток, общее содержание СКК у мыши составляет 20-40 тыс. и их концентрация в костном мозге (где содер-

жится около 200 млн. клеток) составляет 1:5000-10 000, т.е. в 10-20 раз выше той, которая предполагалась ранее.

Однако главный результат этих исследований - установление факта отсутствия у стволовых клеток способности к самоподдержанию. Несмотря на то, что они имеют высокий пролиферативный потенциал, достаточный для функционирования только немногих из них даже на протяжении всей жизни животного, этот потенциал не бесконечен и, как правило, каждая СКК продуцирует клон, истощающийся всего в течение 1 месяца. Эти данные настолько принципиальны, что требуют обязательного подтверждения другим независимым методом.

Как указывалось выше, техника переноса гена имеет два существеннейших недостатка. Во-первых, для включения гена СКК должна находиться в стадии активного клеточного цикла, в периоде синтеза ДНК. Между тем, в норме СКК находятся в состоянии глубокого покоя, в периоде G_0 -клеточного цикла [Gothot et al., 1997; Ladd et al., 1997; Randall, Weissman, 1997; Traycoff et al., 1998]. Для выведения их из этого состояния приходится использовать специальную стимуляцию и неизвестно, насколько необратим этот переход в состояние пролиферации. Видимо, СКК никогда не может вернуться в глубокую стадию G_0 после вхождения в клеточный цикл, что и является причиной снижения у таких клеток пролиферативного потенциала. Необходимо отметить, что около 30% СКК делятся очень медленно [Bradford et al., 1997].

Во-вторых, метод введения гена требует извлечения кроветворных клеток из организма, превращения их в одноклеточную взвесь, культивирования в стимулирующих пролиферацию условиях и трансплантации в облученный организм, где они должны репопулировать опустошенную кроветворную систему, во много раз увеличиться в числе, удовлетворить огромный и нефизиологический запрос на восстановление кроветворения. И эти воздействия, прежде всего разобщение СКК с кроветворным микроокружением, могут необратимо изменить их важнейшие характеристики, в частности, снизить пролиферативный потенциал. Для преодоления этой неопределенности в результатах был использован другой метод персонализации индивидуальных СКК - метод радиационных маркеров. Как известно, радиация вызывает поломки хромосом, иногда приводящие к перестройке кариотипа за счет транслокаций, делеций и др. Клетка с таким кариотипом остается жизнеспособной, если в составе перестроенных хромосом сохраняется весь необходимый для функционирования СКК генетический материал. В силу случайного характера реаранжировки генома радиационные маркеры индивидуальны и позволяют различать

маркированные СКК (и их потомки). Радиоактивным воздействием изменяется структура хромосом любых клеток вне зависимости от их состояния в цикле, в том числе и клеток, находящихся в глубоком G_0 . Следовательно, в этих условиях создается возможность изучения покоящихся СКК - основного источника кроветворения. К тому же, метод не требует извлечения кроветворных клеток и их последующего культивирования и трансплантации.

Таким образом, были устранены два основных недостатка метода, связанного с переносом чужеродного гена в СКК. В то же время высочайшая чувствительность метода, на уровне одной клетки, была сохранена за счет использования того же подхода - изучения индивидуальных предшественников, КОЕ-с, во вторичных селезеночных колониях вместо суммарного кариотипирования тотального костного мозга.

Принципиально результаты полностью подтвердили наблюдения, проведенные на СКК с введенным чужеродным геном, - кроветворение и в этих условиях поддерживалось за счет множества небольших клонов, сменяющих друг друга в течение многих месяцев. Пожалуй, основное отличие заключалось в выявлении долгоживущих (в этих опытах - до 16 месяцев) и необязательно крупных кроветворных клонов, хотя большая часть таких долгоживущих клонов имели значительный размер и зачастую в костном мозге все обнаруженные КОЕ-с (до 20) принадлежали к одному клону, сохранявшемуся более года. Из 162 изученных клонов 17 были долгоживущими, т.е. примерно 10% клонов функционируют практически в течение всей жизни мыши.

С другой стороны, развитие в течение последних лет техники разделения кроветворных клеток в сортерах на основании экспрессии поверхностных антигенных маркеров позволило охарактеризовать пролиферативное состояние СКК, их позицию в клеточном цикле. Было показано [Randall, Weissman, 1997], что основная масса СКК находится в состоянии G_0 -клеточного цикла. При выходе из состояния покоя клетка необратимо вступает на путь дифференцировки, постепенно снижая как пролиферативный потенциал, так и ограничивая набор возможных дифференцировок. В большинстве случаев этот процесс непрерывен, однако некоторые из СКК возвращаются в состояние покоя после проделывания 1-3 делений. Такие вернувшиеся в резервный пул СКК не равноценны исходным, не пролиферировавшим СКК, их состояние покоя менее глубоко и при наличии запроса они способны ответить на него гораздо быстрее, приобретая маркеры определенных линий дифферен-

цировки в культуре за 1-2 дня, тогда как исходные СКК требуют для этого 10-14 дней [Gothot et al., 1997].

Следовательно, СКК, т.е. клетки, способные существовать на протяжении всей жизни, могут быть разделены на 2 подраздела:

а) СКК, не пролиферировавшие в постнатальной жизни и способные продуцировать большие клоны, субклоны которых могут быть выявлены на протяжении всей жизни и

б) клетки, вернувшиеся в состояние менее глубокого G_0 -периода после кратковременной пролиферации; такие клетки могут начать клонообразование в самое разное время после повторного вхождения в стадию покоя, даже равное всей жизни особи, однако они продуцируют только небольшие клоны, не возвращаются в состояние покоя, и произведенные ими клоны живут только короткое время. Границы между этими категориями размыты, т.е. некоторые короткоживущие предшественники имеют достаточно высокий пролиферативный потенциал, обеспечивающий более длительное их функционирование. Такое устройство отдела стволовых клеток имеет очевидный биологический смысл. Длительное поддержание кроветворения обеспечивается СКК, находящимися в глубоком резерве, тогда как необходимость срочного ответа на запрос удовлетворяется за счет СКК, уже прошедших основную дистанцию на пути от G_0 к G_1 и находящихся в состоянии быстро мобилизуемого резерва. В случае повышенного запроса на кроветворение можно гораздо быстрее удовлетворить его за счет созревания многих предсуществующих предшественников, обладающих чувствительностью к запросу, чем начинать ответ с самого начала, с немногих СКК, которым нужно длительное время (не менее 3-4 недель) для созревания до стадии КОЕ-с.

В целом можно считать установленным, что СКК обладают высоким, но не безграничным пролиферативным потенциалом; они не бессмертны, т.е. не могут "самоподдерживаться". СКК закладываются только в эмбриогенезе и расходуются последовательно, образуя короткоживущие, локально расположенные, сменяющие друг друга клеточные клоны, аналогично тому, как это происходит в яичнике. Это теоретически очень важный вывод. Действительно, трудно представить себе, что какие-либо соматические клетки имеют неограниченный пролиферативный потенциал, ведь бессмертие клетки сильно повышает вероятность ее малигнизации - достаточно лишь одной поломки механизма, регулирующего клеточное размножение, чтобы СКК превратилась в лейкозную клетку. Ограниченный пролиферативный потенциал СКК объясняет, почему они не превращаются в злокаче-

ственные с частотой, в сотни тысяч раз большей реально наблюдаемой.

Специально нужно подчеркнуть, что некоторые кроветворные клоны могут достигать огромной величины и существовать длительное время. Когда такой клон обнаруживается у человека (при изучении инактивации материнских и отцовских X-хромосом у женщин-гетерозигот), делается вывод о наличии клонального кроветворения и подразумевается, что такой клон совершает эволюцию к малигнизации или даже является ее первым шагом. Между тем, представленные здесь данные показывают, что это не единственное объяснение. Нельзя исключить, что речь идет о нормально существующих предшественниках, необычное поведение которых вполне укладывается в крайние точки нормального распределения клонов по величине и длительности существования. Впрочем, ответ на этот вопрос можно будет получить путем изучения частоты возникновения лейкозов как у животных с и без моноклонового кроветворения, так и у людей с сильно искривленным распределением доли клеток с инактивированной X-хромосомой в кроветворной системе по сравнению с другими тканями.

Эти данные драматически изменили наши представления о функционировании кроветворной системы. Отсутствие свойства самоподдержания у СКК требует отказа от существующей догмы о неограниченности пролиферативного потенциала и бессмертия СКК. Последние принципиально не отличаются от более зрелых членов кроветворной иерархии, и все без исключения кроветворные клетки представляют собой транзитные популяции, непрерывно или с перерывами продвигающиеся к конечным стадиям созревания. Именно поэтому все отделы предшественников гетерогенны, содержат многие постепенно переходящие друг в друга клеточные формы, с размытыми границами каждого из отделов. Собственно говоря, от понятия "стволовая кроветворная клетка" приходится отказаться. Однако термин прочно вошел в сознание и исключить его из обращения не удастся. Следует только помнить, что в отдел (группу) стволовых клеток входят ранние предшественники, сохранившие полипотентность, но не самоподдерживающиеся и расходуемые в течение жизни.

Полипотентные кроветворные предшественники. На рис. 12 выделен отдел стволовых мультипотентных клеток, к которым относятся длительно поддерживающиеся клетки - КРКМ и КИДК.

В последние годы показано существование тотипотентных клеток-предшественниц, способных дифференцироваться практически во все ткани, производные всех трех эмбриональных листков. При этом такие клетки заселены в орга-

низме по разным территориям, и их локализация (например, в костном мозге, ЦНС, печени и т.д.) не определяет их способности служить стволовыми элементами только данной ткани или органа. До сих пор не ясно, идет ли речь о высокой пластичности стволовых клеток, об их способности к транс- или дедифференцировке или речь идет о сохранении во взрослом организме "реликтовых" клеток, например ES-клеток (эмбриональных стволовых). Поэтому мы ввели новый раздел, включающий 1-2 разновидности тотипотентных клеток. Мы также изменили отдел стволовых мультипотентных клеток. Первым звеном в нем является КРКМ-Д - клетки, способные длительно (т.е. в течение всей жизни) репопулировать систему кроветворения, пораженную ионизирующим излучением или противоопухолевыми препаратами. Первый этап ее дифференцировки - КРКМ-К (клетки, способные поддерживать кроветворение относительно короткое время; у мышей это время составляет 2-4 месяца). Клетки, входящие в первые три отдела системы кроветворения, морфологически неразличимы (они обычно выглядят как малые лимфоциты или как бластные клетки), поэтому их изображение в этой части схемы отсутствует. Отличаются эти клетки главным образом функционально, по набору доступных для них путей дифференцировки, чувствительности к разным ростовым факторам и т.д., хотя большинство из них имеет уникальный для каждого вида предшественников набор маркеров, в том числе и рецепторов цитокинов.

Первый признак, отличающий ранние стадии созревания СКК, заключается в постепенном снижении пролиферативного потенциала. Такие клетки способны поддерживать кроветворение после трансплантации в облученный организм лишь в течение короткого срока (недели). К ним относятся КООб из отдела стволовых мультипотентных клеток. Как видно из рисунка, существуют и дополнительные члены иерархии СКК, которые вообще не поддерживают кроветворение при трансплантации, но сохраняют полипотентность (отдел поли-олигопотентных коммитированных предшественников) и могут быть определены по их способности формировать колонии - клоны кроветворных клеток в селезенке облученных мышей (КОЕ-с) или в полужидких культурах (КОЕ-Бл, КОЕ-ВПП, КОЕ-ГЭММ). Вышеперечисленные категории клеток регулируются различными ростовыми факторами, представленными на схеме и расшифрованными в подписи к рисунку.

Разные члены отдела СКК отличаются не только по функциональным свойствам, но и по специфическим поверхностным маркерам, что доказывает гетерогенность отдела СКК. Более того, современные методы позволяют разделить

эти клеточные популяции на специальных сортерах. Можно выделить популяцию клеток, которая длительно защищает летально облученных животных, если каким-либо образом обеспечивается их выживание в течение первого месяца. Очищенная популяция клеток содержит пСКК и характеризуется наличием следующих маркеров: $CD34^+CD33^-CD38^-HLA-DR^-c-kit^+Rh123^{-low}$. Очень близкая клеточная популяция, отличающаяся только более интенсивным окрашиванием родамином 123 ($Rh123^{high}$), содержит клетки, способные кратковременно, не более 1 месяца, защитить облученных животных и клетки, дающие колонии в селезенке облученных мышей, но не пСКК.

Коммитированные олигопотентные предшественники. При дальнейшем созревании клетки покидают стволовой отдел и переходят в отдел коммитированных поли-олигопотентных предшественников. Клетки этого отдела дают в культуре колонии, способные к реклонированию, т.е. образованию вторичных колоний, и, следовательно, сохраняющие еще достаточно высокий пролиферативный потенциал. Постепенно коммитированные клетки теряют полипотентность и переходят в отдел монопотентных, приобретая линейно специфические маркеры. Здесь уже можно четко выделить предшественников конкретных линий дифференцировки. Как происходит выбор дифференцировки и созревание кроветворных клеток? Этот вопрос до настоящего времени не имеет ответа. С одной стороны, это могут быть внешние регуляторные сигналы, приводящие к выбору того или иного направления дифференцировки, которое принимает клетка, или внутренние стохастические изменения клеток-предшественниц, индуцирующие созревание и коммитирование. Последнее может быть определено как решение, которое принимает клетка для продукции потомков определенной линии в каком-то будущем времени. Этот процесс необязательно сопровождается делением, немедленным изменением морфологии клетки или появлением на клеточной поверхности определенных белков и рецепторов. Наличие стадии коммитирования подтверждается образованием в культуре колоний только одной линии дифференцировки, даже в присутствии «коктейля» различных ростовых факторов, которые способны поддерживать и предшественники других линий.

Коммитирование ранних предшественников происходит на стадии, когда на их мембране еще не появляются рецепторы кроветворных ростовых факторов, которые, следовательно, не участвуют в процессе выбора клеткой направления дифференцировки. Более того, некоторые клетки, например стволовые кроветворные,

мультипотентные и бипотентные предшественники, которые уже имеют рецепторы для многих, хотя и не для всех ростовых факторов, осуществляют коммитирование независимо от наличия цитокинов. Этот процесс необратим, и ростовые факторы не могут изменить уже принятого клеткой решения. Так, введение в геном предшественников макрофагов гена рецептора эритропоэтина (ЭРП) делает их чувствительными к этому ростовому фактору, однако, они продолжают образовывать макрофагальные, а не эритроидные колонии; наоборот введение рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в эритроидные предшественники приводит к образованию под влиянием M-CSF чистых эритроидных колоний [Metcalf, 1998]. В целом мы все еще не понимаем, каковы молекулярные механизмы и генетические основы различий между линейным коммитированием, индукцией дифференцировки и фенотипическим переключением, происходящим в кроветворных клетках.

Предшественников конкретных линий дифференцировок, как и клетки предыдущего отдела, определяют по способности формировать колонии в полужидких средах. Клетка-предшественница эритроцитов (БОЕ-Э - бурстобразующие единицы эритроцитов) образует несколько мелких колоний эритроидных клеток. Она дифференцируется в более зрелый предшественник (КОЕ-Э - колониобразующие единицы эритроцитов), который продуцирует мелкие колонии, входящие в состав БОЕ-Э. Все вышеперечисленные клетки не могут быть дифференцированы на основе морфологических характеристик, так как они представляют собой бластные клетки без признаков дифференцировки. Последние, при дальнейшем созревании, переходят в морфологически узнаваемые клетки.

Кроветворение в антенатальном периоде

Кроветворные клетки возникают в раннем эмбриогенезе из вентральной мезодермы под влиянием индукции морфогенетическим белком кости BMP-4 (член семейства трансформирующего ростового фактора $TGF\beta$) в комбинации с такими индуцирующими факторами, как ростовой фактор фибробластов (FGF) и активин; ограничение индуцирующего кроветворную ткань эффекта достигается за счет связывания BMP-4 с секретруемыми эмбриональным организмом хордином и ноджином, что препятствует связыванию BMP-4 с рецептором. Сам BMP-4 стимулирует некоторые гомеобокс гены, такие, как MIX1, ответственные за транскрипцию участвующих в кроветворении генов, а также гены

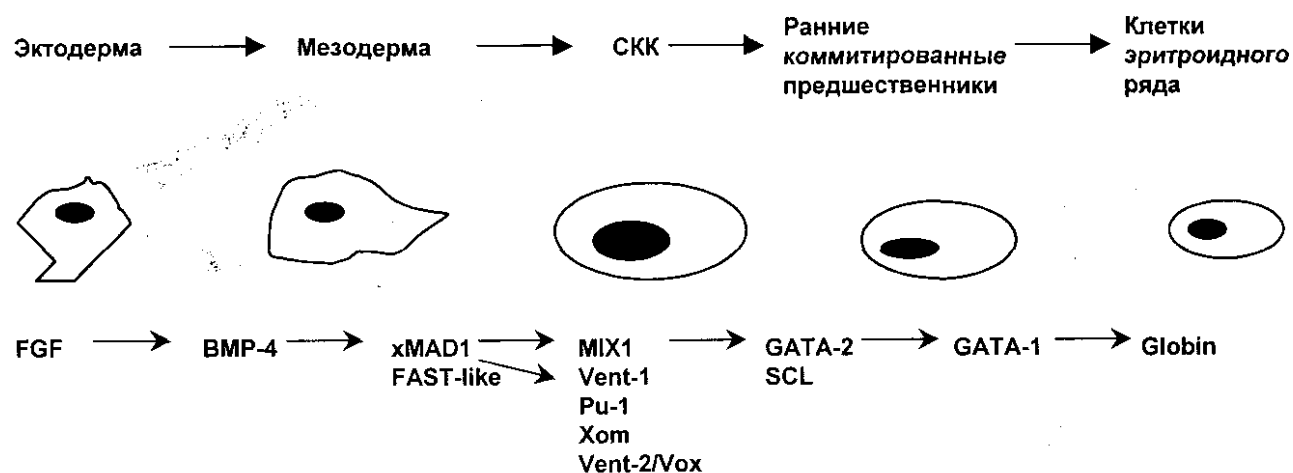


Рис. 13. Модель для событий и молекул, участвующих в гемопоэзе на примере эритроидных клеток. Скопирован из ст. Huber, Zon, 1988.

многих кроветворных ростовых факторов [Huber, Zon, 1998]. Схематически модель событий и молекул, участвующих в развитии кроветворной системы, представлена на рис. 13 [Huber, Zon, 1998]. В стадии бластулы мезодерма индуцируется FGF и активин-подобными факторами.

Во время гаструляции патернизация мезодермы осуществляется BMP-4, который влияет на транскрипцию и вызывает экспрессию таких генов гомеобокса, как MIX1 и Vent-1, через xMad1. Видимо, для вентральной патернизации и образования СКК необходимы многие секретлируемые факторы и межклеточные контакты, которые и определяют различные участки экспрессии кроветворных факторов транскрипции типа SCL/TAL-1, LMO2 и GATA-1 PU-1. Начинаясь экспрессия линейно-специфичных факторов транскрипции, как и стимуляция цитокинами, ответственна за пролиферацию и дифференцировку СКК.

В онтогенезе мыши первые кроветворные клетки появляются на 7-8-й день в виде кровяных островков в желточном мешке. Считалось общепринятым, что стволовые клетки из желточного мешка мигрируют в печень (9-10-й день после оплодотворения), а затем репопулируют остальную кроветворную систему [Metcalf, Moore, 1971], однако эти представления оказались неверными. Стволовые кроветворные клетки возникают одновременно и независимо как в желточном мешке, так и в эмбрионе, в области "аорто-, гонадо-мезонефрос" (AGM-region), хотя в этой области их в 10 раз меньше. Клетки из обоих источников способны поддерживать всю жизнь кроветворение при трансплантации облученным или кондиционированным цитостатиками реципиентам [Medvinsky et al., 1993; Yoder et al., 1997].

Биологический смысл такого дуализма в возникновении кроветворных клеток пока не ясен. Возможно сохранен общий принцип эволюции - онтогенез повторяет филогенез и наличие в онтогенезе примитивного мегалобластического кроветворения, характеризующегося ядерными эритроцитами и фетальным гемоглобином, представляет собой атавистическую реализацию этого процесса. Нельзя исключить и какие-то регуляторные различия в функционировании желточно-мешочных примитивных клеток в сравнении с дефинитивным гематопозом. Может быть расшифровка значения переключения к продукции фетального гемоглобина во взрослом организме при сильных гематопозитических стрессах принесет новые данные для расшифровки этой интересной проблемы.

В онтогенезе человека первые кроветворные клетки появляются в виде своеобразных островков эритроидных клеток в желточном мешке 19-го дневного эмбриона. К концу 3-й недели в мезодерме эмбриона в сердце, аорте и артериях обнаруживаются кроветворные клетки. Показано, что они образуются интраэмбрионально, независимо от эритропоэза в желточном мешке. На 4-й неделе в этой области появляются клетки-предшественницы, способные продуцировать колонии кроветворных клеток в культуре. На 6-й неделе активность кроветворения в желточном мешке спадает и полностью заканчивается к 4-му месяцу жизни эмбриона. В желточном мешке происходит образование только примитивных эритробластов, называемых мегалобластами. В них синтезируется фетальный гемоглобин, а гены взрослого гемоглобина не экспрессируются. После 6 недель развития основным кроветворным органом зародыша становится печень, кроветворение в которой достигает максимума к 5-му месяцу. В этот период кроветворение в ос-

новном эритроидное, хотя на 9-й неделе появляются первые нейтрофилы. Селезенка у зародыша человека - транзитный кроветворный орган. В ней обнаруживается слабый эритропоэз с 3-го по 4-й месяцы развития.

На 4-5-м месяце начинается третий период кроветворения, когда оно происходит в основном, в костном мозге, где образуются эритроциты, содержащие взрослый гемоглобин, и начинается лейкоцитопоз. Размеры эритроцитов постепенно уменьшаются, нарастает их число. Полная замена фетального гемоглобина на взрослый происходит только через 6 месяцев после рождения. Вопрос о переключении синтеза гемоглобина с фетального на взрослый до сих пор окончательно не решен, однако показано, что это может происходить в одном и том же клеточном клоне потомков БОЕ-Э. Не ясно, сменяются ли различные популяции эритроидных клеток или происходит смена синтеза гемоглобинов.

В первые дни у новорожденных наблюдаются полиглобулия и нейтрофильный лейкоцитоз. Эритропоэз нормализуется в возрасте 2-3 месяцев. Нейтрофилез первых дней жизни сменяется лимфоцитозом. Только к 5 годам в формуле крови начинают преобладать нейтрофилы.

Регуляция кроветворения

Несмотря на то, что исследования последних лет выявили существование полипотентных СКК, осуществляющих кроветворение путем клональной сукцессии, мы по-прежнему не понимаем, как регулируется сложный процесс вступления стволовой клетки в цикл и выбор ее направления дифференцировки. Показано лишь, что в отделе стволовых мультипотентных клеток регуляция эта носит локальный характер при прямом участии стромы кроветворных органов. Участвующие в ней ростовые факторы и ингибиторы как уже четко охарактеризованные (SCF, ФЛТ-3-лиганд, IL-1 и IL-3, LIF, TGF β , G-CSF), так и только изучаемые типа циклинов, рестриктивных, адгезинов и др. продуцируются главным образом клетками стромы или в более широком смысле - клетками кроветворного микроокружения [Чертков, Гуревич, 1984; Oga-wa, 1993; Verfaillie, 1998]. Локальный эффект таких факторов обеспечивается как их продукцией *in situ*, так и иммобилизацией на компонентах внеклеточного матрикса.

Для того чтобы эти взаимодействия стали возможны, необходимо обеспечить тесный контакт кроветворных и стромальных клеток. Такой контакт осуществляется за счет целого семейства различных молекул, участвующих в процессах клеточной адгезии и секретируемых стромальными клетками. К ним относятся протеогли-

каны, селектины, молекулы клеточной адгезии (CAM), некоторые домены фибронектина, коллаген, ламинин, тромбоспондин, интегрины и др. [Aizawa, Tavassoli, 1987; Keating, Gordon, 1988; Siczkowski et al., 1992; Texido et al., 1992]. На СКК и кроветворных предшественниках обнаружено соответственно более 20 рецепторов к различным CAM [Verfaillie, 1998], к которым относятся суперсемейство Ig CAM, L- селектин и некоторые сиаломуцины.

Маркер СКК-CD34 и некоторые другие маркеры кроветворных клеток CD43, CD45RA и др. представляют семейство сиаломуцинов. Какие из этих рецепторов отвечают за адгезию СКК к костномозговой строме не известно, однако существуют данные, что такими рецепторами являются β_1 -интегрины и их лиганды. Возможно, интегрин $\alpha_4\beta_3$ играет важную роль в сродстве СКК к стромальному микроокружению [Prosper et al., 1998]. Изменение конформации этой молекулы нарушает такое взаимодействие, что может лежать в основе мобилизации СКК в периферическую кровь. Особая роль клеточных взаимодействий в регуляции СКК видна и из того, что основной маркер СКК CD34 является сиаломуцином - молекулой клеточной адгезии.

Начало активного функционирования стволовой клетки, связанное с выходом из фазы G₀-клеточного цикла, как и выбор ею направления дифференцировки, видимо, специально не регулируются и представляют собой стохастические и, следовательно, исключительно надежные процессы [Чертков, 1984; Metcalf, 1984; Pustai et al., 1993]. В эволюции подобные стохастические (случайные) процессы всегда используются при особо важных для судьбы вида решениях: выбор пола, мобилизация в клеточный цикл яйцеклеток и др. СКК не чувствительны к запросу и даже сильнейшие гемопозитические стрессы, такие, как кровопотеря, облучение, химиотерапия не способны к увеличению доли клеток, находящихся в клеточном цикле. По мере дифференцировки чувствительность СКК к внешним факторам постепенно возрастает. На первых этапах регуляция пСКК исключительно близкодествующая и осуществляется взаимодействием СКК со стромальным микроокружением, с которым они находятся в прямом контакте.

Эффекторными молекулами такой регуляции являются *ростовые факторы*, IL и ингибирующие факторы. Важную роль в ней играют белки внеклеточного матрикса, которые, с одной стороны, являются морфологическим субстратом для локализации СКК, а с другой, - избирательно адсорбируют определенные ростовые факторы в необходимых концентрациях. Для выживания СКК в состоянии покоя важно наличие достаточной концентрации таких факторов, как SCF,

ФЛТ-3-лиганд, тромбопоэтин и некоторых других. Эти же факторы необходимы и для пролиферации СКК.

Наоборот, торможение выхода СКК в клеточный цикл регулируется ингибиторами - такими, как LIF, TGF β , воспалительный белок макрофагов, TNF и т.д. По мере продвижения вдоль по дереву кроветворных дифференцировок стохастическая, не чувствительная к запросу пролиферация СКК заменяется на дальнедействующую (регулируемую сывороточным уровнем ростовых факторов), что и обуславливает возможность *количественной регуляции кроветворения*. Наличие двух фаз регуляции кроветворения запроснезависимой на уровне СКК и чувствительной к запросу на уровне всех более зрелых предшественников, включая морфологически распознаваемые, обеспечивает два замечательных свойства процесса кроветворения. Во-первых, неистощимость его в условиях сколь угодно сильного запроса, за счет сохранения регулируемых только стохастически СКК, и запроснезависимых, которые восстанавливают всю кроветворную систему после ее гибели или расходования зрелых клеток. Во-вторых, возможность быстрого количественного ответа, который осуществляется более зрелыми, чем СКК, предшественниками, и обеспечивающего увеличенную продукцию зрелых клеток нужного вида в случае запроса.

Такой принцип регуляции кроветворения позволяет понять биологический смысл одновременного функционирования множества небольших короткоживущих клонов при равновесном кроветворении. Действительно, в кроветворной системе в каждый данный момент присутствует множество кроветворных предшественников, далеко не исчерпавших свой пролиферативный потенциал и способных к немедленному и интенсивному ответу на кроветворный запрос. Например, после облучения число КОЕ-с может возрасти в 10 000 раз, что способствует быстрому, в течение нескольких дней, восстановлению нормальной популяционной структуры кроветворной ткани. При равновесном кроветворении используется очень небольшая часть доступных предшественников. Большая их часть элиминируется либо за счет гибели в результате апоптоза, либо в результате малого числа делений, претерпеваемых в процессе терминальной дифференцировки. На уровне отдела СКК регуляция носит главным образом близкодействующий характер, при котором решающее значение имеют локальные факторы стромальной природы.

В отделах коммитированных предшественников регуляция постепенно становится дальнедействующей, клетки приобретают чувствительность к гуморальным факторам, на которые они способны отвечать и вне структур кроветворного

микроокружения. Именно на этом свойстве основаны методы их определения - образование колоний в вязкой среде под влиянием присутствующих в среде ростовых факторов. На данном уровне ярко выражен синергизм ростовых факторов и для оптимального ответа крайне важно наличие комбинации ранних и поздних цитокинов. На следующих этапах дифференцировки основную роль играют более поздние факторы, хотя синергизм эффектов сохраняется до последних стадий дифференцировки.

В настоящее время более или менее понятны механизмы регуляции некоторых линий кроветворных клеток. В регуляции эритропоэза решающую роль играет ЭРП, без которого БОЕ-Э не могут пролиферировать, а в эритробластах не начинается синтез гемоглобина. От уровня ЭРП зависит интенсивность эритропоэза. Основное место образования ЭРП - почки. Продукция его регулируется напряжением кислорода в почках. Это объясняет, почему усиленный эритропоэз индуцируется не только кровопотерей, но и снижением напряжения кислорода в крови. Поэтому полицитемия является естественным физиологическим ответом на заболевания легких, снижение содержания кислорода в атмосфере (высокогорная полицитемия) и др.

Тонкие механизмы молекулярной регуляции эритропоэза только начинают расшифровываться. Известно, что в стимуляции усиленной выработки ЭРП участвуют по меньшей мере два участка ДНК, взаимодействующие с промотором гена ЭРП. Это разные области энхансера этого гена. Активация при гипоксии только одного из них усиливает продукцию ЭРП в печени, тогда как активация обеих индуцирует его образование также и в почках [Kochting et al., 1998]. В этой линии дифференцировки число выработанных зрелых клеток (эритроцитов) не участвует в регуляции их образования и даже при полицитемии эритропоэз может быть усилен введением экзогенного ЭРП.

Обратный принцип заложен в регуляцию тромбоцитопоэза: в организме определяется именно число тромбоцитов, а не их функциональная активность. При тромбоцитопениях разного генеза возрастает выработка тромбопоэтина, гормона, усиливающего амплификацию предшественников мегакариоцитов и ускоряющего их полиплоидизацию. Предполагается, что основным местом продукции тромбопоэтина является печень.

Интересно регулируются гранулоциты - макрофаги. Их общий предшественник требует синергичного действия ряда ростовых факторов, основным из которых является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Увеличение продукции гранулоцитов и макрофагов происходит под влиянием

многих локально продуцируемых факторов, оказывающих строго согласованные по времени каскадные эффекты. Начальными звеньями такого каскада являются, что вполне естественно, факторы, участвующие в патогенезе воспалительного процесса, в частности, TNF, макрофагальный белок воспаления (MIP) и др. В результате возрастает локальная продукция IL-1, стимулирующего выработку других цитокинов, главным образом близлежащими фибробластами и макрофагами. Индивидуальная же дифференцировка обеспечивается более поздними колониестимулирующими факторами - G-CSF и M-CSF, необходимыми для пролиферации и дифференцировки предшественников гранулоцитов и макрофагов соответственно (Yang et al., 1998).

Тут четко прослеживаются элементы саморегуляции - нейтрофилы вырабатывают M-CSF, что увеличивает продукцию макрофагов, а макрофаги - G-CSF (наряду с большим количеством других ростовых факторов), ускоряющий наработку гранулоцитов.

Регуляция дифференцировки эозинофилов и базофилов охарактеризована значительно хуже. Однако известно, что при эозинофилопозе важную роль играет IL-5, без которого не происходит терминальная дифференцировка эозинофилов, а для продукции базофилов необходимы IL-3, 4 и фактор роста стволовых клеток.

В регуляции лимфоцитопоза можно выделить две стадии. Первая из них - антигеннезависимая. На этой стадии из полипотентных предшественников дифференцируются предшественники Т- и В-лимфоцитов. Регуляция этого процесса - близкодествующая и осуществляется в тимусе (для Т-клеток), эпителиальными клетками которого продуцируются факторы Т-дифференцировки, и в костном мозге (для В-клеток), где оперируют организованные в ансамбль факторы, важную роль среди которых играют IL-2, 4, 6, 7-15.

Принципы антигензависимой регуляции основаны на том, что при взаимодействии с любым антигеном, которых в природе около 100 000, распознающая его клетка начинает экспрессировать рецептор к некоторым ростовым факторам, чаще всего к IL-2. Последний, таким образом, обеспечивает интенсивную пролиферацию только клеток, участвующих в иммунном ответе на данный антиген.

И локальная, и дальнедействующая регуляция в кроветворной системе осуществляются с помощью ростовых факторов. К настоящему времени известно более 20 цитокинов и 18 интерлейкинов, участвующих в гемопоэзе. Действия факторов очень разнообразны и неоднозначны. Кроветворные предшественники не выживают без взаимодействия с ростовыми факторами, которые предотвращают их запрограм-

мированную гибель [Koury, 1992] - уже на мембране самых ранних предшественников выявляются рецепторы к фактору стволовых клеток и ФЛТ-3-лиганду.

Существуют непосредственно и опосредованно действующие факторы. Некоторые факторы имеют только стимулирующее или ингибирующее действие, однако большинство цитокинов имеют более сложные функции в пролиферации кроветворных клеток. Например, IL-4 может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на пролиферацию предшественников [Rennick et al., 1987; Broxmeyer et al., 1988; Kishi et al., 1989]. Многие факторы активны не только в кроветворной системе, так IL-6 вовлечен в иммунную систему, связан с активностью печени, почек и др. [Kishimoto, 1989]. Один и тот же цитокин может иметь множественные функции на различных этапах дифференцировки. От многих цитокинов зависят активация и усиление функций зрелых клеток. Клетка может начать дифференцировку только при взаимодействии с ростовыми факторами, хотя в выборе направления дифференцировки факторы не участвуют. Уровень фактора определяет количество тех или иных клеток крови, что легко видеть на примере эритропоэтина.

Число продуцируемых кроветворной клеткой митозов также определяется ростовыми факторами. Надо отметить, что их действие всегда неоднозначно: одни и те же факторы могут взаимодействовать с совершенно разными клетками, при этом, в некоторых случаях через другой (чужой) рецептор, что может приводить к прямо противоположным результатам. Например, TNF может индуцировать апоптоз, активируя каскад каспаз в клетке, а в соседней клетке через тот же рецептор активируется инозитольный путь передачи сигнала и клетка начинает пролиферировать. Отсутствие одного или нескольких факторов у мышей-нокаут с выключенным геном данного фактора часто вообще не приводит к изменениям в гемопоэзе, например отсутствие такого важного фактора, как IL-3 не влияет на кроветворение у соответствующих нокаут. В некоторых случаях избыточность факторов приводит к активации белка p53, регулирующего апоптоз и индуцирующего клеточную гибель. Все эти факты говорят о том, что в организме существуют очень большая избыточность и взаимозаменяемость молекул, регулирующих кроветворение.

Несмотря на большое количество сведений о цитокинах, в данный момент не представляется возможным представить разумную схему действия ростовых факторов; в примитивном виде их участие в гемопоэзе изображено на рис. 12. Согласно этой схеме, ростовые факторы можно разделить на три категории:

- 1) позднедействующие линейно специфические факторы,
- 2) среднедействующие линейно неспецифические факторы,
- 3) факторы, влияющие на кинетику клеточного цикла дремлющих примитивных предшественников:

Позднедействующие линейно специфические факторы. Большинство позднедействующих факторов линейно специфичны и поддерживают пролиферацию и созревание коммитированных предшественников. К ним относятся ЭРП, M-CSF, IL-5, тромбопоэтин. Среди позднедействующих факторов есть и такие, как G-CSF, который участвует в активации очень ранних предшественников, находящихся в состоянии покоя.

Среднедействующие линейно неспецифические факторы. К этой группе относятся IL-3, GM-CSF и IL-4. Все эти факторы поддерживают пролиферацию полипотентных предшественников, но только после их выхода из G₀-фазы. Так, IL-3 не рекрутирует в цикл дремлющие клетки, но поддерживает пролиферацию полипотентных предшественников. Зависимость клеток-предшественниц от IL-3 снижается по мере их созревания, и этот фактор не поддерживает терминальных стадий дифференцировки. GM-CSF также поддерживает деление мультипотентных предшественников, однако его мишенями могут быть и более зрелые клетки-предшественницы. Показано, что рецепторы IL-3 и GM-CSF обладают одинаковой β -субъединицей, что может объяснять плеiotропное действие одних и тех же факторов [Kitamura et al., 1991]. Возможно, все эти факторы обладают синергическим действием с линейно-специфическими факторами.

Факторы, влияющие на кинетику клеточного цикла дремлющих примитивных предшественников. Механизм регуляции пролиферации ранних предшественников до сих пор не известен. Считалось что IL-1 в сочетании с IL-3 поддерживает пролиферацию очень ранних клеток. В настоящее время к самым ранним факторам относят ФСК, ФЛТ 3-лиганд и G-CSF, IL-6, IL-11, IL-12. Обнаружено, что LIF может усиливать пролиферацию примитивных предшественников. Существует структурная гомология между IL-6 и G-CSF, рецепторы к IL-6, LIF и IL-11 имеют общий белок для передачи сигнала - gp130. Подобные биохимические и структурные гомологии также могут объяснять множественность действия ростовых факторов. Эти же факторы могут быть и факторами выживания клеток-предшественниц.

Для некоторых рецепторов цитокинов выявлены специфические домены, через которые

передается сигнал к дифференцировке, но не к пролиферации: например C-терминальный район цитоплазматического домена рецептора G-CSF необходим для индукции синтеза миелопероксидазы, а для сигнала к пролиферации он не нужен; отсутствие C-терминального района в некоторых случаях приводит к тяжелой нейтропении (синдром Костмана). Интенсивное изучение путей передачи сигнала через рецепторы цитокинов выявило множество сигнальных молекул, например активация рецептора эритропоэтина включает JAK2, STAT5, Grb2, SHC, ras, raf митоген-активируемую протеинкиназу, фосфатазы SPH1 и SPH2, протинкиназу C, фосфатидилинозитол-3 киназу и фосфолипазу C- γ (PLC- γ). Ни одна из этих молекул не является уникальной и участвует также в передаче сигнала от других рецепторов [Socolovsky et al., 1998]. Специфический ответ через рецептор является результатом взаимодействия уникального клеточного окружения и коммитирования.

Таким образом, системы локальной и далекодействующей регуляции кроветворения обеспечивают не только избыточность регуляторных взаимодействий, но и их очень точный результат. Как в норме, так и при различных стрессорных воздействиях, мириады делящихся кроветворных клеток самых разных линий дифференцировки в итоге очень точно удовлетворяют потребности организма в данный момент в клетках того или иного вида.

Молекулярные основы регуляции кроветворения интенсивно разрабатываются только в последние годы, когда появился метод направленного мутагенеза, позволяющий избирательно выключить тот или иной ген в тотипотентной эмбриональной стволовой клетке мыши [Shivdasani, Orkin, 1996]. Последующее использование таких клеток для получения трансгенных животных, в которых инактивирован во всех тканях определенный ген, или для культур, в которых происходят кроветворные дифференцировки, позволило получить важные данные об участии тех или иных генов в процессах развития и регуляции кроветворной системы.

Нужно, однако, учитывать, что эта революционная техника позволяет судить только о том, какие изменения фенотипа произошли в клетках, органах и системах организма. Понятно, что такие данные не обеспечивают понимания механизмов функционирования выключенных генов, так как само по себе выключение гена на ранних стадиях развития приводит к блокаде всех последующих шагов дифференцировки, и какие из них играют какую роль в конечном результате часто остается невыясненным.

Все же установлено, что на начальных стадиях кроветворных дифференцировок важную

роль играют факторы транскрипции, несущие основной спираль-шпилька-спираль мотив (bHLH). Этот мотив широко распространен среди различных линейно-специфичных или общих факторов транскрипции и медирует регуляцию генов путем связывания *cis* элементов с последовательностью CANNTG (E боксы). Один из наиболее важных кроветворных bHLH факторов TAL-1/SCL участвует в дифференцировке СКК как в миелоидных, так и в лимфоидных линиях. Выключение этого гена приводит к внутриутробной гибели мышей в связи с полным отсутствием кроветворения как в желточном мешке, так и в теле эмбриона. Предполагается, что tal-1/SCL участвует в начальной дифференцировке клеток крови из мезодермы (Shivdassani, Orkin, 1996).

Другой ДНК мотив GATA-1 является важным *cis* регуляторным элементом многих генов, экспрессируемых при эритроидной дифференцировке. Выключение его сопровождается блоком эритропоэза у эмбриона, при полном сохранении дифференцировок по другим линиям. GATA-1 принадлежит к небольшому семейству близких цинк-фингер факторов трансляции, включающему GATA-2 и GATA-3. Первый из них необходим для развития ранних кроветворных предшественников, тогда как дальнейшие стадии дифференцировки по-видимому от него не зависят. Предполагается, что GATA-2 медирует чувствительность клетки к ростовым факторам, в частности к фактору стволовых клеток. Ген *c-myb* не влияет на кроветворение в желточном мешке, но серьезно нарушает печеночный гемопоэз. Лocus, кодирующий ген AML-1, часто реаранжированный при остром миелобластном лейкозе и детском остром лимфобластном лейкозе, блокирует дифференцировку кроветворных клеток по всем линиям, видимо ингибируя экспрессию генов рецепторов кроветворных ростовых факторов. Другой фактор транскрипции PU-1 явля-

ется специфичным для кроветворных клеток членом *ets* фамилии, участвующим в развитии миелоидных и В-клеток. Другие цинк-фингерные факторы транскрипции, как Ikaros, участвуют в регуляции клеток лимфоидной системы. При выключении этого гена отсутствуют зрелые В- и Т-лимфоциты, а также натуральные киллеры.

Ключевые факторы предполагают, что фундамент дифференцировки основывается на процессе упорядоченной генной регуляции, заканчивающийся экспрессией уникального набора тканеспецифичных и широко распространенных генов. При этом для различных аспектов клеточной дифференцировки требуются и гены, кодирующие не только белки - факторы транскрипции. В частности, для кроветворных клеток важнейшую роль играют некоторые белки, участвующие в передаче сигнала, такие, как ростовые факторы типа G-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин, ЭРП, рецепторы тирозин-киназы Flk-1 и Janus киназы Jak3 и др. Понятно, что функции факторов транскрипции модулируются множеством эффектов, включая сигналы цитокинов и ростовых факторов, межклеточные взаимодействия, позиции в клеточном цикле и т.д. Именно эти механизмы очень интенсивно изучаются в последние годы и именно тут можно ждать решающих прорывов в расшифровке того, как начинается экспрессия ключевых факторов транскрипции в кроветворных предшественниках: стохастический ли это процесс или тонко регулируемый ответ на внешние сигналы, каковы механизмы функционирования факторов транскрипции в регуляторной сети, приводящие к упорядоченному выбору направления дифференцировки и развитию кроветворной системы. Можно не сомневаться, что ответы на многие из этих увлекательнейших вопросов будут получены в ближайшее время.

ШУНТОВОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ (ГИПОТЕЗА)

В условиях напряжения, возникающего в кроветворной ткани, при разрушении составляющих ее клеток (гемолиз, цитостатическое воздействие), появляются зрелые элементы, не свойственные этой ткани в нормальных условиях. Необычные клеточные элементы удается выявить по их высокой устойчивости к разным повреждающим воздействиям, по функциональным особенностям, иногда сближающим эти клетки с клетками плода.

В 1961 г. мы описали подобный феномен под названием «вторая популяция» [Воробьев А. И., Бриллиант М.Д., 1961], обнаружив появление

при разных формах гемолитических анемий, наследственных и приобретенных, эритроцитов, повышенно устойчивых к действию хлористоводородной кислоты. После прекращения действия гемолитического фактора (после спленэктомии при наследственном микросфероцитозе, назначения стероидных гормонов при аутоиммунной гемолитической анемии и т. д.) вторая популяция эритроцитов через 1-1,5 месяца исчезала, и кислотная стойкость эритроцитов, регистрируемая с помощью кислотной эритрограммы, становилась почти нормальной (рис. 14). Известно, что при дефиците Г-6-ФД гемолиз, вы-

званный у пациента каким-либо фактором, спустя некоторое время стихает, даже если не прекращается прием препарата, спровоцировавшего гемолиз [Dacie, 1960].

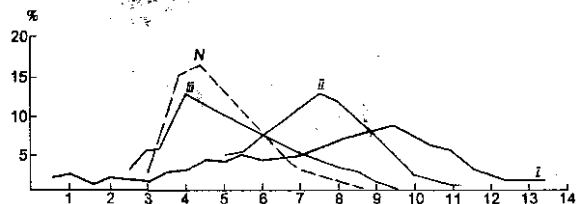


Рис. 14. Исчезновение второй - шунтовой популяции высокостойких к действию хлористоводородной кислоты эритроцитов из крови больного наследственным микросфероцитозом после спленэктомии. По оси абсцисс - длительность действия 0,002 н. раствора хлористоводородной кислоты, мин; по оси ординат - процент лизированных клеток. I - кривая распределения эритроцитов (эритрограмма) по стойкости к кислоте у больного наследственным микросфероцитозом до спленэктомии; II - кислотные эритрограммы этого же больного через 6 дней; III - кислотные эритрограммы через 4 мес после спленэктомии; N - кислотная эритрограмма здорового человека (средняя).

К таким явлениям относятся и феномены, наблюдаемые у пациентов, длительно получавших цитостатическую терапию. Например, введение адриабластина 1 раз в месяц в дозе 60-90 мг вызывает через 1,5-2 месяца эпизоды выпадения волос на голове; через 2-3 месяца при продолжавшемся введении препарата волосы вновь начинали расти, некоторое время могут быть более темными, вьющимися.

Феномен появления иной популяции клеток в ответ на повреждение получал разное толкование. Прекращение гемолиза при дефиците Г-6-ФД на фоне приема сульфаниламидов объясняли появлением ретикулоцитоза, т.е. молодых клеток, имеющих меньший дефицит Г-6-ФД, и потому более устойчивых к действию повреждающих факторов. Предполагалось, что при разных анемиях созревание эритроцитов ускорено в результате раннего обезьядривания эритрокариоцитов и эритроцит дольше живет в крови на стадии ретикулоцита. Ускоренное созревание предполагалось и у тромбоцитов, когда при напряженном тромбоцитопозе в крови находят так называемые голубые пластинки, появившиеся как будто бы на стадии еще незрелых мегакариоцитов.

Методы культивирования кроветворной ткани позволили увидеть, что отдельным росткам гемопоэза соответствует несколько клеток-предшественниц, что функционально одни и те же зрелые клетки крови, как это следует из закономерностей эритропоэза, могут быть результатом дифференцировки различных клеток-

предшественниц, что в условиях напряженного гемопоэза в костном мозге начинают дифференцироваться ранние клетки-предшественницы разных ростков гемопоэза. При напряженном эритропоэзе с воздействием гипоксии повышается дифференцировка ранних бурстобразующих эритроидных клеток, вместе с тем именно с ними связана повышенная продукция фетального гемоглобина *in vitro* у взрослого человека.

Как установлено в эксперименте в регенерирующем костном мозге после цитостатического воздействия (5-фторурацил) и, вероятно, после облучения некоторое время кроветворение осуществляется за счет пролиферации очень ранних клеток-предшественниц, обладающих высокой пролиферативной активностью, сохраняющихся после действия цитостатиков и обнаруживаемых в костном мозге в количестве, значительно превосходящем нормальное [Humphries, 1979; Bradley, Hodgson, 1980].

Итак, сейчас можно считать доказанным, что в определенных условиях (повышенная потребность в клетках) наряду с основным фоновым кроветворением может существовать и параллельное - шунтовое, образующее дополнительную популяцию клеток. Представление о шунтовом кроветворении было сформулировано в работах А.И. Воробьева, М.Д. Бриллианта [1977, 1980, 1981]. Именно с этим шунтовым кроветворением связано появление популяций «устойчивых» клеток; в отдельных ситуациях шунтовое кроветворение становится преобладающим (наследственный микросфероцитоз), в других - в крови одновременно оказывается зрелое потомство разных клеток-предшественниц одного ростка кроветворения. Давно известны разные популяции клеток, одновременно существующие в кроветворении плода: одни клетки печеночного кроветворения, другие - селезеночного, третьи - костномозгового, на каком-то этапе переkreшивающиеся между собой (рис. 15). Эритроидные клетки, в частности, отличаются на этих этапах кроветворения размерами эритрокариоцитов и зрелых эритроцитов и характером продуцируемого гемоглобина. Кислотная стойкость эритроцитов новорожденного значительно превосходит стойкость эритроцитов взрослого.

Какой биологический смысл заложен в этих странных, отчасти параллельных дифференцировках, конечным этапом которых является все тот же эритроцит? Прямого ответа на этот вопрос пока нет, но можно предположить, что в процессе эволюции примитивный первоначальный эритропоэз с короткой жизнью эритроцитов под влиянием факторов отбора сменился иным эритропоэзом, почти нацело лишенным фетального гемоглобина, с большей продолжительностью жизни эритроцитов, хотя и менее устойчивых к ряду повреждающих факторов (гемолити-

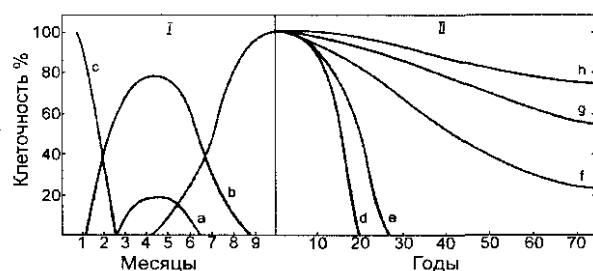


Рис. 15. Участие отдельных органов в кроветворении в разные периоды жизни плода и новорожденного (по Erslev, Weiss, 1940).

По оси абсцисс — месяцы и годы; по оси ординат — клеточность, %. I — пренатальный период; II — постнатальный период; a — селезенка; b — печень; c — желточный мешок; d — голень; e — бедро; f — ребро; g — грудина; h — позвоночник.

ческих, паразитарных). Для компенсации массивного гемолиза или кровопотери способность к ускоренной регенерации биологически оправдана, так как на смену шунтовому быстрому, но менее полноценному гемопоэзу приходит более медленный стабильный эритропоэз.

Все эти факты чрезвычайно усложнили ранее довольно простую схему кроветворения, кото-

рую можно было изобразить на плоскости; теперь схему кроветворения с шунтовыми путями клеточной дифференцировки нужно представлять объемной моделью. Хотя порядок клеточных дифференцировок для морфологически различных клеток остался в основном неизменным, т. е. на смену миелобласту по-прежнему приходит промиелоцит, а на смену эритробласту — пронормоцит, сами по себе миелобласты, эритробласты или монобласты могут оказаться потомством разных, хотя и строго ограниченных, клеток-предшественниц. Эта разница в происхождении определяется напряженностью кроветворения в том или ином ряду.

Неясно, постоянно ли пролиферируют клетки шунтовых путей кроветворения или их некоторая часть может долго оставаться в покое. Возможно, шунтовая ситуация заложена и в опухолевых клетках: может быть ускорение роста опухоли после курса цитостатической терапии при миеломе, иногда и при остром лейкозе, связано с сохранением быстро пролиферирующей фракции родоначальных клеток.

ВОЗРАСТНАЯ СМЕНА ПЛАСТОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ (ГИПОТЕЗА)

С представлением о нормальном кроветворении непосредственно связана выдвинутая в 1977 г гипотеза о возрастных пластах стволовых клеток [Воробьев А. И., Бриллиант М. Д., 1977], существо которой сводится к предположению о качественном различии стволового класса клеток в разные периоды жизни человека. В то время, естественно, ничего не было известно о клональности потомства стволовых клеток, об их конечной дифференцировке и отсутствии самоподдержания. В основе гипотезы лежали клинические наблюдения над лейкозами, неоднородными по форме в разные возрастные периоды или обнаруживающими качественные различия одной и той же формы в зависимости от возраста пациента (рис. 16). Некоторые лейкозы, например, острый миелобластный лейкоз, хронический миелолейкоз, возникшие в Японии у лиц, облученных при взрыве атомной бомбы, имели разный срок развития, разный латентный период от облучения до появления опухоли в зависимости от того, облучен был взрослый человек или ребенок (см. раздел «Этиология гемобластозов человека»)

Острый миелобластный лейкоз обнаруживает различия в клинических особенностях, ответе на терапию, прогнозе и, как показала Rowly [1981], кариологические особенности (см. рис.

16) у лиц моложе и старше 50 лет. Некоторые лейкозы наблюдались почти исключительно в каком-то определенном возрасте (в периоде новорожденности — так называемый врожденный острый миелобластный лейкоз, у пожилых людей — хронический лимфолейкоз, в первые годы жизни и после 50 лет — хронический моноцитарный лейкоз и т. п.). Поскольку лейкоз — опухоль, т. е. клональный процесс, возникающий из одной измененной клетки, следует искать объяснение описываемым явлениям в особенностях самой первичной клетки лейкоза.

Все это позволяло предположить, что известная возрастная смена мест основного кроветворения, наблюдаемая в эмбриогенезе (см. рис. 15), представляет собой не перемещение одинаковых стволовых клеток из одной области в другую, а пролиферацию на новом месте иной стволовой группы клеток, что этот эмбриональный феномен продолжается и далее, что в онтогенезе в целом и в другие периоды жизни, а не только при переходе от антенатального состояния в постнатальное меняются кроветворение и порождающие его клетки. При этом предполагалось, что стволовые клетки ранних периодов развития организма могли сохраняться на всю жизнь и становиться источником лейкозогенеза в другой возрастной период, в частности, у

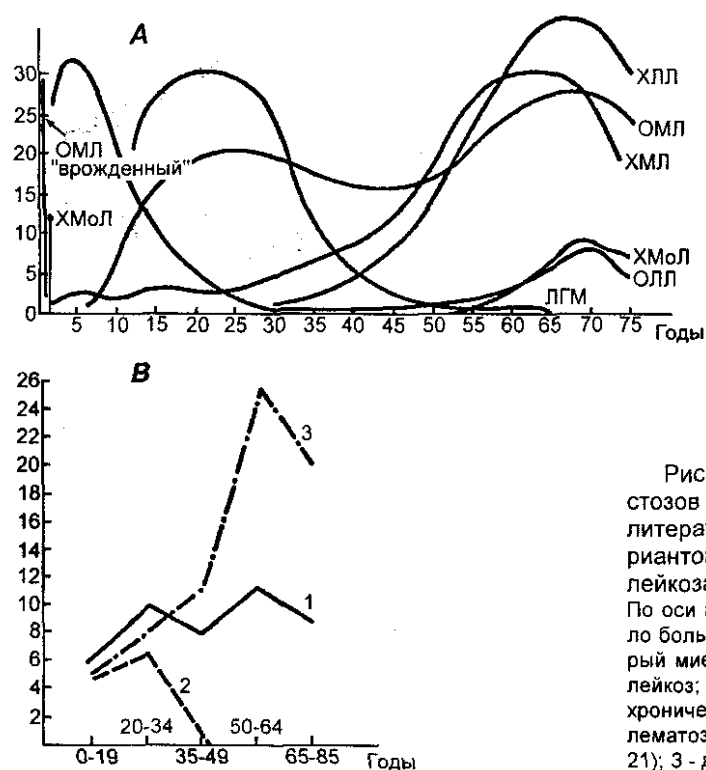


Рис. 16. Возрастная характеристика гемобластозов и лимфогранулематоза, по собственным и литературным данным (А), и возрастная смена вариантов (кариологических) острого миелобластного лейкоза, по данным Rowley, 1981 (В).

По оси абсцисс - возраст больных; по оси ординат - число больных. ХЛЛ - хронический лимфолейкоз; ОМЛ - острый миелобластный лейкоз; ХМЛ - хронический миелолейкоз; ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз; ХМоЛ - хронический моноцитарный лейкоз; ЛГМ - лимфогранулематоз. 1 - нормальный кариотип; 2 - транслокация (8; 21); 3 - другие изменения кариотипа.

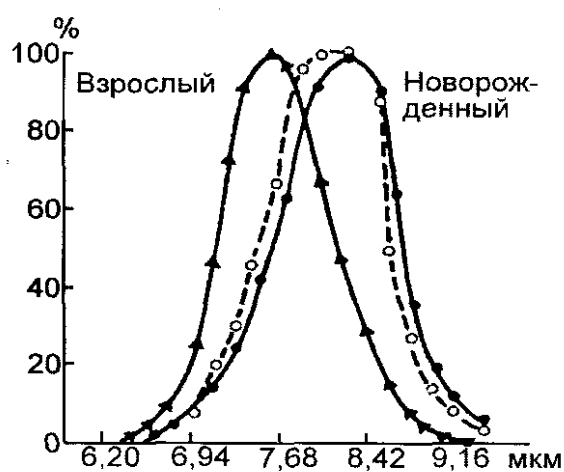


Рис. 17. Различия размеров эритроцитов новорожденного, содержащих HbF (сплошная линия с темными кружочками) и HbA (пунктир со светлыми кружочками), и эритроцитов взрослого, содержащих HbA (сплошная линия с треугольниками) (по Uve, 1970). По оси абсцисс - диаметр эритроцитов (средний диаметр эритроцитов новорожденного - 8,2 мкм; средний диаметр эритроцитов взрослого - 7,4 мкм); по оси ординат - процент клеток.

взрослого, у которого кроветворит иная стволовая клетка. Например, при остром эритромие-

лозе наблюдается мегалобластность лейкозных клеток, даже у взрослого, хотя мегалобластное кроветворение свойственно плоду; при эритромии БОЕ-Э незрелая повышено чувствительна к эритропоэтину, подобно этой клетке-предшественнице у плода, в то время как у здоровых взрослых она к эритропоэтину не чувствительна; при хроническом миелолейкозе лейкозные клетки имеют высокий удельный вес, как миелоидные клетки у плода. Строго говоря, возникновение опухоли из эмбриональных тканей, клеток не представляет собой ничего нового в онкологии. Обнаружение окончательной дифференцировки стволовых клеток подкрепляет предположение о существовании возрастных пластов: речь идет о нормальном процессе кроветворения, но качественном различии стволовых клеток, пускающихся в дифференцировку в разные периоды жизни организма. Биологического парадокса здесь нет: вся динамика развития демонстрирует смену дифференцирующих тканей, хотя это хорошо изучено преимущественно для систем, связанных с железами внутренней секреции.

Во всяком случае, ранее совершенно необъяснимое грубейшее различие морфологической и функциональной характеристики эритроцитов новорожденного и плода, новорожденного и взрослого (рис. 17) теперь становится понят-

ным: эти качественно неодинаковые клетки - потомство разных стволовых клеток.

Вместе с тем, описываемая гипотеза не исключает роли клеток кроветворного микроокружения в реализации качественных различий

кроветворения разных периодов жизни; возможно, что именно клетки стромы выступают как индукторы и определяют выбор стволовых элементов, направляющихся в дифференцировку.

КОСТНЫЙ МОЗГ, КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ

Костный мозг содержит две разновеликие группы клеток: клетки ретикулярной стромы, составляющие меньшинство, и клетки кроветворной ткани (паренхимы) костного мозга с их производными - зрелыми клетками крови.

К клеточным элементам ретикулярной стромы относят фибробласты, остеобласты, жировые клетки, эндотелиальные клетки (рис. 18, см. цвет. вклейку).

Фибробласты в гистологическом препарате имеют округлое или вытянутое ядро с плотной или разреженной структурой хроматина, отростчатую цитоплазму. В цитологическом препарате - мазке костного мозга - идентифицировать фибробласт невозможно, хотя, если исходить из результатов культуральных исследований, эти клетки могут быть похожи на лимфоидные. В мазке фибробласты теряют отростчатую цитоплазму. В культуре клеток ядро фибробластов обычно круглое с правильной грубоватой структурой хроматина и ядрышком. Фибробласты с компактными ядрами без видимых ядрышек называют фиброцитами.

Жировые клетки в мазке костного мозга обычно разрушаются при его приготовлении, их цитоплазма растворяется при фиксации препарата в метаноле. В гистологическом препарате (после формалиновой фиксации) жировые клетки видны хорошо.

Ядро жировых клеток небольшое (как у малого лимфоцита), располагается, как правило, эксцентрично. Цитоплазма широкая, бесцветная ("пустая"). Присутствие в клетке жира определяется при специальной окраске, например, суданом красным.

Эндотелиальные клетки образуют внутреннюю выстилку сосудов. В мазке костного мозга они также неопределимы (могут быть похожи на большие лимфоциты). В гистологическом препарате эндотелиальные клетки имеют вытянутое ядро и широкую беззернистую цитоплазму.

Остеобласты участвуют в костеобразовании. Диаметр клетки достигает 20-25 мкм, форма продолговатая или неправильная. Ядро круглое или овальное, обычно располагается эксцентрично, содержит мелкое ядрышко. Цитоплазма окрашена в базофильные тона: от серо-голубого

до нежно-синего с фиолетовым оттенком. Остеобласты отдаленно напоминают плазматические клетки. Остеобласты выстилают костномозговые полости, образуя эндостальную поверхность и разграничивая костный мозг и кость. Образуя вокруг себя кость, остеобласт оказывается в нее замурован. На этом этапе остеобласт превращается в остеоцит.

Все описанные клетки относятся к собирательному понятию *ретикулярных*. Однако в недалеком прошлом к ретикулярным клеткам относили и плазматические клетки, и макрофаги, и крупные с грубой, но правильной структурой хроматина и синими ядрышками клетки эритробластических островков, которые обычно содержат скудную азурофильную зернистость; эти клетки относятся к макрофагальным элементам, однако собственного названия не имеют. Они участвуют в транспорте железа в эритрокариоциты. При подсчете миелограммы обычно выделяют ретикулярные клетки, к которым относятся все клеточные элементы без места в рядах кроветворения. В ретикулярные клетки попадают упомянутые клетки - донаторы железа (их процент может быть достаточно высоким при гемолитических анемиях), трудно идентифицируемые клетки стромы, редкие в костном мозге иммунобласты и другие неопределяемые клеточные элементы.

Таким образом, в традиционной миелограмме понятие «ретикулярные клетки» (к которым иногда относят и лимфоидные элементы с пикнотичными ядрами, и полуразрушенные промиелоциты - «клетки Феррата») означает смесь кроветворных и стромальных элементов, лишенных точной морфологической характеристики. Для нормальной миелограммы, где доля этих клеток не превышает 2%, их идентификация не имеет принципиального значения. В патологии, прежде всего при острых лейкозах, в миелограмме может присутствовать очень большой процент клеток, которые в силу опухолевого атипизма идентифицировать не удастся. Однако именно эти клетки имеют диагностическое значение. Такие атипичные «ретикулярные» клетки, когда их процент превышает норму (более 2%), нуждаются в точном морфологическом описа-

нии, и их следует относить не к ретикулярным, а к атипичным. Их важнейшей особенностью является структурная однородность и по строению ядра и по структуре цитоплазмы.

Клетки паренхимы костного мозга

Миелобласты - родоначальные клетки соответствующего зернистого ряда: нейтрофильного, эозинофильного или базофильного. В нормальном костном мозге эозинофильные и базофильные миелобласты обычно не видны. Базофильные миелобласты встречаются при хроническом миелолейкозе с высоким содержанием зрелых базофилов в крови. Эозинофильные миелобласты изредка можно встретить при высоких реактивных эозинофилиях.

Структура ядра миелобластов всех 3 типов одинакова. Ядро миелобласта чаще всего округлое, характеризуется равномерностью калибра и окраски нитей хроматина [Крюков А.Н., 1946]. Размеры клеток достигают 15-20 мкм. В ядре отчетливо видны 2-5 ядрышек. У всех миелобластов соотношение ядра и цитоплазмы существенно смещено в пользу ядра, цитоплазма обычно лишь узким ободком окружает ядро (см. рис. 18.). Цитоплазма базофильная. У базофильного миелобласта цитоплазма содержит обильную крупную, почти черную зернистость, зерна очень полиморфны. Напротив, у эозинофильного миелобласта зернистость представлена одинаковыми элементами, напоминающими кетовую икру, хотя цвет этих зерен, в отличие от зрелых эозинофилов, не красный, а фиолетовый, коричневатый. Зернистость эозинофильных миелобластов заполняет всю цитоплазму, накладываясь также на ядро клетки. Цитоплазма нейтрофильного миелобласта содержит небольшое количество мелкой зернистости, которая дает положительную реакцию на пероксидазу.

Промиелоцит нейтрофильный отличается от миелобласта более крупными размерами - до 25 мкм, а иногда и более. Этой клетке свойственна некоторая вариабельность, но она самая крупная среди гранулоцитов. Ядро промиелоцита сохраняет остатки нежной структуры, но без равномерности окраски и калибра нитей хроматина; в нем можно видеть ядрышки. Цитоплазма промиелоцита базофильная, но с богатой зернистостью (самая зернистая клетка среди всех клеток гранулоцитарного ростка). Ядра лишены нежной хроматиновой сети. Часто она грубоватая. Форма ядра, как правило, овальная, бобовидная; ядро обычно расположено эксцентрично. Цитоплазма охватывает ядро значительно более широким поясом, чем у миелобласта. У промиелоцита ядро по площади больше цитоплазмы. Различна степень базофилии цито-

плазмы, иногда приближающейся к розовой, что свойственно уже миелоциту. Зернистость нейтрофильного промиелоцита весьма разнообразна, обычно богатая, красно-фиолетового, фиолетово-синего, темно-сине-красного и синего цвета.

Миелоциты нейтрофильные принято делить на крупные материнские (незрелые) миелоциты, достигающие в диаметре 14-16 мкм, и дочерние - зрелые, меньших размеров, которые возникают из материнских. В зернистом (гранулоцитарном) ряду миелоцит является последней клеткой, способной к делению и переходу в следующую по зрелости стадию - метамиелоцит. Начиная с метамиелоцита, клетки теряют способность к делению и, дифференцируясь, переходят в следующую, более зрелую клетку. Считают, что в нормальных условиях только дочерние миелоциты в результате дальнейшей дифференцировки и пролиферации дают следующую генерацию гранулоцитов - палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы (через метамиелоцит).

Ядро материнского миелоцита чаще овальное, у дочернего может быть бобовидным с бухтообразным вдавливанием, реже круглым. Хроматин более грубой структуры с чередованием светлых и темных участков, сетчатое строение его утрачено полностью. Структура ядра зависит от степени зрелости клетки; материнскому миелоциту свойственно более рыхлое строение хроматина, дочерние миелоциты имеют ядра более глыбчатые (см. рис. 18). Ядрышки в миелоцитах неразличимы, их можно обнаружить только при специальной окраске. Цитоплазма миелоцита оксифильная - светло-розовая или светло-фиолетовая. Однако молодые формы миелоцитов - материнские - могут быть светлосиними, что обусловлено базофильной субстанцией. Специфическая зернистость миелоцита (нейтрофильная, эозинофильная, базофильная) хорошо различима, однако она более скудная, чем у промиелоцита. Зернистость нейтрофильного миелоцита мелкая, с розовым или коричневым оттенком; у материнского миелоцита преобладает базофильный компонент, что придает зернистости фиолетовый оттенок. При подсчете миелограммы материнский и дочерний миелоциты объединяют, так как для нормы и патологии их разделение не имеет значения.

Метамиелоцит нейтрофильный. За ним закрепилось название «юный нейтрофил». Эта клетка, так же как палочкоядерный и сегментоядерный нейтрофил, достигает в диаметре 12 - 13 мкм. В патологии все они могут быть значительно крупнее - до 20 - 22 мкм. Ядро метамиелоцита имеет бухтообразное вдавление, придающее ему изогнутую форму (см. рис. 18). Хроматин ядра метамиелоцита весьма огрубевший. Чередование темных и светлых участков

придает ему глыбчатую структуру. Цитоплазма метамиелоцита широкая, окрашена в нежно-розовый цвет, заполнена мелкой, более скудной, чем у миелоцита, специфической зернистостью. Зернистость нейтрофильного метамиелоцита красится в коричневато-розовые оттенки, поскольку воспринимает как основные, так и кислые краски.

Палочкоядерный нейтрофил - следующая ступень развития клетки нейтрофильного ряда. Его ядро имеет различную форму, часто вытянуто в виде палочки или изогнуто, напоминает подкову (см. рис. 18). От ядра метамиелоцита оно отличается вдвое меньшей толщиной.

Палочкоядерный нейтрофил дифференцируется в сегментоядерный нейтрофил путем расчленения ядра на несколько сегментов, которые связаны между собой тонкими анастомозами. Сегментация ядра хорошо видна и при электронной микроскопии зрелого нейтрофила.

Промиелоцит эозинофильный. В нормальном костном мозге эозинофильный промиелоцит не всегда можно отличить от нейтрофильного промиелоцита (см. рис. 18). При полном сходстве ядерной структуры и том же соотношении ядра и цитоплазмы определить эозинофильную принадлежность промиелоцита можно лишь по характеру зернистости. Для эозинофильного промиелоцита характерна плотно заполняющая цитоплазму крупная равномерная базофильная зернистость, в которой можно обнаружить отдельные зерна с эозинофильной окраской.

Миелоцит эозинофильный. Его ядро неотличимо по структуре от ядра нейтрофильного миелоцита. Специфична зернистость: она густо заполняет цитоплазму и имеет желто-красноватый цвет (см. рис. 18). Часть зерен, оставаясь недозревшими, имеют базофильный компонент, и это придает им коричневатый оттенок. Нередко так выглядит вся зернистость эозинофильной клетки, особенно часто при лейкозах.

Метамиелоцит эозинофильный. По очертаниям ядра, подобного ядру нейтрофильного метамиелоцита, и специфической эозинофильной зернистости легко определить эту клетку (см. рис. 18). Затруднения возникают тогда, когда густая зернистость перекрывает также и ядро, очертания которого ступенчатые; при этом клетку можно принять за палочкоядерный эозинофил.

Палочкоядерный эозинофил, подобно нейтрофильному, имеет ядро, изогнутое подковообразно или в виде иной фигуры (см. рис. 18).

Ядро *сегментоядерного эозинофила* обычно имеет только 2 сегмента, как видно на электрограмме (см. рис. 18), их число увеличивается при высоких эозинофилиях.

Промиелоцит базофильный может быть дифференцирован, если удастся определить зернистость, присущую базофильному ряду гранулоцитов. Преобладание крупной полиморфной базофильной зернистости среди других цветовых оттенков помогает отнести промиелоцит к базофильному ряду (см. рис. 18).

В цитоплазме базофилов часто видна розового цвета волокнистая структурность, на которую накладываются черные, неправильной формы и разной величины гранулы. При хроническом миелолейкозе зернистость может быть очень скудной, 1-2 зерна, но петли розовой вуали, связанной с ядром, позволяют выделить эту клетку как базофил.

Миелоцит базофильный. Эта клетка, как и той же зрелости другие клетки гранулоцитарного ряда, первой в ряду дифференцировки приобретает специфическую зернистость. Крупная базофильная зернистость, как правило, негусто заполняет цитоплазму. По структурным чертам ядра, характерным для миелоцитов всех 3 гранулоцитарных рядов, легко распознать базофильный миелоцит. По тому же признаку - особенностям структуры ядра - определяются *метамиелоцит, палочкоядерный и сегментоядерный базофилы*. Структурные черты ядер базофилов обычно бывают неразличимы из-за крупной зернистости, если она сравнительно густо заполняет цитоплазму и накладывается на ядро (см. рис. 18). Ядра зрелых базофилов имеют несколько расплывчатые контуры, 3-4-лопастное строение. Как и у всех клеток гранулоцитарного ряда, диаметр базофила в норме не превышает 12-13 мкм.

Тучные тканевые клетки встречаются в костном мозге, но чаще в пунктатах лимфатических узлов и селезенки. Тучные тканевые клетки имеют характерную красно-фиолетовую зернистость в отличие от темно-синей зернистости базофилов. Зернистость тучных клеток отличается обильным и густым расположением в цитоплазме. Они имеют округлое или овальное ядро с довольно широкой цитоплазмой (хотя иногда границы ядра и незаметны из-за зернистости). Функцию тучных клеток в последние годы уточнили: они участвуют в реакциях на глистную инвазию и аллергических реакциях. Гранулы тучных клеток содержат гистамин и серотонин.

Монобласт является первой клеткой моноцитарного ряда. Его не всегда можно отличить от миелобласта и лимфобласта. Как и они, монобласт имеет ядро нежной структуры, содержащее 2-4 ядрышка; цитоплазма нежно-голубая. Если ядро монобласта бобовидное или имеет неправильные волнистые очертания, то определить природу клетки нетрудно (см. рис. 18).

Промоноцит. Через стадию промоноцита развивается зрелая клетка этого ряда. Его ядро отличается более грубой структурой хроматина, ядрышек не видно (см. рис. 18). В нежно-базофильной цитоплазме можно видеть мелкую пылевидную азурофильную зернистость.

Моноцит. В процессе дифференцировки промоноцита в моноцит ядро приобретает бухтообразное вдавление и волнистость краев цитоплазмы, что видно как в световом, так и в электронном микроскопе (см. рис. 18). Ядро моноцита может принимать самые причудливые формы, вплоть до сегментации. Цитоплазма, насыщенная пылевидной азурофильной зернистостью, имеет своеобразный базофильный оттенок. Размеры клеток моноцитарного ряда колеблются от 12 до 20 мкм.

Макрофаги отличаются большими размерами. Ядро сравнительно небольшое, округлое или слегка овальное, имеет сетчато-петлистую, иногда - гранулированную, структуру хроматина. В нем различимо одно, реже два ядрышка. Широкая цитоплазма имеет неправильные границы, красится в светло-голубые, серо-голубые тона. Макрофаги содержат в цитоплазме включения в виде клеточных обломков, эритроцитов, пигмента, жировых капель, иногда бактерий (см. рис. 18).

Липофаги встречаются при ксантоматозах, диабете, липидемии. Диаметр клеток достигает 40 мкм, строение цитоплазмы ячеистое, обусловленное обильным содержанием липидных капель. При обычной окраске с фиксацией в спирте ячеистость представляется в виде округлых пустот («соты») различных размеров. Липидная основа хорошо воспринимает судан черный. Ядро липофага часто оттеснено и деформировано.

Остеокласты относятся к макрофагам. Во взрослом организме их появление связано с процессами рассасывания костной ткани. Они обнаруживаются при опухолевых процессах, на местах переломов костей и т.д. Остеокласты - гигантские клетки, их диаметр достигает 40-80 мкм, с большим числом ядер (см. рис. 18). Число ядер, как и размеры клетки, подвержено большим колебаниям. По морфологическим признакам остеокласт трудно спутать с иной гигантской клеткой; они похожи на гигантские клетки инородных тел, с которыми имеют генетическое родство. Ядра остеокласта группируются в виде скоплений или располагаются равномерно в цитоплазме. Диаметр ядер достигает 10-12 мкм, хроматиновая сеть образует нежное сплетение. В ядрах можно видеть одиночное маленькое ядрышко. Цитоплазма окрашивается в нежные базофильные тона, иногда имеет пылевидную азурофильную зернистость.

Эритробласт является первой морфологически определяемой клеткой эритроидного роста. Ядро эритробласта округлое и, как все материнские клетки, имеет нежную сетчатую структуру и 2-4 ядрышка (см. рис. 18). Цитоплазма ярко-базофильная без просветления вокруг ядра. По морфологическим признакам эритробласт легко распознать. Его диаметр 16-20 мкм. По мере созревания эритрокариоцитов, начиная от эритробласта, размеры ядра и клетки в целом уменьшаются.

Пронормоцит. Подобно эритробласту, эта клетка имеет четко очерченное округлое ядро и резко базофильную цитоплазму с легким перинуклеарным просветлением (см. рис. 18). Чуть более грубая структура ядра, меньше, чем у эритробласта, размеры и отсутствие ядрышек обычно позволяют отличить пронормоцит от эритробласта. Для патологии эти отличия не имеют значения.

Следующим клеточным звеном в эритроидном ряду являются *нормоциты*. В зависимости от насыщения гемоглобином нормоциты делятся на *базофильные*, *полихроматофильные* и *оксифильные*, или ортохромные (см. рис. 18). Гемоглобин накапливается в цитоплазме при участии ядра. Об этом свидетельствует и то, что вначале гемоглобин появляется вокруг ядра в перинуклеарной зоне. Постоянное накопление гемоглобина в цитоплазме определяет *полихроматофильный нормоцит*, воспринимающий и кислые, и основные краски. При полном насыщении клетки гемоглобином цитоплазма при окраске становится оксифильной и окрашивается в розовый тон; такую клетку называют *оксифильным нормоцитом* (см. рис. 18).

С началом гемоглобинизации цитоплазмы происходит инволюция ядра. Уже в стадии пронормоцита вследствие перегруппировки хроматиновых нитей ядрышко перестает быть видимым. У нормоцитов ядро приобретает грубую радиарную (колесовидную) структуру. У оксифильного нормоцита ядро уже грубое, пикнотическое («вишневая косточка»). В этой стадии клетка лишается ядра и превращается в *эритроцит*.

При многих формах анемий в кровь в большом количестве поступают незрелые полихроматофильные эритроциты, содержащие базофильную субстанцию. Она выявляется при окраске бриллиантовым крезиловым синим в то только что вышедших из костного мозга зрелых эритроцитах - *ретикулоцитах*. До выхода в периферию эритроциты 2-4 дня задерживаются в костном мозге; после циркуляции в крови до 2 суток они окончательно теряют ретикулум и превращаются в зрелый эритроцит. Весь цикл развития от эритробласта до ортохромного нормоцита и эритроцита занимает более 100 часов.

Мегакариоциты - гигантские клетки костного мозга, достигают 60-120 мкм. Ядро полиморфное, состоит из фрагментов причудливой формы (см. рис. 18). Большая цитоплазма богата азурофильной зернистостью, исходной для развития тромбоцитов. В нормальном костном мозге можно видеть образование и отхождение тромбоцитов от цитоплазмы мегакариоцита. Выделяют незернистые, зернистые и обильнозернистые мегакариоциты.

Для мегакариоцита материнской клеткой служит *мегакариобласт*. Его ядро около 8-10 мкм в диаметре; отличается чертами молодости, но хроматиновая сеть имеет хотя и правильную, но более грубую структуру, чем у других бластных клеток. В ядре видны ядрышки (см. рис. 18). Цитоплазма очень базофильная, оторостчатая, окружает ядро небольшим пояском и не содержит зернистости. Мегакариобласт через стадию промегакариоцита переходит в мегакариоцит.

Промегакариоцит значительно больше мегакариобласта. Цитоплазма может заметно преобладать над ядром. Ядро более грубой структуры, его очертания неровные (см. рис. 18). Ядрышек в ядре нет. Выделение этой клетки условно; в патологии она может давать тромбоциты.

Тромбоциты, или кровяные пластинки, не являются полноценными клетками. Они появляются в результате расщепления (фрагментации) цитоплазмы мегакариоцитов. Только у низших позвоночных они имеют отчетливо организованные элементы - ядра и цитоплазму. Их диаметр 2-4 мкм, они имеют центральную зону - грануломер, окрашивающуюся в фиолетово-красные тона, и периферическую часть - гиаломер, имеющую, как и цитоплазма, базофильный цвет. Различают юные, зрелые и старые тромбоциты.

В отличие от юных, имеющих расплывчатые контуры, зрелые тромбоциты округлой формы с отчетливыми границами гиаломера и хорошо выраженным грануломером. Старые формы меньших размеров как бы сморщены.

Цитологическое исследование костного мозга играет большую роль в диагностике заболеваний кроветворной системы. Изучению костного мозга в микроскопе с иммерсионной системой должен предшествовать просмотр препарата при малом увеличении. Это позволяет установить, в какой мере пунктат богат клеточными элементами, определить состояние мегакариоцитарного аппарата, хорошо различимого при малом увеличении, обнаружить скопление клеток, подозрительных на опухолевые, и пр.

Определение процентного клеточного состава костного мозга требует подсчета не менее 400 клеток. Более принятой методикой является подсчет 500 миелокариоцитов, однако, следует подчеркнуть, что подсчет большого количества клеток костного мозга необходим для подтвер-

ждения ремиссии острого лейкоза, когда необходимо убедиться в том, что процент бластов не выходит за пределы 5, а процент лимфоидных не превышает 30. При высоком бластозе в костном мозге, составляющем 50-60 и более процентов, нет смысла тратить много времени на детальный количественный анализ клеточного состава - можно вполне ограничиться его качественным анализом с указанием приблизительного количества бластных клеток, сделав упор на их характеристику, описание зернистости, ядерного полиморфизма, нитчатости структуры хроматина, у всех клеток или у некоторых, дать характеристику извилин, разнообразие размеров ядер и цитоплазмы бластных клеток. Все эти признаки в процессе лечения могут претерпевать изменения, которые будут характеризовать ответ на терапию.

Для начинающегося рецидива острого лейкоза характерно не просто увеличение процента бластов, а появление клеток с нитчатым ядром, неправильной формы ядрышком бластных клеток, имеющих между собой общие структурные особенности и ядер и цитоплазмы. К сожалению, этих признаков сплошь и рядом бывает недостаточно для подтверждения рецидива, и исследование приходится повторять через 2-3 недели. Увеличение процента именно этих структурно одинаковых бластных клеток, иммунофенотипически идентичных данному лейкозу, с несомненностью будет говорить о рецидиве.

При подсчете миелограммы очень важно обращать внимание на разбавленность пунктата кровью и указывать это. При наличии лишь 1-2 миелокариоцитов в поле зрения подсчет миелограммы не очень надежно отражает клеточный состав костного мозга. При фиброзе костного мозга, даже незначительном, сопровождающем тот или иной лейкоз, пунктат сплошь и рядом бывает очень и очень малоклеточным. В случае фиброза, представление о клеточном составе костного мозга (а оно может играть решающее диагностическое значение) можно получить при приготовлении мазка из раздробленного кусочка трепаната костного мозга.

Состав костного мозга подвержен колебаниям (см. раздел «Гематологическая норма»). Для подсчета мегакариоцитов и определения клеточности костного мозга необходимо считать пунктат в камере Горяева, как считают лейкоциты.

Лейкоэритробластическое соотношение определяет отношение элементов белого и эритробластического ряда. У здоровых лиц оно равно 4 (3):1. У функционально полноценного костного мозга бывает тем больше увеличение клеток эритроидного ряда, чем больше выражена анемия по показателям периферической крови [Гольдберг Д.Н. и др., 1973].

Костномозговым индексом созревания нейтрофилов обозначают отношение молодых гра-

нулоцитарных элементов к зрелым нейтрофилам:

промиелоциты+миелоциты+метамиелоциты
палочкоядерные+сегментоядерные

Это соотношение называют индексом созревания нейтрофилов, оно в норме равно 0,6-0,8.

Индекс созревания эритробластов (из-за малой информативности его почти не используют)

выражает отношение числа гемоглобинизированных форм эритрокариоцитов к числу всех клеток эритроидного ростка:

полихроматофильные+оксифильные нормоциты
эритробласты+ пронормоциты+ нормоциты
(базофильные+ полихроматофильные+ оксифильные)

Это соотношение называют индексом созревания эритробластов - оно в норме составляет 0,8-0,9. Оба описанных индекса в последнее время практически не используются.

В условиях патологии, напряжения эритропоэза (реактивные состояния в ответ на кровопотерю, повышенный гемолиз) в периферическую кровь кроме большого числа ретикулоцитов поступают и незрелые эритроидные предшественники - нормоциты, эритроциты с остатками ядерных образований, полихроматофилы.

Общая характеристика нормальных клеток лимфатического ряда

Среди нормальных клеток лимфатического ряда, присутствующих в мазках крови, костного мозга, а также в отпечатках или мазках из пунктатов лимфоузлов и селезенки выделяют лимфобласты, пролимфоциты и лимфоциты. Перечисленные клетки различаются строго формальными признаками строения ядерного хроматина. Наличие зерен в цитоплазме позволяет отнести их к Т-клеточной популяции, однако отсутствием В-клеточной природы клетки, поскольку сплошь и рядом иммунохимически верифицированные Т-лимфоциты зернистости лишены. Более подробная характеристика перечисленных типов клеток приводится в разделе, посвященном опухолям лимфатической системы.

Родоначальной клеткой лимфатического ряда является *лимфобласт*, достигающий в диаметре 15 мкм и более. Ядро клетки округлое, реже слегка овальное; хроматин образует нежную сетку (см. рис. 18). В ядре обычно содержится 1 - 2 ядрышка. Цитоплазма нежно-базофильная, с перинуклеарной зоной просветления. Отличить лимфобласты от миелобластов можно цитохимически.

Пролимфоцит. Легко отличать пролимфоцит от лимфобласта позволяют меньшие размеры, груборыхлая структура ядра и относительно более широкая цитоплазма. Иногда в ядре отчет-

ливо видно ядрышко (см. рис. 18). В нежно-базофильной цитоплазме пролимфоцита, так же как и у зрелого лимфоцита, может содержаться скудная азурофильная зернистость (Т-пролимфоцит).

Лимфоцит. В прошлые годы эта мононуклеарная клетка считалась представительницей множества классов различных по своим "обязанностям" клеточных элементов системы крови. Ядро лимфоцита в световом микроскопе округлое, иногда с бобовидным вдавливанием, структура его грубоглыбчатая. При электронной микроскопии контуры ядер неправильные. Цитоплазма окружает ядро неравномерно и иногда едва заметна (см. рис. 18). Встречаются лимфоциты с более широкой цитоплазмой. Диаметр лимфоцита обычно 8-9 мкм. Широкоплазменные лимфоциты достигают 12-15 мкм в диаметре (см. рис. 18).

В патологии - реактивной и опухолевой - встречаются, иногда составляя большинство, иные морфологические формы лимфоцитов. Их характеристика будет дана в разделе, посвященной опухолям лимфатической системы.

Из В-лимфоцитов развиваются плазматические клетки или плазмоциты, в том или ином количестве всегда присутствующие в стерильном пунктате. Наиболее ранней стадией развития плазмоцита является *плазмобласт*. В костном мозге плазмобласты обнаруживают лишь изредка. Их диаметр достигает 16-20 мкм. Ядро занимает большую часть клетки, ему свойственны все признаки молодости - нежная структура хроматина и наличие ядрышек (см. рис. 18). Цитоплазма интенсивно базофильная с зоной перинуклеарного просветления. Следующая стадия развития плазмоцита - *проплазмоцит*, характеризующийся эксцентрично расположенным ядром, в котором не всегда можно обнаружить ядрышко; хроматиновая сеть клетки рыхлая, может иметь характерную колесовидную структуру (см. рис. 18). Цитоплазма проплазмоцитов не всегда несет черты клеток этого ряда: пери-

нуклеарная зона просветления может отсутствовать, окраска цитоплазмы бывает не интенсивно синей, как обычно, а с сероватым оттенком.

Конечная стадия дифференцировки В-лимфоцитов - *плазмоцит*. Эта клетка характеризуется следующими специфическими чертами:

ядро пикнотическое, колесовидной структуры, как правило, расположено эксцентрично. Цитоплазма интенсивно базофильная с просветлением вокруг ядра, часто ячеистая, возможен класматоз (процесс отделения частиц цитоплазмы в периферических ее отделах) (см. рис. 18).

ПУНКЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА

Пункция органов требует соблюдения правил асептики. Многоразовые пункционные иглы и шприцы с хорошо притертыми поршнями стерилизуют сухим методом или кипячением в течение не менее 40 мин. В последнем случае горячий шприц с насаженной пункционной иглой тщательно обезвоживают промыванием 96° спиртом, а затем эфиром. Перед стерилизацией необходимо убедиться, что шприц подходит по разьему к пункционной игле (системы Луер, Рекорд), плотно насаживается на пункционную иглу и что в системе поршнем создается достаточный вакуум.

Пункция костного мозга относится к амбулаторным процедурам. Описаны различные способы получения костного мозга, но все они уступают методу, предложенному в 1927 г. М.И. Аринкиным. Сравнительно сложные методы были заменены технически простой и легкодоступной пункцией грудины. Грудину прокалывают иглой Кассирского. Вместо грудины можно прокалывать гребень подвздошной кости (чаще - заднюю ость).

Место прокола смазывают раствором йода или другим антисептиком и протирают спиртом. Пункцию грудины делают на уровне третьего - четвертого межреберья или пунктируют рукоятку грудины. Больного укладывают ровно на спину, желательно на твердую кушетку. Ощупывают грудину. Через 2-3 мин после анестезии (лимонная корочка, поднадкостничное введение 1-2 мл новокаина) вводят иглу строго перпендикулярно поверхности грудины. Игла вводится быстрым вращательно-поступательным движением по средней линии в костномозговую полость. При введении иглы большим и средним пальцами свободной рукой желательнее обозначать края грудины на уровне прокола. После пункции необходимо убедиться, что игла неподвижно находится в кости.

При непереносимости анестетиков стерильную пункцию можно проводить без анестезии.

После извлечения мандрена на иглу насаживают 10-20-миллилитровый шприц. При аспирации, даже после анестезии, пациент испытывает кратковременную боль (косвенный признак

удачного прокола). Во избежание большой примеси крови к костному мозгу в шприц необходимо набирать как можно меньше материала (несколько капель). Тракцию поршня прекращают сразу после появления у пациента боли.

Соблюдение этих правил обеспечивает полную безопасность пункции грудины (табл. 2).

Иногда после 1-2 тракций поршня, создающих разрежение в системе, не возникает болевой реакции и в просвете шприца не появляется костномозговая взвесь. Такая ситуация бывает у пожилых больных, при миелофиброзе. В этом случае, аккуратно поворачивая, описывают круг рукояткой иглы, находящейся в грудине, и, вынимая иглу, постоянно создают в шприце отрицательное давление. Это позволяет получить достаточное для исследования количество костномозговых элементов.

Таблица 2

Ориентировочная длина иглы для установки щитка ограничителя, мм (по М.Г. Абрамову)

Возраст, годы	Истощенные больные	Больные со средней упитанностью	Больные с хорошей упитанностью
До 3	2-3	3-4	4-5
От 4 до 5	3-4	4-5	5-6
От 6 до 10	5-6	6-7	7-8
От 11 до 14	7-8	8-9	9-10
От 15 до 17	9-10	10-11	11-12
Старше 17	10-11	11-12	12-13

Сразу после извлечения иглы полученное содержимое шприцем выдавливают на предметное стекло. Костный мозг, как правило, содержит жировые элементы, хорошо заметные глазом. Отсутствие жира характерно для лейкозов или для сильного разбавления костномозговой взвеси кровью. Из полученной капли готовят мазки костного мозга. Для этого уголок шлифованного стекла опускают в каплю и переносят на предметное стекло, по которому делается мазок.

Наряду с наиболее распространенным у нас способом приготовления мазка из пунктата костного мозга (капелька, нанесенная на предметное стекло, растягивается вначале по краю шлифо-

ванного стекла наклоненного под углом, примерно, в 30° , а затем, увлекаемая вслед шлифованным стеклом, размазывается по длине предметного стекла, как это делается при приготовлении мазка крови) существуют и другие способы, дающие несколько иную информацию о составе пунктата. Можно делать мазок костного мозга с помощью тонкой деревянной палочки, которая размазывает по предметному стеклу только крошки пунктата, содержащие больше клеток, чем пунктат в целом, значительно разбавленный кровью. Однако такой мазок из крошки, имея большую клеточность, имеет и большую толщину, что мешает хорошей оценке клеточной структуры. При апластических анемиях такой мазок может быть удобен.

Другой способ заключается в нанесении небольшой капли костного мозга на шлифованное стекло, которое покрывается также шлифованным стеклом. Костный мозг между стеклами равномерно растекается, после чего стекла растягиваются в разные стороны. В результате получаются равномерные тонкие мазки костного мозга, существенно лучше сохраняющие исходную структуру, чем обычный мазок (можно видеть эритробластические островки, крупные лимфоидные скопления и др.). Целесообразно использовать разные способы приготовления мазков в одном и том же случае.

Пункция лимфатических узлов производится с помощью 10-миллилитрового шприца. Процедура в подавляющем большинстве случаев носит амбулаторный характер. Перед пункцией необходимо проверить плотность прилегания поршня и проходимость иглы. Проколу предшествует тщательное пальпаторное исследование лимфатического узла, намеченного для прокола. При подкожном расположении небольшого лимфатического узла его иногда должен фиксировать ассистент (например, при пункции легко ускользающих из-под пальцев лимфатических узлов в подмышечной впадине).

Диаметр и длина иглы зависят от величины узла и глубины его залегания в тканях. Опыт показывает, что для исследования достаточно минимального объема пунктата в просвете иглы, поэтому часто используют тонкие иглы. При проколах мелких лимфатических или иных (метастатических) узлов производят несколько колебательных и вращательных движений иглой, надетой на шприц. При этом пальцами левой руки, фиксирующими узел, исследователь ощущает смещение узла при движении кончика иглы. Эта манипуляция - легкое разминание паренхимы узла - одновременно обеспечивает и получение необходимого количества пунктата.

После нескольких насасывательных движений поршня иглу извлекают; предварительно ее следует разъединить со шприцем. В противном

случае возможно насасывание пунктата из просвета иглы в шприц, что исключает перенесение материала на предметное стекло для приготовления мазков.

Оптимальным методом исследования является биопсия лимфоузла, обычно выполняемая амбулаторно. При этом обязательно приготовление мазка-отпечатка из удаленного и разрезанного лимфоузла. В результате удается получить два препарата - цитологический и гистологический, что значительно повышает точность диагностики (а нередко такое сравнение - единственный способ провести дифференциальную диагностику) при большинстве лимфопролиферативных и реактивных заболеваниях. Отпечаток удаленного лимфоузла надо делать не позже получаса после операции.

Пункция селезенки. Используют 2-5-миллилитровые шприцы и хорошо заточенные (без зазубрин) иглы (предпочтительно одноразовые). Пункцию проводят в палате с предварительным тщательным пальпаторным или ультразвуковым исследованием селезенки. Нередко за селезенку принимают опухоль левой почки, желудка и даже кисту поджелудочной железы. Описаны случаи, когда за селезенку принимали ретроперитонеальную саркому, а также пораженную патологическим процессом левую долю печени.

Больного следует проинструктировать о спокойном поведении в момент прокола, предупредить о необходимости задержать на несколько секунд дыхание на высоте вдоха. Кроме того, для предотвращения разрыва с больным проводят «репетицию» пункции, надавливая на место будущей пункции пальцем, имитирующим иглу. Пункцию селезенки проводят без анестезии.

После обработки кожи спиртом и йодом, нащупав левой рукой край увеличенной селезенки, правой рукой производят через брюшную стенку прокол в заранее намеченное место. Иглу вводят на глубину 4-6 см в зависимости от толщины брюшной стенки. Сделав 1-2 насасывающих движения, иглу, быстро разъединив со шприцем, извлекают из органа.

При небольшом увеличении селезенки лучше производить межреберную пункцию, т.е. сделать прокол в десятом межреберье по левой средней подмышечной линии, предварительно тщательно проверив зону притупления перкуторного звука.

При пункции селезенки и других внутренних органов необходимо соблюдение следующих правил:

- 1) игла должна быть возможно более тонкой и острой;
- 2) процедура должна быть быстрой - не более нескольких секунд;
- 3) иглу вводят под кожу, а затем - при задержке дыхания - в селезенку;

4) после пункции больной должен находиться в постели несколько часов (до суток). После прокола необходимо положить на живот пузырь со льдом.

Пункция не должна проводиться при глубокой тромбоцитопении и нарушениях гемостаза, когда имеется опасность кровотечения. Редким осложнением является разрыв селезенки, связанный с движением пациента во время пункции (например – вдох). Поэтому недопустимо проводить пункцию селезенки в амбулаторных условиях и в стационарах без хирургического отделения. Желательно согласовать с хирургами время пункции, чтобы была возможность, в случае необходимости (разрыв селезенки), экстренной спленэктомии.

Пункция печени технически сходна с пункцией селезенки. При диффузном процессе возможен прокол в любом месте органа, при очаговом – в пальпируемом или визуализированном ультразвуком узле. Тщательная пальпация и предварительная ультразвуковая визуализация необходимы во избежание прокола желчного пузыря. Но если в шприце при аспирации оказалась желчь, то ее надо отсосать полностью, а потом удалить иглу; больного в этом случае необходимо передать под наблюдение хирурга.

Местом прокола печени должно быть девятое – десятое межреберье по средней подмышечной линии, особенно если печень незначительно выступает из подреберья или не пальпируется. Перед проколом необходимо тщательно проверить зону печеночной тупости. Удобно проводить пункцию печени под контролем ультразвука.

Для получения гистологических препаратов печени используется чрескожная пункционная биопсия. Наиболее безопасным представляется использование метода и иглы Менгини, позволяющей произвести аспирацию кусочка ткани органа, а не скусывание, как в других иглах для биопсии.

Важной особенностью иглы Менгини является очень тонкая стенка (90 мкм) и сравнительно

большой просвет. При длине 7 см иглы Менгини имеют диаметр от 1 до 1,6 мм. Они приспособлены к шприцу типа «Рекорд». В просвет иглы вставлен укороченный мандрен – стержень с фиксирующим сплюснутым концом, играющим роль клапана и обеспечивающим целостность полученного биоптата. Конец иглы скошен под тупым углом.

Аспирационную биопсию выполняют у больного, лежащего в постели на спине. Прокол производят в девятом или десятом межреберье ближе к задней аксиллярной линии (необходима предварительная тщательная перкуссия и определение перкуторной тупости на месте прокола). Кожу, подкожную клетчатку и мышцы по ходу предполагаемой пункции иглой Менгини обезболивают 1-2% раствором новокаина. После анестезии прокалывают кожу и подлежащие ткани специальным стилетом, приложенным к набору, доводя стилет до печени.

В приготовленный таким образом «проход» вводят пункционную иглу, насаженную на шприц со стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Нагнетанием раствора обеспечивают проходимость иглы, т. е. исключают попадание в ее просвет элементов кожи и подкожной клетчатки. Когда игла достигает (на ощупь) печени, больного просят задержать дыхание. Иглу быстрым движением вводят в печень с одновременной аспирацией поршнем. В следующую секунду, сохраняя вакуум в шприце, иглу извлекают. Вся манипуляция должна быть тщательно отрабатана.

По извлечении иглы из органа движением поршня и оставшимся в шприце раствором из просвета иглы выталкивают цилиндрический столбик печени длиной 0,5-3 см и погружают его в фиксирующую жидкость.

В последнее время биопсию печени делают с помощью эндоскопических наборов при диагностической лапароскопии.

Методика обработки материала зависит от целей и задач исследования.

ПРИЖИЗНЕННОЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА

В настоящее время биопсия костного мозга стала обязательным методом диагностики в гематологии, т.к. она позволяет прижизненно оценивать тканевые взаимоотношения в костном мозге, выявлять гипоплазию/гиперплазию тех или иных клеточных серий, лейкозные инфильтраты, раковые метастазы и другие атипичные

структуры [Шардаков В.И., Мачульский Л.М., 1981; Капланская И.Б., Хохлова Р.Н., 1982] фиброз [Duhamel et al., 1981], а также диагностировать отдельные виды костной патологии. Необходимое условие – получение достаточного для исследования объема костной и костномозговой ткани в неповрежденном виде.

Методика биопсии костного мозга. Прижизненное гистологическое исследование костного мозга началось работами Rustizki (1872). Первую биопсию кости (большеберцовой) у человека осуществил Ghedini в 1908 г. с помощью электрической дрели-трепана; в 1923 г. Seyfarth под общей анестезией биопсировал грудину (способом открытого доступа). Ghedini, Seyfarth, Waitz описали общую картину биоптатов костного мозга в норме и при некоторых лейкозах. Однако метод открытого (оперативного) доступа к костям весьма усложнял процедуру биопсии. Чрескожная трепанобиопсия грудины (тонкой пункционной иглой) впервые выполнена И.Л. Фраерманом в 1928 г. в СССР.

В 1954 г. Л.М. Мачульский предложил для биопсии костного мозга подвздошной кости полую цилиндрическую фрезу-троакар с 1-3 зубцами на режущем конце, вводимую в кость усилием руки. В 1955 г. М.Г. Абрамов модифицировал этот инструмент (рис. 19) и детально описал методику биопсии костного мозга подвздошной

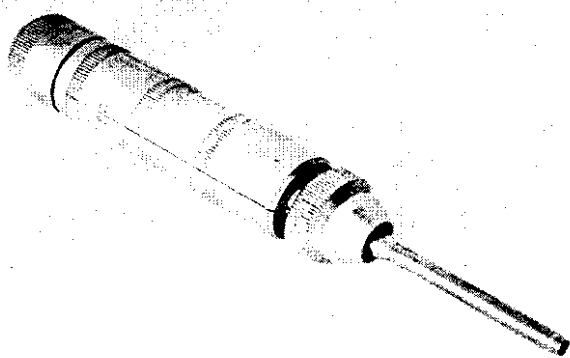


Рис. 19. Игла Мачульского-Абрамова.

кости, названную И.А. Кассирским "трепано-биопсией". Троакар со стилетом автор вводил через верхнюю стенку передней зоны гребня подвздошной кости в плоскости её крыла.

Предложенная методика "передней продольной трепанобиопсии" была сравнительно простой, но не свободной от недостатков: трепанат был слишком мал, и раздроблен, при вырезании фрезой зубом иглы Мачульского-Абрамова возникали костные опилки; нередко биоптат заклинивался в инструменте на микродефектах внутренней стенки и оказывался поврежденным при извлечении из трепана (особенно в случаях остеомиелосклероза); как правило при этом терялась значительная часть жидкого костного мозга и неизбежно появлялись артефакты: зоны кажущегося опустошения/гиперплазии, обломки костных балок, окруженные выпавшим фибрином в виде волокон или бесструктурных белковых масс, имитирующих отек/плазморрагию.

При недостаточном опыте эти артефакты можно было принять за грубоволокнистую костную ткань, миелофиброз, очаги ложной гипоплазии/гиперплазии костного мозга. Иногда трепан после извлечения из кости вообще оказывался пустым (ввиду "слепого" метода проведения). Нередко трепанобиопсию приходилось повторять из-за невозможности объективно оценить состояние костной и кроветворной ткани. Существенные недостатки иглы Мачульского-Абрамова и других упомянутых инструментов приводили к неудовлетворительному качеству биопсийного материала, и трепанобиопсию приходилось неоднократно повторять. Но даже в относительно сохранных трепанатах, взятых этим способом, отмечался весьма массивный кортикальный слой, а в прилежащих к нему суженных синусах костный мозг был гипопластичен, особенно у пожилых; нередко жировая ткань составляла 80-90%. При поверхностном взятии материала также могло сложиться ложное впечатление о гипоплазии костного мозга.

Предлагались многочисленные модификации инструментов и методики биопсии костного мозга [Ершов В.И., Климов Н.П., 1966; Лаврик С.С. и др., 1971; Светличный И.С., 1981; Notter, Labhart, 1953; Bartelheimer, Schmitt-Rohde, 1957; Stheglitz, Stobbe, 1967; Duhamel et al., 1973], которые однако не позволяли полностью исключить указанные недостатки метода.

В 1969 г. А.Н. Смирновым и А.Е. Барановым был предложен¹ трепан с разборной режущей частью (без мандрена) и использован метод поперечной (сквозной) трепанобиопсии гребня подвздошной кости в зоне передневерхней ости (рис. 20). В 1970 г. А.Н. Смирновым предложен² и внедрен в клиническую практику трепан с переменным внутренним диаметром на базе иглы ЦИЭМ. Трепан сходной конструкции был

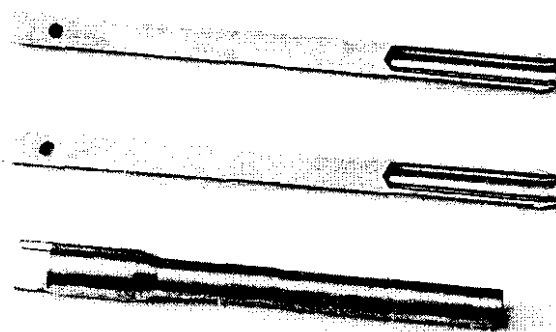


Рис. 20. Трепан с разборной режущей частью.

¹ Авторское свидетельство N 300180 от 12.01.70 г. (соавт. - Разин В.С., Мильдзихов И.В.).

² Смирнов А.Н. - Рац. предложение N 79 от 22.09.71 г., ИБФ МЗ СССР.

опубликован за рубежом несколько позже [Jamshidi K. et al., 1971]. В 1992 г. предложен трепан ТС-92 с переменным внутренним сечением режущей части и мандреном (Смирнов А.Н., 1993) (рис. 21).

Трепаны для биопсии костного мозга состоят из режущей части, рукоятки, крепежного болта и тупоконечного эжектора (у ТС-92 кроме того имеется остроконечный мандрен-стиллет). Режущая часть трепана представляет собой цилиндрическую фрезу длиной 70 мм (вариант ТС-70) и 55 мм (ТС-70п и ТС-92). Вариант трепана (ТС-70п) выпускается для педиатрической практики, но он может быть использован и для трепанобиопсии грудины. Внутренний диаметр фрезы в дистальной части равен 1,9-2,3 мм, что обеспечивает получение неповрежденных костномозговых ячеек; в проксимальной зоне он расширяется на 0,2-0,3 мм, что позволяет исключить повреждение биоптата (особенно его спонгиозной части) при вырезании столбика и извлечении его из инструмента [Смирнов А.Н. и др., 1971; Баранов А.Е., Смирнов А.Н. и др. 1974]; внешний диаметр равен 3,2 мм (вариант ТС-70п), 3,4 мм (ТС-92) и 3,8 мм (ТС-70). Трепаны ТС-70 и ТС-70п не имеют мандренов. Для извлечения трепаната эжектор вводят через дистальный конец трепана.

Трепанат, полученный при передней сквозной трепанобиопсии с помощью этих трепанов, обычно ровен, нераздроблен, длиной 15-20 мм, в норме красноватого цвета, содержит доста-

точное количество губчатого вещества с костным мозгом, что обеспечивает надежную диагностику. При гиперплазии костного мозга спонгиозная часть трепанобиоптата сочно-красного или сероватого цвета, при аплазии она желтовато-беловатая, при сублейкемическом миелозе - выглядит суховатой. Однако у пожилых лиц и в норме отмечается гипоцеллюлярность паренхимы костного мозга; нередко биопсии мешает значительная плотность передней зоны подвздошной кости.

В связи с этим, в 1970 г. нами был применен метод трепанобиопсии костного мозга задней бугристости подвздошной кости [Emery, 1957; Czitober, 1961; Byers, Smith, 1967; Clarke, 1966].

Методика трепанобиопсии задней бугристости подвздошной кости. Режущую часть трепана стерилизуют кипячением и асептично фиксируют в гнезде рукоятки болтом. У больного, лежащего на животе, после пальпации зоны *tuberositas iliaca posterior*, обработки биопсийного поля йодно-спиртовой смесью проводят внутрикожную (лимонная корочка), подкожную и поднадкостничную инфильтрационную анестезию 2% раствором новокаина (или ксилокаином) в зоне *tuberositas iliaca posterior* (рис. 22) и глазным скальпелем делают прокол кожи (длиной 2-3 мм). Затем режущий конец трепана проводят через мягкие ткани до надкостницы и, ориентируя продольную ось инструмента не сколько цефально и к срединной сагиттальной плоскости тела, вращательно-поступательными

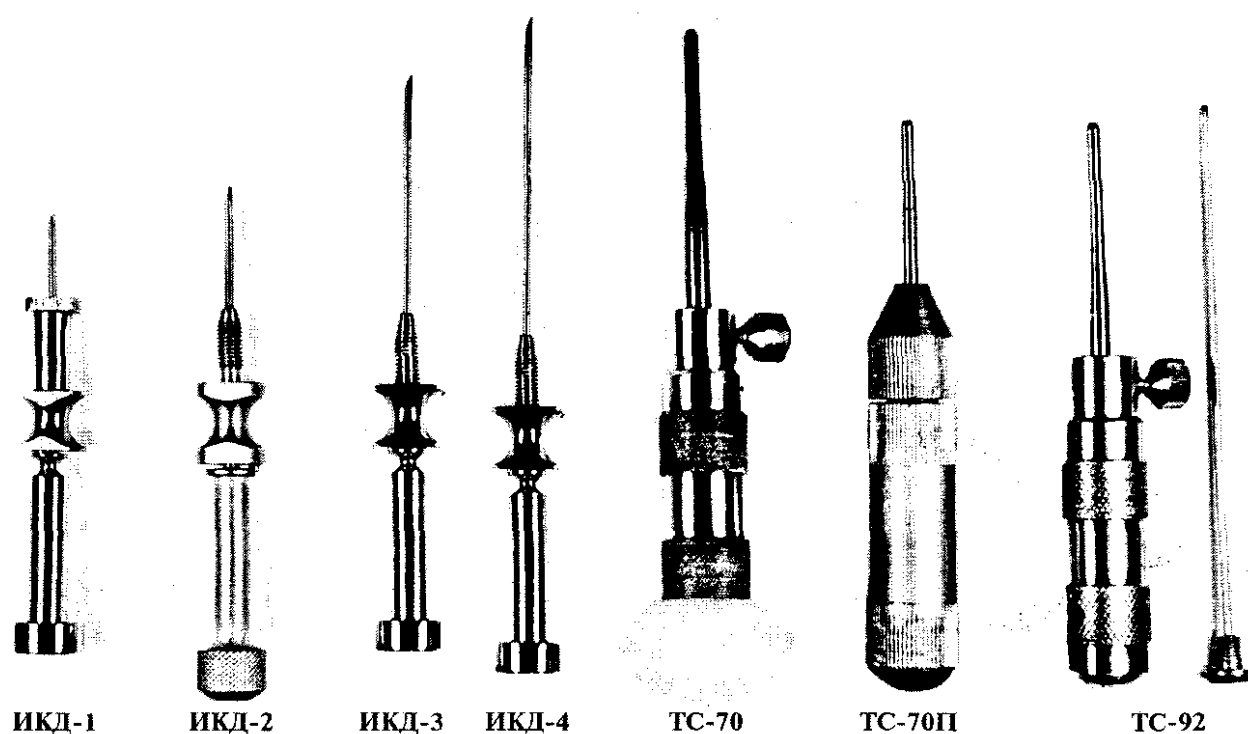


Рис. 21 Трепаны ТС-70, ТС-70п и ТС-92 для биопсии костного мозга и пункционные иглы ИКД.

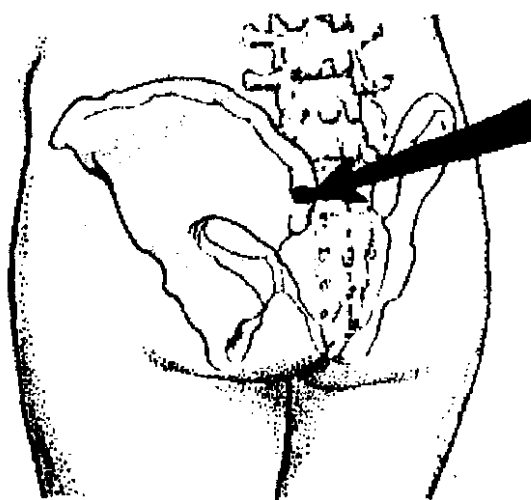


Рис. 22. Схема трепанобиопсии задней бугристости подвздошной кости. Стрелкой указаны точка и направление введения трепана.

движениями проводят трепан через надкостницу, наружный компактный слой¹ и губчатое вещество, достигая (невсегда) внутреннего компактного слоя. Затем трепан извлекают, режущую часть освобождают из зажима и извлекают из неё трепанат на предметное стекло легким выталкиванием с помощью эжектора, введенного со стороны режущего конца. Пинцетом делают отпечатки трепаната для цитологического (при необходимости - и гистохимического) исследования. Обработывают йодом и накладывают асептическую наклейку.

Для профилактики кровоизлияния в мягкие ткани желательнее прижать место трепанобиопсии пальцем на 3-4 мин или наложить груз. Больному рекомендуется 30-40 мин не ходить.

Методика передней поперечной трепанобиопсии. В положении больного лежа на спине пальпируют *spina iliaca anterior superior*; затем, отступив на 2-3 см кзади от передневерхней ости подвздошной кости, после обработки биопсийного поля йодно-спиртовой смесью, выполняют местную инфильтрационную и поднадкостничную² анестезию 2% раствором новокаина (8-10 мл) или тримекаина и глазным скальпелем делают кожный надрез длиной около 3 мм. Затем проводят режущий конец трепана через мягкие ткани до надкостницы, вращательно-поступательными движениями перпендикулярно плоскости крыла подвздошной кости трепан проводят последовательно через надкостницу, наружный компактный слой³, губчатое вещество

(вхождение в него сопровождается ощущением "провала", иногда хрустом) и внутренний компактный слой, тупо отодвигая тазовую фасцию кнутри. В зоне передневерхней ости подвздошной кости костный мозг, как правило, беднее клетками, чем в задней бугристости её.

Разработанная на кафедре гематологии и интенсивной терапии РМАПО методика поперечной и задней трепанобиопсии подвздошной кости и трепаны с переменным внутренним диаметром позволили исключить технический брак и уменьшить болезненность трепанобиопсии. Опыт более 20 000 трепанобиопсий в клиниках СССР и РФ показал достаточную информативность и безопасность данной методики. При глубокой тромбоцитопении может возникнуть гематома в области биопсии; в этом случае применяют местно холод и давящую повязку.

При необходимости выполняют трепанобиопсию тела грудины и бугристости большеберцовой кости (у детей младшего возраста).

Методика трепанобиопсии грудины [Баранов А.Е., Смирнов А.Н. и др. 1973]. У лежащего на спине больного после асептической подготовки, местной анестезии биопсийного поля и надреза кожи вводят конец трепана ТС-70п или ТС-92 (без мандрена) и проводят его вращательно-поступательно в зоне рукоятки или тела грудины (на уровне третьего-четвертого межреберья) в косом направлении через все слои, кроме внутреннего компактного слоя. Трепанат извлекают, готовят мазки-отпечатки и гистологические препараты.

Гистологическая техника обработки трепанатов

Биоптат фиксируют 1-2 ч в 10% нейтральном формалине, декальцинируют 2 суток (при 37° С) в 25-28% растворе хелатона (трипон Б), дегидратируют в спиртах восходящей концентрации и заливают, как правило, в парафин-целлоидин по обычной методике. По мере снижения концентрации применяемого хелатона время декальцинации увеличивается. Полученные срезы (толщиной 5-10 мкм) окрашивают гематоксилин-эозином, при необходимости - азокармином по Гайденгайну, суданом по Ван Гизону, импрегнацией серебром по Футу, пикрофуксином и т.д. Не рекомендуется использовать кислоту для декальцинации, т.к. она вызывает деформацию структур костного мозга, и фиксатор Карнуа (он пересушивает трепанаты).

Гистоморфология костного мозга в норме

Компактный слой на трепанатах, полученных методом сквозной передней и задней трепанобиопсии, относительно невелик, содержит

¹ У трепана ТС-92 в этот момент удаляют мандрен.

² Циркулярно по гребню в зонах планируемой биопсии и пункции.

³ У трепана ТС-92 в этот момент удаляют мандрен.

фрагменты остеонов. Костный мозг в центральной части трепаната достаточно клеточен, причем в задней бугристости подвздошной кости костный мозг, как правило, богаче клетками, чем в зоне ее передневерхней ости [Баранов А.Е., Смирнов А.Н. и др. 1973].

Соотношение *паренхима/жир* в трепанатах оценивают при микроскопии с окулярной сеткой (ув. 40х7) в 20 полях зрения с последующим усреднением. По данным Суворовой Л.А. и соавт. (1980), у практически здоровых людей возраста 21-50 лет соотношение гемопоэтической, жировой и костной ткани в трепанате составляет 1: 0,75: 0,45. В пожилом возрасте (51-60 лет) наблюдается редукция кроветворной паренхимы, переходящая у стариков (в зоне передневерхней ости) в жировую атрофию. *Паренхима костного мозга* обладает большей клеточностью в центральной зоне столбика и значительно меньшей клеточностью в субкортикальных областях. Подсчет общей клеточности костного мозга в трепанате показывает, что она в 4-20 раз выше клеточности костномозгового пунктата и составляет в среднем $1,09 \times 10^6$ / мкл [Суворова Л.А. и др. 1980].

В губчатой части "поперечного" трепаната видны многочисленные костные пластинчатые балки извитой формы, покрытые однослойным эндостом, с заключенными в их ячейках костномозговыми клетками, а также балки, поврежденные при вырезании биоптата. При гистохимическом исследовании между клетками выявляется *основное вещество* (вырабатывается фибробластами и остеобластами), окрашиваемое азином в голубой цвет и дающее положительную (бледную) ШИК-реакцию по Мак Манусу.

Костный мозг в трепанате полиморфный, хорошо различимы мегакариоциты, располагающиеся беспорядочно, но нередко вблизи костномозговых синусов; при увеличении 40х7 в поле зрения видны 1-3 мегакариоцита. В иммерсионной системе легко выявляются эозинофилы (нередко они располагаются островками), плазматические клетки. В тонких срезах трепанатов удается идентифицировать диффузно рассеянные лимфоциты (в норме их не более 2%); изредка (1-3% случаев) в трепанате костного мозга можно видеть зрелоклеточные лимфоидные узелки.

В тонких срезах удается также различать промиелоциты/миелоциты, лежащие чаще в виде мелких очагов (5-30 кл); зрелые клетки гранулоцитарного ростка диффузно рассеяны в трепанате. Клетки красного ростка располагаются очагами (по 5-100 клеток и более). В недостаточно тонких срезах эритрокариоциты трудно отличимы от лимфоидных элементов; поэтому представляется невозможным в реальных условиях сосчитать миелограмму по трепанату, как

предлагали Османлиев П.Д. (1961); Томилов А.Ф. (1970); Суворова Л.А. и др. (1980) главным образом из-за трудности дифференциации нормоцитов, лимфоцитов и миелоцитов. Однако заливка в полиакриламид [Burkhardt, 1966; Lambert et al., 1969] и приготовление срезов толщиной около 1 мкм позволяют подсчитывать гистомиелограмму.

Костная и остеоидная ткань представлена остеобластами, остеокластами и остеоцитами, залегающими в трабекулах. *Остеобласты* имеют базофильную агранулярную цитоплазму и овальное ядро с сетчатым хроматином, расположенное эксцентрично и содержащее 1 (редко 2) метахроматичных ядрышка; по краю трабекул часто можно видеть пролиферацию остеобластов. "*Фибробласты*" стромы костного мозга (преостеобласты!) имеют овально-вытянутую, веретенообразную или звездчатую форму, овальное ядро с нежносетчатым хроматином и одним фиолетовым ядрышком; цитоплазма синевато-серая, иногда вакуолизированная. В этих клетках определяется высокая активность кислой фосфатазы, во многих - положительная реакция на щелочную фосфатазу. Костномозговой "фибробласт" как и остеобласт, способен к спонтанному остеогенезу [Фриденштейн А.Я. и др., 1973]. У лиц пожилого возраста количество остеобластов в трепанатах снижается.

Остеоциты равномерно "замурованы" в трабекулах, они по сравнению с остеобластами меньших размеров имеют отростчатую цитоплазму и округлое плотное гиперхромное ядро. *Ретикулярные клетки* отличаются вытянутой формой, светлоголубой цитоплазмой (в некоторых клетках видна скудная азурофильная зернистость) и округлым "молодым" ядром с 1-3 фиолетовыми ядрышками. При окраске пикрофуксином, импрегнации серебром по Фулу определяются отходящие от ретикулярных клеток аргирофильные и коллагеновые фибриллы; с возрастом пациента их количество нарастает [Неменова Н.М., Протасова Т.Т., 1968]. Эти фибриллы являются основой *механического стромального матрикса* - в их петлях лежат гемопоэтические элементы. *Жировые клетки* при окраске гематоксилин-эозином выглядят как пустоты; при окраске суданом выявляются их структура и тесная связь с эндостом. У здоровых лиц среднего возраста костный мозг содержит 35-50% жира, у лиц старше 50-55 лет содержание жировых клеток постепенно увеличивается [Абрамов М.Г., 1987].

В 1996 г. установлено значение жировых клеток костного мозга как существенного компонента стромального микроокружения. Клетки стромы костного мозга гистогенетически обособлены от кроветворных элементов [Фриденштейн А.Я. и соавт., 1968; De La Shapelle et al. 1973].

Гистиоциты и остеокласты традиционно описываются среди стромальных клеток, хотя они являются кроветворными производными. *Гистиоциты* - это полигональные или отростчатые крупные (15-50 мкм) клетки с плотным ядром и светло-базофильной ячеистой цитоплазмой, часто с грубыми инородными включениями или вакуолями.

Остеокласты - многоядерные клетки с широкой цитоплазмой также со включениями, чаще они располагаются в лакунах вблизи поверхностных костных трабекул. Они обеспечивают остеолитический процесс в процессе самообновления кости. В настоящее время к элементам стромального микроокружения относят и *эндотелий* венозных синусов костного мозга, который, как и остеокласты, также имеет моноцитарно-макрофагальное происхождение. В трепанатах часто видна *надкостница* многослойного волокнистого строения. У детей определяются *хондроциты*, располагающиеся столбиками.

Метод трепанобиопсии необходим в диагностике *хронического сублейкемического миелоза* (эритремии, миелофиброза); он важен при *лучевой болезни*, т.к. в этих случаях нелегко получить информативный костномозговой пунктат, а также для выявления характера лимфоидной пролиферации в костном мозге (нодулярная, диффузная).

В общей практике трепанобиопсия имеет особое значение при метастазах *рака* в костный мозг, т.к. она помогает не только доказать факт диссеминации опухоли, но нередко и определить первичный очаг, ибо железистые структуры атипических клеток соответствуют ткани органа-источника метастазирования. При наиболее частых - *остеобластических* - метастазах вокруг раковых комплексов в трепанате выявляется реактивный миелофиброз/остеосклероз. Реже наблюдаются остеолитические метастазы с деструкцией костей.

Трепанат подвздошной кости позволяет диагностировать и *костную патологию*: туберкулез, остеопатию (нефрогенную, паратиреоидную) остеодистрофии (болезнь Леджета и др.), мраморную болезнь (синдром Альберс-Шенберга) и локальные костные опухоли - остеогенную саркому, остеобластокластому и др.

Кроме пункции грудины, с 1969 г. для цитологической диагностики применяется также и *пункция подвздошной кости* - как в области передневерхней ости, так и в зоне задней бугристой. Пункцию проводят после выполнения трепанобиопсии: через тот же надрез, сдвинув кожную складку, вводят костномозговую диагностическую иглу (ИКД) в подвздошную кость в зоне новокаиновой инфильтрации (отступая на 5-10 мм в сторону от трепанационного отверстия,

чтобы исключить излишнюю примесь крови к пунктату), аспирируют костный мозг и готовят цитологические препараты. Не рекомендуется делать аспирацию костного мозга раньше трепанобиопсии во избежание искусственных геморагий в трепанате, а также аспирировать пунктат через трепан, как предлагают Абрамов М.Г., Jamshidi и некоторые другие авторы.

Поскольку подкожный жировой слой в тазовой области иногда достигает 3-5 см, нами были разработаны иглы костномозговые диагностические с удлиненной (до 40-60 мм и более) колющей частью (см. рис. 21). При этом ИКД-1 соответствует стерильной игле Кассирского. Для удобства оператора рукоятка мандрена снабжена упором для ладони¹. Предохранительный щиток при пункции подвздошной кости не нужен, т.к. надежным ограничителем является палец оператора; пункции производятся двухэтапно: вначале прокол кожи и прохождение жирового слоя, и лишь затем прокол компактного вещества кости.

Указанные ИКД применяются в гематологической практике с 1969 г., они удобны и безопасны (крепление колющей части к корпусу иглы осуществлено с помощью точечной сварки), а в некоторых случаях могут быть использованы и для гистологической оценки костномозговых структур, если невозможно выполнить трепанобиопсию [Amprino, Penati, 1935; Воронин В.М., 1965 и др.].

Методика гистологического исследования аспирата костного мозга. Аспират (2-3 мл) с микрофрагментами костного мозга, полученный ИКД, помещают на стекло; после свертывания материал скальпелем переносят на фильтровальную бумагу (лучше - в кусочек ситца), который погружают в 10% нейтральный формалин на 30 мин, затем обезвреживают в спиртах и спирт-эфире, заливают в парафин-целлоидин и микротомизируют. Отдельные "крошки" костного мозга со стромой, вырванные иглой (особенно более толстой - ИКД-2), позволяют составить некоторое представление о гистологии костного мозга [Воробьев А.И.]. Удобство метода и в быстрой - сокращается (до 4-5 ч) время обработки материала за счет исключения декальцинации. Однако он не позволяет судить о состоянии остеогенных структур и не может полностью заменить трепанобиопсию.

¹ За рубежом выпускаются (фирмы "Monoject", "Bayer" и др.) одноразовые иглы для пункции костного мозга с неудобным коротким пластиковым корпусом с длиной колющей части 15 и 50 мм, без предохранительного щитка.

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ НОРМА

Показатель нормы является статистическим и отражает среднюю величину, наблюдаемую в популяции здоровых лиц. Вместе с тем, показатели нормы не отражают состояние здоровья или болезни. Так, например, половые различия в содержании эритроцитов и гемоглобина (число эритроцитов приблизительно на $0,5 \times 10^{12}$ в 1 л, а гемоглобин на 20 г/л выше у мужчин, чем у женщин) отражают, с одной стороны, более высокую частоту железодефицитных состояний у женщин, связанных с регулярными кровопоте-

рями, с другой, - из-за более высокой распространенности табакокурения среди мужчин - более частый эритроцитоз, обусловленный гипоксемией курильщика. Поскольку эритроцитов у женщин в среднем меньше, то и РОЭ у них, приблизительно в 2 раза выше, чем у мужчин.

На состав крови влияют пол и возраст организма. Картина красной крови имеет особенности у детей (табл. 3) и стариков, а с 16 - 18 до 60 лет стабильна [Давыдовский И. В., 1967; Тур А. Ф., 1957; Тодоров Й., 1961, и др.].

Таблица 3

Показатель	Возраст детей			
	1-й день	1-й месяц	6 месяцев	12 месяцев
Гемоглобин г/л	180-240	115-175	110-140	110-135
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,3-7,6	3,8-5,6	3,5-4,8	3,6-4,9

Эта возрастная разница обусловлена сменой гемоглобина у ребенка в первые месяцы жизни - он рождается с наличием во всех эритроцитах фетального гемоглобина F, обеспечивающего кислороднотранспортную функцию внутриутробно, а затем новые поколения эритроцитов синтезируют гемоглобин A.

Ряд авторов описывает уменьшение с возрастом содержания гемоглобина и эритроцитов, однако такие наблюдения связаны с тем, что с возрастом нарастает частота анемий: появляется B_{12} -дефицитная анемия, железодефицитная анемия начинает чаще наблюдаться у мужчин, чем у женщин (кровоточащие геморрой, язвы желудка и др.), нередко анемии хронических заболеваний (онкологически обусловленные, связанные с почечной недостаточностью, паразитарные). Достоверные данные об инволютивном изменении кроветворения отсутствуют.

Определенные трудности вызывают нормативы для отдельных географических и климатических районов и соответствующие прочим условиям внешней среды. Однако лишь в некоторых географических зонах со своеобразными природными условиями (например, высокогорье) ряд показателей системы крови может отличаться от общепринятых норм. Вопрос о том, что данные местности должны иметь свою региональную норму дискуссионен, однако при оценке общего анализа крови необходимо делать определенные поправки.

При углубленном анализе [Соколов В.В., Грибова И.А., 1972] не подтвердилось мнение о постепенном уменьшении с возрастом числа лейкоцитов и увеличении относительного содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле здоровых людей. Вместе с тем, нередко приходится

наблюдать абсолютно здоровых людей, имеющих стойкие низкие показатели содержания лейкоцитов (до $1,5-2 \times 10^9/л$) крови с неизменным их соотношением (формулой) или небольшим относительным лимфоцитозом. Принятая ВОЗ градация лейкопений не имеет клинического смысла - до снижения уровня лейкоцитов ниже $1 \times 10^9/л$ и числа нейтрофилов менее $0,75 \times 10^9/л$ никакой патологии, связанной с дефицитом клеточного иммунитета, не обнаруживается. При более низких цифрах говорят об агранулоцитозе.

Наиболее обоснованным считается математический путь установления нормы с использованием теории вероятности и математической статистики после обследования больших групп здоровых людей. Вариационное распределение гематологических показателей близко к нормальному. Лишь в распределении эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов, ретикулоцитов и РОЭ имеется некоторая асимметрия [Николаева Л.К. и др., 1969; Соколов В.В., Грибова И.А., 1972].

Для гематологических показателей наиболее приемлемой является норма, ограниченная отклонениями $\pm 1,5\sigma$ от средней величины. При этом удачно сочетаются два момента: границы нерезко расширены и в то же время она охватывает показатели, свойственные большинству здоровых людей (86,6%). Естественно, при установлении нормы математическим путем на ее точность сильно влияет численность обследованных контингентов.

После изучения картины крови у 18 000 здоровых людей [Соколов В.В., Грибова И.А., 1972] за норму приняты колебания показателей в пределах отклонений $\pm 1,5\sigma$ от средней величины и

Таблица 4

Показатели крови в норме			
Показатели крови	Пол	Среднее значение	Пределы нормальных колебаний
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	М	4,6	4,0-5,1
	Ж	4,2	3,7-4,7
Гемоглобин, г/л	М	148	132-164
	Ж	130	115-145
Цветовой показатель		0,93	0,82-1,05
Ретикулоциты, %		7,0	2,0-12,0
РОЭ, мм/ч	М	5,0	1,0-10,0
	Ж	9,0	2,0-15,0
Тромбоциты, $\times 10^9/л$		250	180-320
Лейкоциты, $\times 10^9/л$		6,4	4,0-8,8
Нейтрофилы палочкоядерные, %		3,5	1-6
Нейтрофилы сегментоядерные, %		58,0	45,0-70,0
Эозинофилы, %		3,0	0-5
Базофилы, %		0,5	0-1
Лимфоциты, %		28,5	18,0-40,0
Моноциты, %		6,0	2-9

получены нормальные показатели для взрослого населения (табл. 4).

В последнее время, особенно при проведении исследований с помощью автоматических анализаторов, часто используются расчетные величины. Цветовой показатель рассчитывается по формуле:

$$ЦП = \frac{Hb \cdot 3^{11}}{B}, \quad (1)$$

где Hb - содержание гемоглобина в г/л, B - число эритроцитов в 1 л крови.

Ошибки в подсчете цветового показателя связаны, в первую очередь, с неправильным определением гемоглобина и числа эритроцитов. Нередко приходится наблюдать в результатах анализа крови, что цветовой показатель нормален, а эритроциты «дырявые», содержат мало гемоглобина, т.е. имеет место неправильное определение этого важного показателя.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (среднее корпускулярное содержание гемоглобина - MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC) можно высчитать по формулам

$$MCH = \frac{Hb}{B}, \quad (2)$$

где Hb - содержание гемоглобина в г/л, B - число эритроцитов в 1 л крови.

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht}, \quad (3)$$

где Hb - содержание гемоглобина в г/л, Ht - гематокрит в %.

Формулы (1) и (2) различаются множителем 3^{11} , тогда как исходные физиологические параметры идентичны. Таким образом, цветовой показатель и MCH - величины, имеющие одинаковое клиническое значение и легко взаимозаменяемы. Норма MCH - 24/33 пикограмм или 0,42-0,52 ммоль/эритроцит.

Нормальное значение MCHC - 30-38 г/дцл. Значение MCHC является производным от уровня эритроцитов и гемоглобина, т.е. величиной, чье значение изменяется аналогично цветовому показателю и MCH.

Следует учитывать, что в автоматических анализаторах крови гематокрит высчитывается как производное от эритроцитов, а не путем центрифугирования, как это должно быть. Формула для пересчета уровня эритроцитов в гематокрит следующая:

$$Ht = \frac{11,72 + 5,045 \cdot Эр}{10^{11}}, \quad (4)$$

где Ht - гематокрит в %, Эр - число эритроцитов в 1 л крови.

На основе тех же математических принципов рассчитаны средние показатели костного мозга (табл. 5). Они обобщают результаты обследования 112 здоровых взрослых людей. Во всех случаях костный мозг получали при проколе грудины.

Все предложенные нормативы рассчитаны для отклонения $\pm 1,5\sigma$ от средней величины и, следовательно, имеют 86,6% вероятность, т.е. в небольшом проценте случаев (13,4) у здоровых людей показатели могут выходить за их пределы.

Таблица 5

Клеточный состав костного мозга в норме, %

Показатели миелограммы	Среднее значение	Предел нормальных колебаний
Ретикулярные клетки	0,9	0,1 - 1,6
Бласты	0,6	0,1 - 1,1
Миелобласты	1,0	0,2 - 1,7
Нейтрофильные клетки:		
промиелоциты	2,5	1,0 - 4,1
миелоциты	9,6	7,0 - 12,2
метамиелоциты	11,5	8,0 - 15,0
палочкоядерные	18,2	12,8 - 23,7
сегментоядерные	18,6	13,1 - 24,1
Все нейтрофильные элементы	60,8	52,7 - 68,9
Эозинофилы	3,2	0,5 - 5,8
(всех генераций)		
Базофилы	0,2	0 - 0,5
Эритробласты	0,6	0,2 - 1,1
Пронормоциты	0,6	0,1 - 1,2
Нормоциты		
базофильные	3,0	1,4 - 4,6
полихроматофильные	12,9	8,9 - 16,9
оксифильные	3,2	0,8 - 5,6
Все эритроидные элементы	20,5	14,5 - 26,5
Лимфоциты	9,0	4,3 - 13,7
Моноциты	1,9	0,7 - 3,1
Плазматические клетки	0,9	0,1 - 1,8
Количество мегакариоцитов (клеток в 1 мкл)		50 - 150*
Лейкоэритробластическое отношение	3,3	2,1 - 4,5
Индекс созревания нейтрофилов	0,7	0,5 - 0,9
Количество миелокариоцитов в тыс. в 1 мкл	118,4	41,6 - 195,0

Примечание. * В норме возможно более низкое содержание, если костный мозг разбавлен кровью.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ

Интерес к культурам кроветворных клеток возник более 100 лет назад в связи с очевидной недостаточностью только морфологического их изучения, поскольку оказалось, что внешне одинаковые клетки имеют совершенно различные функции. Культуры относятся к функциональным методам исследования, они позволяют изолировать гемопоэтические клетки, оценить их пролиферативные и дифференцировочные потенции, выявить межклеточные взаимодействия, эффект различных гуморальных агентов, радиации, лекарственных препаратов и т.д. Культивирование взвеси кроветворных клеток *in vitro*, начатое в работах И.П. Скворцова (1885), Arnold (1887), Carrel, Burrows (1910), А.А. Максимова (1916-1928), позволяет в суспензионных культурах в течение 1-2 суток наблюдать затухающий гемопоэз, определять некоторые цитокинетические параметры - время генерации *in vitro*, включение меченых нуклеотидов, бласттрансформацию лимфоцитов в присутствии митогенов, фагоцитоз и т.д. Поддержать гемопоэз в таких культурах удается добавлением в культуру комбинации ряда гемопоэтических факторов роста.

Наиболее ценными в теоретическом и практическом плане оказались методы клонирования *in vitro* клеточных кроветворных популяций. Отличительная черта этих методов - высев разбавленных клеток исходной взвеси в такую культуральную систему, где потомки делящихся клеток оказываются локализованными и доступны визуальному наблюдению, идентификации, цитохимическому и кариологическому анализу, а также пересеву в следующую клонирующую систему. Именно агаровые и монослойные культуры создали возможность клонировать клетки *in vitro*. Однотипность клеток, составляющих очаги таких культур, позволяет идентифицировать их как потомков одной клетки-предшественницы - клон. Со времени разработки методов клонирования *in vitro* гемопоэтических клеток (20-30 лет) накопилось много сведений, расширяющих наши представления о механизмах гемопоэза в норме и при различных нарушениях. Представляется целесообразным остановиться на пионерских работах, выявивших клоногенные клетки-предшественницы для различных ростков гемопоэза, и некоторых характеристиках таких клеток.

Культуры гемопоэтических клеток в норме

В культуре получен рост колоний-клонов из унипотентных клеток-предшественниц, коммитированных к дифференцировке в направлении только одного ростка гемопоэза, а также рост полипотентных клеток-предшественниц, формирующих колонии из клеток двух ростков кроветворения и более. Клональный рост обеспечивается иммобилизацией суспензии из одиночных клеток в полутвердых средах (агар, метилцеллюлоза, плазменный сгусток) и включением в питательную среду соответствующего стимулятора. Кроме того, в культуре получен клональный рост клеток-предшественниц гемопоэтической стромы. Концентрация колониеобразующих клеток в исходных кроветворных тканях очень мала, и поэтому их трудно идентифицировать морфологически.

Гранулоцитарно-макрофагальные клетки-предшественницы (КОЕ-ГМ). Метод агаровых культур позволяет клонировать гранулоцитарно-макрофагальные клетки-предшественницы (колониеобразующие единицы в культуре, КОЕ-К или КОЕ-ГМ) у животных [Pluznik, Sachs, 1965; Bradley, Metcalf, 1966] и у человека [Pike, Robinson, 1970]. В нашей стране он впервые воспроизведен в лаборатории профессора И.Л. Черткова [Шерешков С.И., 1974]. Сущность метода: при эксплантации суспензии кроветворных клеток в строго определенных условиях и в присутствии КСФ на агаре в течение нескольких дней вырастают колонии-клоны, состоящие из большого числа гранулоцитов, макрофагов или смеси обоих клеточных типов (рис. 23). Скопления из 50 и менее клеток называют кластерами.

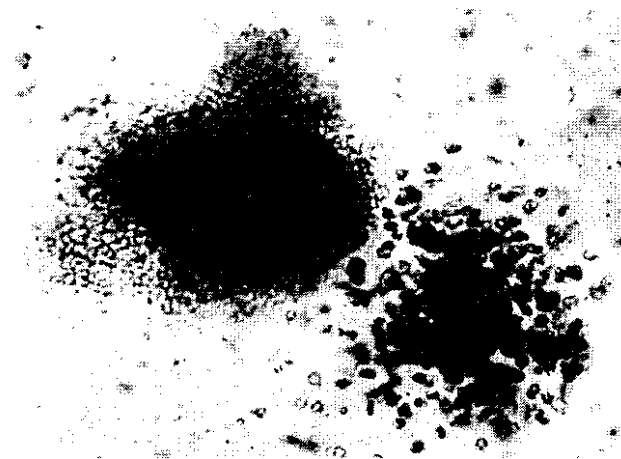


Рис.23. Колонии, образуемые потомками костномозговых гранулоцитарно-макрофагальных клеток-предшественниц (КОЕ-ГМ) в агаре.

Метод Pike, Robinson обеспечивает наиболее высокую и стабильную эффективность клониро-

вания кроветворных клеток человека. Iscove et al. (1971) вместо агара используют метилцеллюлозу. В двухслойной системе Pike, Robinson в качестве источника CSF используют лейкоциты периферической крови донора, помещенные в нижнем слое 0,5% агара, а тестируемые клетки эксплантируют в верхнем слое 0,3% агара.

Число КОЕ-ГМ в расчете на каждые 1×10^5 высаженных в культуру клеток костного мозга здоровых взрослых людей составляет от 10 до 150 [Забелина Т.С. и др., 1977; Афанасьев Б.В. и др., 1982; Entringer et al., 1977; Metcalf, 1979 et al.]. В периферической крови КОЕ-ГМ содержится на порядок меньше, чем и костном мозге [Richman et al., 1976]. Селезенка по содержанию КОЕ-ГМ занимает промежуточное положение между костным мозгом и периферической кровью [Metcalf, 1979].

Содержание кластерообразующих клеток (КЛОК) и культурах нормального костного мозга человека обычно в 5-10 раз превышает содержание КОЕ-ГМ [Metcalf, 1979].

Опыты с пересевом единичных клеток показали, что КОЕ-ГМ - общая клетка-предшественница для нейтрофилов и моноцитов [Dao et al., 1977]. Изучены физические и пролиферативные характеристики КОЕ-ГМ. Показано, что 20-40% КОЕ-ГМ костного мозга взрослого человека быстро пролиферируют [Moore et al., 1973; Broxmeyer et al., 1976].

Эозинофилы являются потомками самостоятельной клетки-предшественницы [Dresh et al., 1977; Dao et al., 1977].

КОЕ-ГМ человека весьма радиочувствительны. Их число в костном мозге снижается после введения цитостатических химиопрепаратов [Richman et al., 1976]. Изменения уровня КОЕ-ГМ в кроветворных тканях человека при различных воздействиях более чувствительны, чем другие параметры гранулопоэза (клеточность, морфологический состав костного мозга). Так, при проведении химиотерапии миелосаном хронического миелолейкоза падение в крови числа КОЕ-ГМ более выраженное и наступает раньше, чем снижение числа лейкоцитов [Greenberg et al., 1974; Douglas, Pickering, 1976].

Эритроцитарные клетки-предшественницы (КОЕ-Э, БОЕ-Э). В 1971 г. был разработан метод, позволяющий контролировать *in vitro* у мышей эритроцитарные клетки-предшественницы [Stephenson et al., 1971], а в 1974 г. эта методика была использована для изучения таких клеток у человека [Tepperman et al., 1974].

В 1982 г. Konwalinka et al. разработали систему микроагаровых культур для клонирования эритроцитарных клеток-предшественниц костного мозга человека. Nishihira, Kigasava (1981) получили рост человеческих эритроцитарных и

эритроцитарно-гранулоцитарных колоний в культуре фибринового сгустка без добавления эритропоэтина (ЭРП). В состав питательной среды они включали 2% сыворотки больных апластической анемией и кондиционную среду (КС) из стимулированных ФГА человеческих лейкоцитов. Такая система обеспечивает высокую эффективность клонирования.

Клетки-предшественницы мегакариопоэза (КОЕ-Мгкц). Разработана система для клонирования мегакариоцитарных клеток-предшественниц у мышей [Metcalf et al., 1975; Nekeff, Damels-McQueen, 1976] и у человека [Vainchenker et al., 1979; Messner et al., 1982, и др.].

Рост колоний мегакариоцитов зависит от добавления в культуру КС из стимулированных селезеночных клеток. Williams et al. (1980) обнаружили фактор, стимулирующий рост мышинных мегакариоцитов и повышающий их плоидность в супернатанте клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов. Messner et al. (1982) улучшили культуральные условия и добились ряда больших, компактных мегакариоцитарных колоний. Таким образом, появилась возможность для изучения дифференцировки стволовых клеток и по пути мегакариоцитарного роста.

Клетки-предшественницы лимфопоэза (КОЕ-Л). Наиболее трудными для клонирования в культуре *in vitro* оказались лимфоцитарные клетки-предшественницы. В 1975 г. Metcalf et al. разработали систему культивирования, которая обеспечила пролиферацию мышинных В-лимфоцитов (КОЕ-Л_в) в полутвердом агаре. В этой системе добавление 2-меркаптоэтанола необходимо для выживания и пролиферации лимфоцитов. Образование колонии В-лимфоцитов отличается тем, что оно не требует добавления специфического фактора, стимулирующего рост колоний.

Получен рост человеческих В-лимфоцитарных колоний *in vitro* [Radney et al., 1979]. Однако наиболее полные характеристики КОЕ-Л_в получены в мышинной системе.

В агаровой культуре получен рост колоний из мышинных [Sredni et al., 1976] и человеческих [Rosenzajn et al., 1975; Fibach et al., 1976, и др.] ФГА-стимулированных лимфоцитов (КОЕ-Л_ч). В начальных работах по клонированию Т-лимфоцитов не удалось получить линейной зависимости между числом высаженных клеток и числом образующихся колоний. Fancet, Testa (1982) показали, что человеческие Т-лимфоцитарные колонии, растущие на поверхности агара при стимуляции ФГА, возникают более чем из одной предшественницы: они содержат оба типа фермента Г-6-ФД, когда донор был гетерозиготен по изоэнзимам.

В 1979 г. Lowenberg, De Zeeuw разработали метод клонирования человеческих Т-лимфоцитов с линейной зависимостью между числом высаженных клеток и числом образующихся колоний. Авторы использовали двухслойную систему: в нижнем слое агара помещали лейкоциты периферической крови донора, облученные дозой 20 Гр, а тестируемые клетки костного мозга и ФГА помещали в верхнем слое без агара. Авторы установили, что большинство колониеобразующих клеток содержится во фракции стволовых клеток, доказывая тем самым, что колонии происходят из лимфоцитарных предшественниц.

Гемопозитические клетки-предшественницы, формирующие колонии в диффузионных камерах *in vivo* (КОЕ-ДК). Gordon в агаровой среде в диффузионных камерах, имплантированных внутрибрюшинно мышам (предварительно облученным), получила клональный рост КОЕ-ГМ (КОЕ-ДК) из костного мозга мышей (1974) и человека (1975). Этот метод воспроизведен в нашей стране в лаборатории проф. Черткова И.Л. [Горбунова И.А., 1979]. По концентрации в различных кроветворных тканях мышей, а также по морфологическому составу образующихся в культуре колоний КОЕ-ДК аналогичны КОЕ-ГМ. Однако по физическим характеристикам [Jacobson et al., 1979], а также по радиочувствительности [Колесникова А.И. и др., 1980, 1982; Gordon, 1975] и способности инактивироваться кроличьей сывороткой против головного мозга мышей [Колесникова А.И. и др., 1982] КОЕ-ДК отличаются от КОЕ-ГМ, и по уровню дифференцировки они, по-видимому, стоят ближе к стволовым кроветворным клеткам. Для поддержания гранулопоэза в диффузионных камерах требуется фактор роста, который пока не идентифицирован. Этот фактор роста обеспечивает организм хозяина-реципиента.

Steinberg et al. (1976) в плазменном сгустке в диффузионных камерах получили клональный рост гранулоцитарных (КОЕ-ГМ) и эритроцитарных (КОЕ-Э, БОЕ-Э) клеток-предшественниц.

В плазменном сгустке диффузионных камер получен также рост мегакариоцитарных колоний, однако эффективность клонирования и клеточность колоний значительно меньше, чем в культурах *in vitro* (Paulus et al., 1980). Таким образом, с использованием диффузионных камер появилась возможность изучать гемопозитические клетки-предшественницы *in vivo*.

Полипотентные клетки-предшественницы в культуре (КОЕ-ГЭММ). В полутвердой культуральной системе получен рост колоний, состоящих из 5 различных типов мышинных гемопозитических клеток: эритроцитов, нейтрофилов, макрофагов, эозинофилов и мегакариоцитов [Johnson, Metcalf, 1977; Metcalf et al., 1979]. Такие

клетки, образующие в культуре смешанные колонии, были названы КОЕ-ГЭММ. Клетки из таких колоний оказались способными к формированию типичных селезеночных колоний у сингенных летально облученных реципиентов, а также к образованию вторичных смешанных колоний в пересевных культурах, что свидетельствует об их способности к самоподдержанию в культуре. Анализ колоний показал, что каждая является клоном, развивающимся из одной полипотентной клетки [Metcalf et al., 1980].

В последующих работах рост смешанных гемопозитических колоний получен и в культурах человеческого костного мозга, периферической крови и крови сердца при добавлении к культурам КС из стимулированных ФГА лейкоцитов периферической крови [Fauser, Messner, 1978, 1979]. Помимо такой кондиционированной среды или ФГА, в состав питательной среды входят культуральная среда, эмбриональная телячья сыворотка, эритропоэтин, метилцеллюлоза [Fauser, Messner, 1978] или агар [Messner et al., 1980]. Эритропоэтин требуется для созревания эритроцитарных предшественниц в смешанных колониях. Концентрация КОЕ-ГЭММ, БОЕ-Э и КОЕ-К, по данным Messner, Fauser (1980), составила в среднем соответственно 10, 120 и 70 на 1×10^5 нормальных клеток костного мозга. Следовательно, смешанные колонии составляют приблизительно 5% всех образующихся в культуре колоний.

В опытах с H_3 -тимидином показано, что КОЕ-ГЭММ человека в отличие от КОЕ-К и БОЕ-Э являются покоящимися клетками, способными в период регенерации (после трансплантации) активно пролиферировать [Fauser, Messner, 1979].

Таким образом, по пролиферативной активности в нормальном состоянии и в условиях регенерации, а также по способности к самоподдержанию КОЕ-ГЭММ аналогичны стволовым клеткам. Однако, анализируя отношение КОЕ-ГЭММ и стволовых клеток, Metcalf (1981) приходит к выводу о том, что КОЕ-ГЭММ, вероятнее всего, представляют собой комбинацию более зрелых стволовых клеток.

Полипотентные клетки-предшественницы оказались гетерогенной популяцией клеток с различными дифференцировочными потенциями. К ним, помимо КОЕ-ГЭММ, можно отнести клетки, занимающие промежуточное положение между КОЕ-ГЭММ и унипотентными КОЕ: полипотентные КОЕ-ГЭМ и КОЕ-ГММ, образующие в культуре колонии из 3 типов миелоидных клеток, а также бипотентные КОЕ-ГМ, КОЕ-ГЭ и КОЕ-ЭМ, образующие колонии из 2 типов миелоидных клеток.

Nakahata, Ogawa (1982) показали, что в культурах костного мозга и селезенки мышей на кондиционной среде из митогенстимулированных

селезеночных клеток через 16 дней образуются колонии, содержащие по 40-1000 бластных клеток без признаков терминальной дифференцировки. Опыты с пересевными культурами выявили способность клеток из таких колоний образовывать вторичные и третичные колонии из бластных клеток. Анализ индивидуальных колоний подтвердил высокое содержание в них стволовых клеток и КОЕ-ГЭММ. Такие колонии, как считают авторы, образуются из стволовых клеток.

Таким образом, созданы методы культивирования *in vitro*, обеспечивающие возможности изучения пролиферации и дифференцировки гемопозитических стволовых клеток у мышей без трудоемкой методики селезеночного колониеобразования и у человека, для которого подобная система *in vivo* невозможна.

Максимально стимулированные агаровые культуры нормального костного мозга и периферической крови человека являются полезным лабораторным методом, подтверждающим и расширяющим данные, полученные при морфологических исследованиях. Они особенно важны при изучении ряда заболеваний системы крови.

Стромальные клетки-предшественницы, формирующие колонии фибробластов в культуре (КОЕ-Ф). При посеве в плоскостонные сосуды с питательной средой, гепарином и плазмой относительно небольшого количества клеток костного мозга грызунов с 3-6-го дня в культурах формируются дискретные колонии - клоны фибробластоподобных клеток (Чайлахян Р.К., 1970) (рис. 24).



Рис. 24. Колонии монослойной культуры фибробластов нормального костного мозга человека, выращенные во флаконе Карреля.

Показано, что число колоний в этих условиях линейно зависит от количества эксплантированных ядродержащих клеток костного мозга. Эти клетки являются стромальными предшественниками (т.е., механоцитами) гистогенетически обособленными от кроветворной паренхимы и сохраняющими способность переносить и строить гемопоэтическое микроокружение, пригодное для дальнейшей репопуляции кроветворными клетками [Панасюк А.Ф., Лурия Е.А., 1970; Кейлис-Борок И.В. и др., 1971; Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.А., 1973, и др.].

Затем было установлено [Панасюк А.Ф. и др., 1972; Смирнов А.Н., 1974], что концентрация стромальных клеток-предшественниц в костном мозге человека составляет около 1×10^5 клеток, они относительно радиочувствительны, их потомки способны к длительному росту в монослойной культуре в виде диплоидного штамма. В интактном организме колониеобразующие клетки-предшественницы фибробластов (КОЕ-Ф) находятся вне митотического цикла. Применение ксенофидера из клеток костного мозга грызунов, облученного в дозе 40 Гр, позволяет стабилизировать эффективность колониеобразования [Кулагина Н.Н. и др., 1981]. Выявить в крови человека циркулирующие КОЕ-Ф не удается.

Предшественники фибробластоподобных клеток в костном мозге не идентифицированы, но, вероятнее всего, они относятся к преостеобластам [Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.А., 1973; Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А., 1980]. КОЕ-Ф не содержат Ia-антигена, секретируют фибронектин и коллаген I и III типов, т.е., являются механоцитами [Castro-Malaspina et al., 1980].

А.И. Колесникова, С.К. Холтынская с соавт. (1982) обнаружили значительную вариабельность числа КОЕ-Ф в костном мозге у лиц разного возраста. Показано, что относительное и абсолютное содержание КОЕ-Ф в костном мозге грудины существенно выше, чем в костном мозге подвздошной кости. Концентрация КОЕ-Ф в костном мозге с возрастом снижается.

Выявлена гетерогенность популяции КОЕ-Ф костного мозга человека, формирующих в культуре колонии фибробластов с различной клеточностью: плотные (более клеточные) и рыхлые (менее клеточные) колонии [Суворова Л.А., Груздев Г.П., 1981]. Изучены некоторые характеристики этих двух различных субпопуляций КОЕ-Ф (их соотношение, остеогенный потенциал, пролиферативный статус, способность к восстановлению после облучения разными дозами в ранние и отдаленные сроки) [Kolesnikova et al., 1995; Данилова М.А. и соавт., 1997]. Показано, что более радиочувствительная субпопуляция КОЕ-Ф, формирующая в культуре плотные клоны, характеризуется меньшей способностью к восстановлению от сублетальных повреждений

по сравнению с более радиорезистентной субпопуляцией КОЕ-Ф, формирующей в культуре рыхлые клоны. Последняя в большей степени ответственна за регенерацию КОЕ-Ф в отдаленные сроки после облучения.

Гемопоэз в длительных культурах. Помимо клональных методов, разработаны методы культивирования, обеспечивающие взаимодействие стромальных и кроветворных клеток и вследствие этого длительное поддержание в них кроветворения. К таким методам относятся органные культуры и система Декстера.

Метод органных культур разработали Е.А. Лурия, И.Е. Пьянченко (1966). Сущность его заключается в том, что на миллипорные фильтры на разделе двух фаз (жидкой - питательной среды, и газовой - воздуха, или смеси воздуха с 5% CO_2) эксплантируются не разобщенные кроветворные клетки, как в клональных методах, а клетки вместе с окружающей их стромой. В таких культурах обеспечивается взаимодействие стромальных и кроветворных клеток, что приводит к длительному поддержанию в них кроветворения. В органных культурах костного мозга человека из фрагментов ребер [Смирнов А.Н., 1974] или из материала трепанатов [Колесникова А.И., 1974] в течение 2-3 недель поддерживается кроветворение. Происходит дифференцировка до сегментоядерных нейтрофилов [Воробьев А.И. и др., 1971]. Эритропоэз угасает к 3-5-м суткам, лимфопоэз не поддерживается. В отличие от других методов культивирования, продолжается мегакариопоэз без отшнуровывания тромбоцитов [Смирнов А.Н., 1974]. В органных культурах кроветворной ткани в течение 2-3 недель пролиферируют стволовые кроветворные клетки [Лациник Н.В. и др., 1978; Харламова Л.А. и др., 1975].

В 1977 г. Dexter с соавт. разработали систему, обеспечивающую пролиферацию и дифференцировку стволовых кроветворных клеток на протяжении нескольких месяцев. В этих культурах вначале выращивается подложка из прилипающей популяции клеток костного мозга, состоящая из жировых, эндотелиальных клеток, макрофагов и фибробластов. Через 2-3 недели в культуру высаживают свежие костномозговые клетки, их взаимодействие с клетками подложки и обеспечивает длительное поддержание кроветворения. Такая система воспроизведена и для длительного культивирования костного мозга человека Moore и соавторами (1979).

В такой культуре возможно поддержание гранулопоэза до 10-12 недель [Dexter et al., 1977, 1978], наблюдаются многочисленные мегакариоциты [Гуревич О.А. и др., 1982]. В культурах костного мозга человека до 5-й недели определяются бурстобразующие клетки, а поздние эритропредшественницы - до 9-й недели; в 5-

недельных культурах костного мозга человека доказано присутствие Т-лимфоцитов [Hocking, Golde, 1980].

Показательно, что очаги гранулопоэза во всех случаях ассоциированы с пролиферирующими клетками прилипающего полислоя - фагоцитирующими моноцитами, агрегатами «эпителиоидных» клеток и клеток, синтезирующих липиды [Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А., 1980]. Повидимому, именно прилипающий слой в таких культурах достаточно хорошо имитирует кроветворное микроокружение, существующее *in vivo* в костном мозге, хотя бы для гранулопоэза. Следовательно, органные культуры и система Декстера позволяют изучать интимные механизмы взаимодействия между кроветворными и стромальными клетками, структуру стромального микроокружения и его роль в поддержании гемопоэза как у животных, так и у человека.

Недавно появилась работа Seshi, Kumar, Sellers (2000), в которой авторы количественно определили клеточный состав в системе Декстера для костного мозга человека. Оказалось, что такие культуры состоят из трех основных клеточных типов: макрофагов ($\approx 35\%$), гемопоэтических клеток ($\approx 5\%$) и негемопоэтических клеток ($\approx 60\%$). Авторам удалось очистить популяцию негемопоэтических клеток, свободных от макрофагов и кроветворных клеток, и доказать, что эта популяция является единым клеточным типом мезенхимальных клеток-предшественниц (МПК-мезенхимальная полипотентная клетка-предшественница) с коэкспрессией генов, специфичных для различных линий мезенхимальных клеток, включая адипоциты, остеобласты, фибробласты и мышечные клетки. Кроме того, авторы показали, что эти мульти- и полипотентные МПК способны поддерживать гемопоэз, демонстрируя экспрессию нескольких гемопоэтических факторов роста и рецепторы внеклеточного матрикса: G-CSF, CSF, VCAM-1, ICAM-1, ALCAM. Полученные результаты дают основание говорить о новом понимании костномозговых стромальных клеток как о «единой клетке с многими лицами», что, по мнению авторов, будет способствовать дальнейшему расширению наших знаний по регуляции клеточных взаимодействий в костном мозге.

Культуры гемопоэтических клеток при некоторых нарушениях гемопоэза

Разработанные методы клонирования нормальных гемопоэтических клеток-предшественниц были использованы для клонирования лейкозных бластов, в частности лейкозных клеток острого миелолейкоза - (КОЕ-ОМЛ) [Buick et al., 1979; Minden et al., 1979]. К настоящему времени наибольшая информация получена для КОЕ-

ОМЛ из всех лейкозных КОЕ. Как известно, при ОМЛ подавляется нормальный миелопоэз с развитием панцитопении. В 1965 г. А.И. Воробьев выдвинул гипотезу, согласно которой подавление нормального гемопоэза при острых лейкозах связано не только с гипер- и метаплазией лейкозных клеток, вытесняющих нормальные гемопоэтические клетки, но и с продукцией лейкозными клетками каких-то гуморальных факторов, ингибирующих нормальный гемопоэз. Эта гипотеза подтверждена в последующих многочисленных исследованиях при культивировании кроветворных клеток больных острым лейкозом. Так, оказалось, что при ОМЛ и остром лимфобластном лейкозе клетки периферической крови не вырабатывают CSF в отличие от клеток периферической крови здоровых доноров [Chervenick, Lo Buglio, 1972]; у таких больных снижен плазменный уровень CSF [Moore et al., 1975]. Показано также, что сыворотка больных ОМЛ подавляет рост в культуре КОЕ-Ф и гемопоэз в органных культурах здоровых доноров (Колесникова А.И. и соавт., 1977). Идентифицирована ингибирующая активность лейкозными клетками (Broxmeyer et al., 1981, 1987). Охарактеризованы клетки, продуцирующие гуморальные ингибиторы у больных ОМЛ по их физическим свойствам и мембранным маркерам [Olofsson et al., 1984]. Получен рекомбинантный препарат человеческих кислых изоферритинов, который подавляет рост КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕсмеш в культуре независимо от присутствия или отсутствия сыворотки, моноцитов и Т-лимфоцитов [Broxmeyer et al., 1987].

При клонировании лейкозных клонов чаще формирование колоний не было автономным и требовало ростостимулирующих факторов. Несмотря на морфологическую гомогенность клеток ОМЛ, лишь малая фракция оказывалась способной к формированию колоний.

В начальных исследованиях для клонирования КОЕ-ОМЛ в двухслойной системе агара в качестве источника CSF использовали лейкоциты периферической крови донора, КС из клеточных линий или из человеческой плаценты. В этих условиях эффективность колониеобразования (ЭКО) была низкой, преобладали кластеры. Более эффективным оказался фидерный слой из ФГА-Л. В последующих исследованиях ФГА стали добавлять непосредственно в культуру или использовали комбинацию ФГА и КС из плаценты человека (Dicke et al., 1983). Использование метилцеллюлозы и среды, кондиционированной лейкоцитами периферической крови, стимулированными ФГА (ФГА-ЛКС) с повторным добавлением свежей КС во время культивирования, позволило повысить ЭКО до 80-90% [Marie et al., 1983; Swart et al., 1982]. Представлялось важным выяснить, с чем же связана вы-

Таблица 6

Действие различных рекомбинантных CSF человека на нормальные и лейкозные клоногенные клетки-предшественницы						
CSF	Ростостимулирующая активность					
	КОЕ-ГММ	БОЕ-Э	КОЕ-ГМ	КОЕ-М	КОЕ-Г	КОЕ-ОМЛ
M-CSF	-	-	-	+	-	-
G-CSF	-	-	+	-	+	+
GM-CSF	+	+	+	+	+	+
IL3	+	+	+	+	+	+

Примечание. Знак плюс - есть эффект, знак минус - нет эффекта.

сокая ЭКО в ФГА-стимулированных культурах. Поскольку ФГА-стимулированные клетки, как известно, выделяют большое количество лимфокинов, включая и гемopoэтические факторы роста, такие факторы могут быть и регуляторами пролиферации КОЕ-ОМЛ. Исследования с очищенным CSF позволяют ответить на этот вопрос. Эксперименты с рекомбинантным человеческим GM-CSF (из гена, нормально экспрессируемого Т-лимфоцитами) показали, что этот фактор - главный фактор роста КОЕ-ОМЛ, но, как оказалось, не единственный [Griffin et al., 1986]. В табл. 6 приведены эффекты различных рекомбинантных CSF на рост КОЕ.

Оказалось, что IL-3, как и GM-CSF, индуцирует пролиферацию КОЕ-ОМЛ, при этом G-CSF в комбинации с GM-CSF оказывает синергическое действие на КОЕ-ОМЛ, в то время как M-CSF влияния на КОЕ-ОМЛ не оказывает.

В 1986 D.Young и I.Griffin описали 3 случая (из 15 изученных) ОМЛ, в которых клетки пролиферировали автономно *in vitro*. В 2 случаях клетки секретируют GM-CSF, который стимулировал рост гранулоцитарных, моноцитарных и эозинофильных КОЕ в культурах нормального костного мозга человека. Следовательно, в некоторых случаях КОЕ-ОМЛ имеют ген для продукции GM-CSF. Однако такое сообщение является пока единственным.

Клоногенные клетки ОМЛ, как оказалось, имеют некоторые общие с нормальными миелоидными клетками-предшественницами свойства, и в частности высокий индекс «тимидинового самоубийства» (Marie et al., 1983; Minden et al., 1978), что свидетельствует о том, что КОЕ-ОМЛ являются активно пролиферирующими, способными к самоподдержанию (Buick et al., 1979; Chang et al., 1980), а также к ограниченной, хотя и ненормальной, дифференцировке до непролиферирующих клеток (Griffin et al., 1986).

КОЕ-ОМЛ в пересевных культурах (1-й пересев) различны у разных больных по ЭКО, но она в динамике у одного и того же больного стабильна. При этом вторичные колонии имеют тот же размер и ту же морфологию, что и первичные культуры. С увеличением числа пересевов ЭКО снижается и после 4-го пересева КОЕ-ОМЛ теряют способность к колониеобразованию (Griffin

et al., 1986). Следовательно, лейкозные клоны могут быть организованы аналогично нормальному миелопоэзу с иерархией клеток-предшественниц.

J.Griffin и B.Lowenberg (1986), анализируя данные ряда работ по мембранным маркерам на нормальных миелоидных клетках-предшественниках и на КОЕ-ОМЛ, пришли к выводу о том, что клоногенные клетки при ОМЛ во время колониеобразования подвергаются абберрантному типу дифференцировки и в большинстве случаев потеря пролиферативного потенциала, способности к самоподдержанию сопровождается появлением белков, что отражает клеточную дифференцировку. Этот процесс происходит «спонтанно» в присутствии факторов роста, но дифференцировка может быть ускорена добавлением специальных химических агентов - индукторов дифференцировки (диметилсульфоксид, флороболовые диэстеры или γ -интерферон) [Koeffler, Golde, 1980; Chang, McCulloch, 1981; Ferrero et al., 1985; Nara, McCulloch, 1985]. Эти агенты являются потенциальными индукторами дифференцировки клеток лейкозной линии, в частности HL60, а также «свежих» лейкозных клеток в суспензионных культурах, в то время как КОЕ-ГМ не является эффективным индуктором лейкозных линий человека. Предстоит в дальнейшем выяснить роль таких агентов в дифференцировке клоногенных лейкозных клеток.

Если в полутвердых средах КОЕ-ОМЛ пролиферируют в течение короткого периода времени (несколько дней), то в суспензионных культурах при добавлении ФГА-ЛКС они могут пролиферировать длительно (до 70 дней), при этом экспоненциальный рост происходит в течение нескольких недель [Nara, McCulloch, 1985].

Клетки ОМЛ могут также расти и в длительных культурах (в системе Декстера), но, как правило, КОЕ-ОМЛ в этих культурах растут хуже, чем нормальные гемopoэтические клетки-предшественницы [Colombel et al., 1985]. Обычно не удается вырастить прилипающий слой в таких культурах костного мозга больных ОМЛ [Schotzel, Lowenberg, 1985]. При добавлении к сформировавшейся подложке КОЕ-ОМЛ проли-

ферируют недолго и быстро подвергаются дифференцировке. Однако N. Sato et al. (1983) показали, что длительный рост клеток ОМЛ в таких культурах может быть индуцирован при их совместном культивировании с нормальными стромальными клетками костного мозга и в присутствии GM-CSF.

Существенный прогресс в идентификации мембранных антигенов нормальных клеток-предшественниц и по их фенотипам с использованием целых панелей моноклональных антител к клеткам предшественниц позволил определять различные стадии их дифференцировки. Изучение фенотипов для лейкозных клоногенных клеток показало, что КОЕ-ОМЛ не содержат специфических антигенов и некоторые антитела, реагирующие с КОЕ-ОМЛ, реагируют также с более зрелыми клетками-предшественницами [Lowenberg, Bauman, 1985]. Оказалось, что фенотип КОЕ-ОМЛ варьирует у разных больных. В 1/3 случаев фенотипы КОЕ-ОМЛ были сравнимы с фенотипами КОЕ-ГЭММ и более ранних клеток, в то время как в 2/3 случаев фенотипы КОЕ-ОМЛ были аналогичны фенотипам коммитированных клеток-предшественниц (7- или 14-суточные КОЕ-ГМ) [Griffin et al., 1986]. Ненормальная дифференцировка при ОМЛ проявляется в большой вариативности фенотипа для КОЕ-ОМЛ и наличием фенотипов, не обнаруженных для нормальных клеток. Не только наличие или отсутствие определенных клеточных маркеров, но и их плотность могут свидетельствовать о ненормальных классах фенотипов [Delvel et al., 1986]. При сравнении фенотипов клоногенных клеток ОМЛ и циркулирующих лейкозных клеток показано, что дифференцировка, хотя и неполная, часто aberrантная, аналогична в обоих случаях, что может свидетельствовать о том, что *in vitro* пролиферируют не самые ранние лейкозные клетки-предшественницы, а их потомки [Griffin et al., 1986], и поэтому нужна дальнейшая оптимизация культуральных условий для идентификации наименее зрелых КОЕ-ОМЛ.

J. Griffin и B. Lowenberg (1986), анализируя литературные данные по мембранным маркерам лейкозных клеток, пришли к выводу о том, что клоногенные клетки ОМЛ могут образовываться на разных стадиях гемопоэза у разных больных от КОЕ-ГЭММ, ранних (14 суток) и поздних (7 суток) КОЕ-ГМ и даже из миелобластов, при этом в большинстве случаев ОМЛ возникает из КОЕ-ГМ. Такое предположение подтверждается и данными, полученными с помощью анализа изоферментов Г-6-ФДГ [Fialkow et al., 1981].

Многие исследователи проанализировали характер роста колоний из лейкозных клеток и прогноз заболевания, найдя корреляцию между ними. Так, нормализация числа колоний, кардио-

типа колониеобразующих клеток, морфологические признаки созревания клеток в колониях могут служить индикаторами ремиссии [Moore et al., 1974; Spitzer et al., 1977; McCulloch, 1985]. Напротив, ненормальный характер роста колоний служит вестником обострения заболевания. Другие исследователи сделали попытку соотнести сниженную чувствительность КОЕ-ОМЛ к CSF с возможностью ремиссии. Так, у больных, имеющих высокий порог чувствительности к CSF, вероятность ремиссии была сниженной (Francis et al., 1985). J. Griffin и соавторы (1986) обнаружили, что снижение ЭКО в первичных культурах (1-й пассаж) позитивно коррелирует с успешной индукцией ремиссии; напротив, высокая ЭКО в перевивных культурах коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения ОМЛ.

Клональная система была использована для определения чувствительности КОЕ-ОМЛ к химиопрепаратам *in vitro* и сравнения этой чувствительности с клиническим эффектом *in vivo*. В опытах с антрациклинами обнаружено, что гибель клеток достигала максимума уже через 10 мин после инкубации их с препаратами [Buick et al., 1979], при этом более длительная экспозиция [Georgoulas et al., 1985] не увеличивала гибели КОЕ-ОМЛ. Результаты были идентичными при использовании свежих или хранившихся при глубоком замораживании лейкозных бластов. Чувствительность КОЕ-ОМЛ *in vitro* к цитозинарабинозиду и антрациклинам и индукция полной ремиссии оказывались в позитивной корреляции в большинстве исследований. Клональный метод был использован и для оценки эффекта новых химиопрепаратов, а также для оценки эффекта индукторов дифференцировки, таких, как интерферон [Taetle et al., 1980] и ретиноиды [Douer et al., 1982; Lawrence et al., 1987].

В настоящее время тестирование КОЕ-ОМЛ на чувствительность к лекарственным препаратам пока еще не стало повсеместным по ряду причин. Во-первых, ответ может быть получен не раньше, чем через 7 суток. Во-вторых, еще не определены стандартные методы, которые позволили бы сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. С. Wang и E. McCulloch (1987) показали, что КОЕ-ОМЛ наиболее чувствительны к арабинозиду, когда они пролиферируют в суспензионной культуре, чем при формировании колоний в метилцеллюлозе, что, как оказалось, было связано с большей способностью указанного препарата ингибировать самоподдержание КОЕ-ОМЛ, чем клеточное деление вообще. Поэтому, по мнению автора работы, суспензионные культуры могут оказаться надежным методом для тестирования чувствительности клоногенных лейкозных клеток к химиопрепаратам. Суспензионные культуры оказались ценной системой для оценки эффекта рекомби-

нантных факторов роста на пролиферацию и дифференцировку КОЕ-ОМЛ. Так, Т. Hoang и соавт. (1986), изучая эффект рекомбинантного человеческого GM-CSF на рост КОЕ-ОМЛ, показали, что этот фактор роста стимулирует не только формирование колоний в метилцеллюлозе, но и пролиферацию КОЕ-ОМЛ в суспензионной культуре. В связи с этим, использовать GM-CSF в терапевтических целях, по крайней мере при ОМЛ, нужно осторожно.

Таким образом, клоногенные клетки при ОМЛ оказались наиболее изученными, относительно мало информации имеется для клоногенных клеток при других вариантах острого лейкоза. Наиболее скудный рост в культуре получен для лейкозных промиелоцитов. S. Tugu и соавторы (1982), изучая пролиферативную активность *in vitro* и *in vivo* клеток костного мозга у 7 больных острым промиелоцитарным лейкозом, нашли, что во всех случаях низкий митотический индекс метки с H_3 -тимидином в лейкозных промиелоцитах коррелировали со скудным ростом колоний в метилцеллюлозных культурах, в которых преобладали кластеры или колонии вообще отсутствовали. Митотический индекс лейкозных клеток в культуре был очень низким на протяжении всего периода культивирования. При этом выявлена высокая чувствительность лейкозных промиелоцитарных клеток к дауномицину.

М. Томопага и соавт. (1987) описали случай формирования колоний из лейкозных бластов у больного острым недифференцированным лейкозом в метилцеллюлозе с добавлением ЭРП. Эти колонии выросли в культуре наряду с эритроцитарными бурстами и идентифицировались как лейкозные, идентичные с исходными лейкозными бластами, с помощью цитологического и цитогенетического анализа. Такие колонии не формировались в других культуральных системах с использованием других источников CSF, в том числе и ФГА-ЛКС. Лейкозные клоны проявили дозовую зависимость к ЭРП, а в клетках и колониях по мере роста появлялись ультраструктурные признаки эритроцитарной дифференцировки. Исследователи пришли к выводу, что у больного был острый малодифференцированный эритролейкоз. При повторных трансфузиях нормальных эритроцитов такому больному заметно уменьшилось число лейкозных клеток, т.е., была достигнута частичная ремиссия.

Показана важность клональных культур при миелодиспластических синдромах. Так, Н. Наак и соавт. (1986), изучая характер роста в культуре клеток костного мозга от 20 здоровых доноров, 41 больного с различными миелодисплазиями и 19 больных острыми нелимфоцитарными лейкозами, показали, что при клинически стабильном миелодиспластическом синдроме характер рос-

та клоногенных клеток и чувствительность их к CSF (ЛКС и ФГА-ЛКС) была в пределах нормы. С прогрессированием бластной трансформации нормальный рост колоний нарушался, повышался рост кластеров. Кластеры, чувствительные к высоким дозам CSF, персистировали после 14 дней культивирования и, по мнению авторов, могли представлять «ранние» клоногенные клетки, причем их появление сопровождалось увеличением числа бластных клеток у больного. Кластеры, формируемые «поздними» (7 суток) клоногенными клетками, были найдены также в нормальном костном мозге и при стабильном миелодиспластическом синдроме. При острых нелимфоцитарных лейкозах нарушения колониеобразования были более глубокими; эти результаты согласуются с данными литературы при анализе роста КОЕ-ОМЛ. Еще раньше был выявлен рост бластных колоний в культурах клеток периферической крови у 18 из 25 обследованных больных с предлейкозными состояниями; при этом КОЕ-Бл оказались активно пролиферирующими [Senn et al., 1982].

Описаны пролиферация и дифференцировка бластных клеток в жидкой и метилцеллюлозной культурах у больного с синдромом Дауна и с транзитным миелопротеративным синдромом [Suda et al., 1987]. В крови такого больного обнаружены выраженный лейкоцитоз и большое количество бластов. В качестве источника CSF в этом случае использовали ФГА-ЛКС, ЭКО была высокой (примерно 50%). При этом показана способность бластов дифференцироваться в базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги и эритроциты, что было подтверждено цитохимическим, электронномикроскопическим и иммунологическими исследованиями. Рекомбинантный GM-CSF поддерживал дифференцировку нейтрофилов, эозинофилов, но не базофилов.

Большое количество работ по изучению характера роста клоногенных клеток-предшественниц у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) обобщены I. Shah и соавт. (1983). Показана клиническая значимость клональных методов при дифференциальной диагностике ХМЛ и лейкомоидных реакций. При ХМЛ, в отличие от лейкомоидных реакций, повышено содержание КОЕ-ГМ как в костном мозге, так и в периферической крови. Получена новая линия лейкозных клеток человека с Ph-хромосомой [Rimmer et al., 1986]. Т. Маекава и соавт. (1986) сообщили о потере у больных ХМЛ способности Т-клеток продуцировать ингибиторы гранулопоэза (но не эритропоэза), хотя продукция такими клетками CSF и БПА после аллоантигенной стимуляции *in vitro* была идентична таковой для нормальных Т-клеток. На основе полученных данных авторы делают заключение, что выявленное свойство Т-

клеток у больных ХМЛ, связанное с потерей способности продуцировать ингибиторы гранулопоэза, ответственно за преимущественную стимуляцию гранулопоэза у больных ХМЛ. Однако такое предположение должно быть подтверждено в опытах с высокоочищенными как клетками-предшественницами, так и факторами роста.

В настоящее время имеется много работ по вовлечению натуральных киллеров в регуляцию гемопоэза, однако данные их крайне противоречивы. F. Negtman и соавт. (1984), анализируя причины такой вариабельности, пришли к заключению, что это может быть связано с гетерогенной субпопуляцией натуральных киллеров. Они изучали эффекты клонов с различными фенотипами, выделенных из периферической крови здоровых лиц, на пролиферацию высокоочищенных нормальных гемопоэтических клеток-предшественниц (КОЕ-ГМ, КОЕсмеш, БОЕ-Э, КОЕ-Э). Все изученные клоны, хотя и в разной степени, подавляли колониюобразование в культуре. Ни одна из клеточных линий не стимулировала рост колоний ни одним из изученных типов клоногенных клеток и не выделяла гуморальных факторов роста. Проведение подобных исследований у больных с различными заболеваниями системы крови способствовало выяснению механизмов их развития. Известно, что подавление гемопоэза, обусловленного Т-лимфоцитами, играет важную роль в патогенезе апластической анемии у ряда больных. T. Hanada и соавт. (1986) анализировали ингибирующую активность клеток у таких больных серийно - в течение заболевания и после ремиссии, обусловленной трансплантацией аутологичного костного мозга. Они подтвердили, что Т-клетки теряют ингибирующую активность в результате лечения и эта потеря предшествует гематологической ремиссии. K. Mangat и соавт. (1986) показали, что анемия у больных с тимомой и гипогаммаглобулинемией обусловлена аутореактивными Т-клетками, подавляющими рост БОЕ-Э и КОЕ-Э. Такие клетки были представлены преимущественно субпопуляциями T1, T3, T8 и Ia⁺. Лечение циклофосфаном и кортикостероидами уменьшало число лимфоцитов в костном мозге в 4 раза и сопровождалось восстановлением эритропоэза.

Tennant и соавт. (1991) исследовали рост колоний и кластеров из КОЕ-ГМ периферической крови у 172 здоровых доноров и 147 больных с миелодиспластическим синдромом (предлейкозами). Они показали, что изменение соотношения колонии - кластеры в пользу кластеров (скоплений, содержащих менее 50 клеток) является индикатором высокого риска развития острого лейкоза и такие больные, по мнению авторов, должны быть выделены в группу риска.

Охарактеризованы эритроцитарные клетки-предшественницы (КОЕ-Э, БОЕ-Э) у больных эритремией [Varet et al., 1981; Casadevall et al., 1990]. Показано, что в костном мозге у таких больных сосуществуют две популяции КОЕ-Э: одна - с нормальной чувствительностью к ЭРП, другая - с повышенной чувствительностью к ЭРП. Эта ненормальная популяция КОЕ-Э чувствительна даже к следовым количествам ЭРП в культуре и, по мнению авторов, вероятно, ответственна за развитие полицитемии, несмотря на низкий уровень ЭРП в крови. Аналогично КОЕ-Э, при таком заболевании в костном мозге сосуществуют и две популяции БОЕ-Э. Спонтанное колониюобразование в культуре из эритроцитарных клеток-предшественниц (без добавления в культуру экзогенного ЭРП) стало использоваться в клинике для дифференциальной диагностики истинной полицитемии на ранних стадиях клинической манифестации и вторичных эритроцитозов. При вторичных эритроцитозах оно никогда не наблюдается.

В культуре клеток от больных лимфоцитарной лимфомой получен рост смешанных колоний, состоящих из базофильных, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, эритробластов, макрофагов, мегакариоцитов, Т-клеток различных фенотипов и В-клеток [Fauser et al., 1985], что является прямым экспериментальным подтверждением существования общей клетки-предшественницы миело- и лимфопоэза. Однако в культурах нормального костного мозга таких колоний пока не получено.

Изучена концентрация КОЕ-Ф в костном мозге у 368 пациентов с различными заболеваниями [Домрачева Е.В. и соавт., 1980]. У здоровых доноров она составляет в среднем $4,7 \pm 1,7$ КОЕ-Ф в расчете на 10^5 миелокариоцитов. Существенно выше, чем в контрольной группе, обнаружено содержание КОЕ-Ф в костном мозге больных туберкулезом легких, саркомами костей и лимфогранулематозом, что, по-видимому, связано с реактивными изменениями стромы у этих больных. Для 110 больных лимфогранулематозом содержание КОЕ-Ф в костном мозге составило в среднем $9,1 \pm 0,6$, колеблясь у разных лиц от 0,2 до 57,0. При этом не выявлено существенной разницы в зависимости от стадии заболевания и степени активности процесса. Изучение содержания КОЕ-Ф в костном мозге больных с различными заболеваниями системы крови выявило существенное их снижение у больных острым промиелоцитарным лейкозом, миелоаплазиями и остеомиелосклерозом. В остальных случаях существенной разницы по сравнению с контрольной группой не получено. Возможно, что отсутствие выраженной клинической значимости колониюобразования из КОЕ-Ф связано, в первую очередь, с высокой вариабель-

ностью числа КОЕ-Ф у лиц разного возраста, а также с тем, что оценка эффективности колониобразования проводилась по общему числу формирующихся колоний фибробластов.

Изучена радиочувствительность КОЕ-Ф, содержащихся в костном мозге у 75 первичных больных с различными заболеваниями при действии γ -лучей ^{60}Co [Колесникова А.И. и соавт., 1981]. Значения средней клеточной летальной дозы D_0 у разных лиц существенно варьировали и находились в пределах 0,68-2,27 Гр. По своей радиочувствительности КОЕ-Ф, содержащиеся в костном мозге больных с туберкулезом легких, саркомами костей, гемобластозами, лимфогрануломатозом, у 2 здоровых доноров существенно не различаются, хотя имеется тенденция к более высокой радиорезистентности КОЕ-Ф у больных лимфогрануломатозом и хроническим миелолейкозом, значения D_0 для КОЕ-Ф которых составили в среднем 1,5 Гр, а максимальные значения D_0 превышают 2,0 Гр. В остальных случаях значения D_0 - порядка 1,0 Гр, т.е. по своей радиочувствительности КОЕ-Ф костного мозга у больных с туберкулезом легких, саркомами костей, а также у больных острым лейкозом, лимфосаркомой, миеломой аналогичны КОЕ-С мышей. В этих исследованиях оценка параметров выживаемости КОЕ-Ф проводилась также по общему числу колоний фибробластов.

Гемопоэтические факторы роста

Интенсивные исследования ростостимулирующих факторов для гемопоэтических клеток показали, что полипотентные стволовые кроветворные клетки по мере созревания постепенно теряют свою полипотентность и способность к самоподдержанию, а клетки-предшественницы для различных ростков становятся чувствительными к специфическим факторам роста, названным колониестимулирующими факторами - CSF. К настоящему времени выявлена целая группа гликопротеинов - гормональных факторов роста, продуцируемых различными клетками. Оказалось, что практически все мышечные ткани содержат гемопоэтические факторы роста [Metcalf, 1984] и, в связи с этим, автором было высказано предположение о том, что синтезируют факторы роста (цитокины) клетки, общие для всех органов: фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты, макрофаги. Такое предположение было подтверждено многочисленными исследованиями. Аналогично мышечным тканям, многие ткани человека оказались способными синтезировать CSF. В последние годы проклонированы гены ряда мышечных и человеческих факторов роста, получены и очищены их рекомбинантные формы, что позволяет получать их в больших количествах, необходимых для проведения мас-

совых исследований по их действию, идентификации субстанций, в которых они могли бы использоваться в терапевтических целях. В табл. 7 приведены наиболее изученные рекомбинантные цитокины человеческого происхождения и их основные биологические эффекты. В настоящее время за рубежом налажена технология их производства, в том числе и мышечных рекомбинантных цитокинов, среди которых IL насчитывается 12, а не 11, как среди рекомбинантных цитокинов человеческого происхождения. IL-12 модулирует лимфопоз.

Однако появились сообщения о том, что пролиферативный эффект некоторых изученных гемопоэтических факторов роста (IL-1, IL-3, IL-6) может быть отнесен к генетическим нарушениям, связанным с хромосомными делециями; в условиях *in vivo* факторы роста могут влиять на предлейкозные клетки и на уровне взаимоотношений между лейкозными, предлейкозными и нормальными гемопоэтическими клонами [Resnitzky, Naran, 1994]. Факторы роста могут быть мутагенными факторами и вызывать лейкозную трансформацию гемопоэтических клеток. Поэтому в клинике их следует применять с большой осторожностью. Тем не менее, IL-3 прошёл клинические испытания при лечении больных с апластической анемией [Nimer et al., 1994]. При этом показано, при таком заболевании целесообразнее всего использовать комбинацию факторов роста.

Перспективы клеточных культур в гематологии

Трудно проанализировать все данные, полученные с помощью клональных методов культивирования гемопоэтических клеток-предшественниц. Бесспорной и очевидной оказалась не только их важность при анализе гемопоэза и его регуляции в норме и при различных нарушениях, но и их практическая значимость для диагностики таких заболеваний, прогнозирования течения заболевания, контроля за эффективностью проводимой терапии. Клональные методы широко используются при аутологичной и аллогенной трансплантации костного мозга человека для оценки качества донорского трансплантата (свежего, криоконсервированного), для контроля за эффективностью его приживания у реципиента [Bacigalupo et al., 1986; Messner, 1986; Sanders et al., 1986; Vellenga et al., 1987]. Клональная система для Т-клеток человека используется как функциональный контроль за качеством костного мозга, предназначенного для аллогенной трансплантации, освобождения его от Т-клеток, ответственных за отторжение трансплантата [Faracet et al., 1986; Lewitt et al., 1985]. Представляется перспективным для анализа лейкозных

Рекомбинантные цитокины человеческого происхождения	
Название цитокина	Биологические эффекты
Эритропоэтин-ЭРП	Регулирует эритропоэз, стимулируя пролиферацию и дифференцировку эритроцитарных клеток-предшественниц (БОЕ-Э, КОЕ-Э)
G-CSF	Активирует пролиферацию и дифференцировку гранулоцитарных клеток-предшественниц (КОЕ-Г), действует на примитивные гемопоэтические предшественники, индуцирует накопление в крови различных миелоидных клеток-предшественников (КОЕсмеш, КОЕ-ГМ, БОЕ-Э)
GM-CSF	Стимулирует пролиферацию и дифференцировку гранулоцитарно-макрофагальных клеток-предшественниц (КОЕ-ГМ), а также БОЕ-Э
IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF α , INF γ	<u>Подробная характеристика этих цитокинов представлена в разделе «Лимфоциты и иммунокомпетентная система»</u>
IL-3	Стимулирует пролиферацию и дифференцировку полипотентных гемопоэтических стволовых и различных коммитированных предшественников, а также тучных клеток
IL-11	Плеотропный цитокин с множественными эффектами на гемопоэтические и негемопоэтические клеточные популяции. Стимулирует рост и поддержание мышинных гемопоэтических предшественников в жидкой суспензионной культуре (в сочетании с другими гемопоэтическими факторами роста)
ФСК	Плеотропный цитокин, действующий, в первую очередь, на ранние стадии гемопоэза. Стимулирует пролиферацию миелоидных эритроцитарных и лимфоидных клеток-предшественниц в культурах костного мозга, действует синергически с множеством других CSF
Тромбопоэтин ТПО	Ключевой регулятор мегакариопоэза и тромбопоэза in vivo и in vitro. Стимулирует пролиферацию и дифференцировку мегакариоцитов
INF α	Стимулирует макрофаги, НК- и В-клетки, обладает противовирусной активностью
ФРФ	Хемотактик и митоген для эндотелиальных клеток, стимулирует пролиферацию широкого ряда клеток, включая астроциты и меланоциты

клеток человека использовать клональную систему в комбинации с флюороцитометрическим методом, позволяющим сортировать клетки по стадиям клеточного цикла. Первые такие исследования уже проведены [Park et al., 1987]. При этом лейкозные клетки костного мозга человека рассортировали по фракциям G₀/G₁, G₂/M и S. Оказалось, что клетки фракции G₀/G₁ успешно формировали колонии в культуре, хотя эффективность клонирования была ниже, чем для нефракционированных лейкозных клеток. Такой способ позволяет изучать кинетику субпопуляций клоногенных клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла, биоптатах опухолей.

Большое внимание уделяется изучению циркулирующих гемопоэтических клеток-предшественниц у человека, поскольку они наиболее доступны для анализа при оценке эффективности различных воздействий in vivo в динамике. Кроме того, циркулирующие клоногенные клетки (КОЕ-Г, КОЕ-ГМ) используются для аутотранс-

плантации у больных острым лейкозом в период индукции ремиссии. Так, H. Tilly и соавт. (1986), определяя ежедневно число циркулирующих КОЕ-ГМ во время восстановления гемопоэза и после индукционной терапии у больных острым лейкозом, нашли, что максимум КОЕ-ГМ в периферической крови, превышающий в 10 раз уровень их в крови здоровых доноров, наблюдается в период между 17-м и 23-м днем после окончания химиотерапии и поддерживается в течение 2-10 дней; при этом пик числа тромбоцитов на 2-7 дней опережает наступление пика числа КОЕ-ГМ. Именно этот срок (17-23 сут.) после начала ремиссии авторы рекомендуют использовать для выделения КОЕ-ГМ цитаферезом для последующей их аутотрансплантации.

Кроме того, с получением рекомбинантных цитокинов для иммобилизации стволовых клеток периферической крови без предварительной химиотерапии стал широко использоваться в трансплантации G-CSF [Sato et al., 1994; Suzue et al., 1994]. Эффективность этого цитокина про-

демонстрирована в экспериментальных работах Roberts и Metcalf (1994), показавших, что G-CSF через 8 дней подкожного введения мышам повышает в крови в 570 раз, а в селезенке в 620 раз содержание различных миелоидных клеток-предшественниц (КОЕ-Г, КОЕ-ГМ, КОЕ-М, КОЕ-Э, КОЕ-Бл).

Как отметили Репин В.С. и Сухих Г.Т. (1998), клетки человека в культуре открыли эру прямого изучения многих болезней человека в эксперименте. Авторы особо подчеркивают перспективность новой цитотехнологии - разделения раковых и стволовых гемопоэтических клеток, ауто-трансплантации последних раковым больным после сублетального их облучения. Следует подчеркнуть, что для этой цели (очистка гемопоэтических клеток от примеси лейкозной клеточной популяции) в последние 10 лет уже используются длительные культуры костного мозга больных лейкозами (ОМЛ, ХМЛ) [Testa et al., 1991]. В таких культурах происходит элиминация, в первую очередь, лейкозной клеточной популяции, а сохранившиеся нормальные гемопоэтические клетки пересаживаются обратно больным с целью получения ремиссии.

Исследования с моноклональными антителами сделали революцию в гематологии. Они не только определяют фенотипические характеристики нормальных и опухолевых клеток, но и используются для получения концентратов стволовых клеток, а также зрелых клеток различных ростков кроветворения. Кроме того, такие моноклональные антитела используются для разделения нормальных и опухолевых клеток. Получены коктейли антител для выделения концентратов человеческих клеток (Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, гемопоэтических клеток-предшественниц, моноцитов, базофилов, гранулоцитов, эпителиальных опухолевых клеток, дендритных клеток, коммитированных клеток из образцов ХМЛ), а также для очистки различных клеточных популяций от примеси других клеток [Lansdorp, Thomas, 1990; Bhata et al., 1997].

В последние 5-7 лет интенсивно развиваются исследования по культивированию эмбриональных клеток [Keller et al., 1993]. Это направление исследований представляется весьма перспективным, поскольку показано, что в таких культурах содержатся клетки-предшественницы для различных тканей и органов, в том числе и для гемопоэтической ткани. Пока разработана только мышиная модель *in vitro* (жидкие культуры), обеспечивающая поддержание роста недифференцированных ЭК *in vitro*. Для предотвращения спонтанной дифференцировки ЭК на первом этапе в такие культуры добавляется мышинный лейкоингибирующий фактор (LIF). В последующие сроки клетки пересеиваются в метилцел-

люлозные культуры, в которых в присутствии соответствующих гемопоэтических факторов роста вырастают колонии из клеток-предшественниц для различных ростков кроветворения. Таким образом, в культурах эмбриональных клеток моделируется кроветворение на самых ранних этапах его развития, что позволяет осуществлять генетические манипуляции, изучать мутагенез, фенотипические характеристики самых ранних гемопоэтических клеточных типов [Ling, Neben, 1997]. Для человека такая модель пока еще не разработана, хотя источник для изучения эмбриогенеза у человека в культуре имеется - фетальный абортный материал. По всей вероятности, в ближайшие годы это направление будет активно развиваться.

При лечении гемофилий отработана технология пересадки гена VIII фактора в фибробласты, трансплантация которых, в отличие от трансплантации гепатоцитов или спленоцитов, не так травматична. Были получены трансфицированные линии мышей, продуцирующих VIII фактор человека. Получены трансфицированные клоны фибробластов кожи собак, в хромосомы которых был встроен ген фактора IX человека. Это дает временный эффект (на 2 недели). Получена первичная культура фибробластов от пациентов с болезнью Кристмаса (дефицит IX фактора коагуляции). Эти клетки были трансфицированы геном коагуляции IX с помощью мутантного ретровируса с устойчивой экспрессией гена фактора IX. Предполагается пересадить трансфицированные фибробласты больным-гемофиликам. Предпринимаются попытки создать трансфицированные клоны гемопоэтических клеток-предшественниц с высокой экспрессией гена фактора VIII или IX.

Использование методов клонирования гемопоэтических и стромальных клеток-предшественниц оказалось перспективным не только для экспериментальной и клинической гематологии. Они оказались чрезвычайно важными и перспективными для радиобиологии, поскольку позволяют оценивать эффекты ионизирующих излучений на гемопоэз на уровне клеток стволового типа, являющихся предшественницами для различных ростков гемопоэза и гемопоэтической стромы не только у животных, но и у человека. Они также важны для оценки состояния стромы и кроветворения в ближайшие и отдаленные сроки после радиотерапии по поводу различных злокачественных опухолей, для сравнительной оценки разных видов ионизирующего излучения, для оценки эффекта радиомодификаторов. Кроме того, методы клонирования гемопоэтических клеток послужили основой для разработки методов клонирования клеток из различных негематологических опухолей человека и животных, позволяющих определять долю клоногенных

клеток в различных опухолях, их реакцию на облучение и химиотерапевтические препараты, анализировать эффекты радиомодификаторов. Все это чрезвычайно важно для построения рациональных схем терапии опухолей и контроля за эффективностью лечения. Использование клональных методов культивирования нормальных и опухолевых клеток в радиобиологии позволило разработать новое научное направление - радиобиологию клоногенных клеток-предшественниц нормальных и опухолевых тканей человека и животных [Конопляников А.Г., 1984; Колесникова А.И., 1989].

Представляется перспективным дальнейшее проведение исследований гетерогенности КОЕ-Ф, что позволит охарактеризовать различные субпопуляции КОЕ-Ф, являющиеся важным компонентом гемопоэтического микроокружения, при ряде заболеваний системы крови, а также в реализации радиационных повреждений кроветворения у онкологических больных в различные сроки после проведения терапевтического гамма-облучения различными дозами. Первые такие исследования проведены на модели боль-

ных лимфогранулематозом (ЛГР) [Данилова М.А. и соавт., 1997]. При этом показано, что в участках костного мозга, облученных в суммарных дозах 20-25 Гр, в среднем через полгода происходит восстановление функциональной активности гемопоэза. Регенерация стромы при таких дозах происходит преимущественно за счет более радиорезистентной субпопуляции КОЕ-Ф, формирующей в культуре рыхлые колонии-клоны фибробластов. Облучение костного мозга в суммарных дозах, превышающих 35 Гр, вызывает стойкую необратимую аплазию, прослеженную в сроки до 18-23 лет после проведения локального терапевтического облучения. Больные ЛГР до лечения имеют характерное для здоровых лиц соотношение двух изученных клонов субпопуляций КОЕ-Ф, формирующей в культуре плотные или рыхлые клоны. В отдаленные сроки после проведения лучевой терапии как в облученных, так и в необлученных участках костного мозга наблюдается значительное уменьшение числа КОЕ-Ф, обладающих большим пролиферативным потенциалом и формирующих в культуре плотные клоны.

РАДИОНУКЛИДНЫЕ МЕТОДЫ

Использование радионуклидных методов исследования в клинической гематологии позволяет получить диагностическую информацию в весьма широком диапазоне. Многие из них не имеют своих аналогов. Кроме того, они относительно просты в техническом исполнении и совершенно необременительны для больных.

Основной принцип методов заключается в радионуклидной метке различных клеток крови *in vitro* или *in vivo*. Для этой цели чаще используются такие радионуклиды как ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{51}Cr . Обычно применяются так называемые «индикаторные» или очень малые дозы метчиков, которые совершенно безопасны как для пациентов, так и для окружающих их людей. Методы, применяемые в гематологической практике, условно можно разделить на четыре группы:

- 1) метка эритроцитов (как собственных, так и донорских);
- 2) метка тромбоцитов (также собственных и донорских);
- 3) метка фагоцитирующих мононуклеарных клеток (*in vivo*);
- 4) метка лейкоцитов.

Последний метод пока не получил широкого практического использования и может представлять интерес при проведении научных исследований.

Радионуклидная метка эритроцитов

Радионуклидная метка собственных или донорских эритроцитов осуществляется в условиях *in vitro*. Производят забор крови в объеме 20 мл, в нее добавляют один из названных радионуклидных метчиков и инкубируют в течение 60 мин при температуре 37°C, и после отмывки эритроцитов физиологическим раствором меченые клетки готовы для реинфузии больным. На основе такой метки можно производить следующие исследования:

- измерение массы циркулирующих эритроцитов;
- определение продолжительности жизни эритроцитов;
- детекцию мест преимущественной секвестрации эритроцитов (селезенка, печень, внутрисосудисто) и степени ее выраженности;
- количественное определение скрытых желудочно-кишечных кровотечений.

Физические характеристики радиоактивного хрома, принципиальные обоснования метода и примеры расчетов подробно представлены в монографии Цфасмана А.З. Принцип метода заключается в том, что при добавлении метчика он проникает сквозь оболочку эритроцитов и прочно метит клетку. Например, при использовании ^{51}Cr , который выпускается в шестивалент-

ной форме, радионуклид, проникая внутрь клетки, превращается в двухвалентную форму. Двухвалентный хром обладает способностью образовывать устойчивый комплекс с гемоглобином, осуществляя тем самым прочную метку эритроцита. После разрушения клетки высвобождающаяся двухвалентная форма ^{51}Cr не способна к повторной метке эритроцитов, так как она лишена способности проникать сквозь его оболочку. Методика основана на принципе разведения *in vitro* меченых эритроцитов в кровеносном русле после их реинфузии. Вводится определенный, предварительно измеренный объем меченых эритроцитов с известным количеством радиоактивности. Затем определяется степень их разведения по содержанию метчика в пробе крови, взятой после реинфузии и путем простых вычислений определяется масса циркулирующих эритроцитов (МЦЭ). В норме МЦЭ составляет 30-40 мл на 1 кг массы исследуемого. С учетом гематокрита вычисляют общий объем циркулирующей крови. В норме он составляет 70-90 мл на кг массы. Объем плазмы есть не что иное, как разница между общим объемом крови и МЦЭ. В норме он колеблется от 40 до 50 мл/кг.

Описанная методика наиболее информативна при диагностике эритремии и дифференциальной диагностике ее с абсолютными и относительными эритроцитозами. Так, если при эритремии выявляется одновременное увеличение МЦЭ и общего объема крови, то при эритроцитозах меняется лишь один из этих показателей. В частности, при абсолютных эритроцитозах увеличивается МЦЭ, но не меняется общий объем циркулирующей крови. При относительных эритроцитозах МЦЭ существенно не меняется, однако уменьшается общий объем циркулирующей крови за счет плазмы. (Демидова А.В., 1985).

Определение продолжительности жизни эритроцитов. Методика радионуклидной метки позволяет определять время выживаемости собственных эритроцитов исследуемого и судить об интенсивности процессов их разрушения непосредственно по длительности жизни красных клеток. Она не имеет своих аналогов. Широко используемые традиционные приемы диагностики гемолиза (подсчет ретикулоцитов, определение непрямого билирубина, оценка степени раздражения костного мозга) являются лишь косвенными его показателями.

Суть методики заключается в реинфузии меченых эритроцитов и определении скорости падения радиоактивности в циркулирующей крови [Цфасман А.З., Мешине Е.Н., 1963, Сахибов Я.Д., Арипов А.Я., 1967]. Для этого в течение последующих 10 дней осуществляют 4-5 заборов

проб крови и измеряют их радиоактивность. По полученным данным строят графическую кривую в полулогарифмическом масштабе и по нему определяют время биологического полувыведения метчика. При использовании ^{51}Cr оно составляет 22-30 дней. При гемолитических процессах это время укорачивается в различной степени. Наибольшее укорочение продолжительности жизни эритроцитов регистрируется на высоте гемолитического криза. Например, при аутоиммунной гемолитической анемии оно может сокращаться до 2-4 дней, а при микросфероцитарной гемолитической анемии до - 5-6 дней. В периоды ремиссии или при относительно спокойном течении заболевания этот показатель может находиться на субнормальном уровне.

Тест весьма полезен в оценке лечебной эффективности операции спленэктомии. Так, повторное исследование больных вскоре после удаления селезенки (например, при наследственном микросфероцитозе) позволяет выявить нормализацию продолжительности жизни эритроцитов.

Тест прогнозирования лечебного эффекта спленэктомии при гемолитических анемиях. Реинфузия меченых эритроцитов больных гемолитическими анемиями позволяет вести динамическое наблюдение за интенсивностью радиоактивности на уровне селезенки, печени и сердца (кровь). Возможны 4 основных варианта результатов таких наблюдений:

- 1) повышенное накопление радиоактивности в селезенке - гемолиз преимущественно внутриселезеночный;
- 2) повышенное накопление радиоактивности в печени - гемолиз преимущественно внутрипеченочный;
- 3) повышенное накопление и в селезенке и в печени - гемолиз смешанный;
- 4) отсутствие повышенного накопления в обоих органах на фоне укорочения продолжительности жизни эритроцитов - гемолиз внутрисосудистый.

Максимальный лечебный эффект наблюдается в первом случае, частичный - при смешанном варианте гемолиза. При внутрипеченочном и внутрисосудистом вариантах реализации гемолитического процесса лечебный эффект спленэктомии может быть отрицательный [Сахибов Я.Д., 1978, 1980].

Количественное определение скрытых желудочно-кишечных кровотечений. Радионуклидная метка покидает эритроциты только при их разрушении и выделяется наружу через почки. Из этого следует, что естественных путей появления радиоактивной метки в просвете желудочно-кишечной трубки, строго говоря, не су-

ществует. Если она все же появляется, то это означает, что в просвете кишки появляются эритроциты - носители радиоактивной метки. Иными словами, речь может идти о факте желудочно-кишечного кровотечения.

Методика радионуклидной метки эритроцитов (как собственных, так и донорских) позволяет не только детектировать наличие кровоизлияния в желудочно-кишечную трубку, но и с достаточно высокой точностью (до 1 мл) определять количество излившейся крови. Для этого необходимо измерить радиоактивность в 1 мл крови и суточном количестве кала. Путем простых вычислений определяется ежесуточная потеря крови через желудочно-кишечный тракт. В норме количества суточных выделений радиоактивной метки эквивалентны не более чем 2 мл крови.

Описанный прием выявления и количественной оценки скрытых желудочно-кишечных кровотечений имеет высокую диагностическую ценность для выяснения источника кровотечений у больных с «рефрактерными» железодефицитными анемиями, возникшими на фоне «немой» язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, диафрагмальный грыжи, ранних, порой не распознанных опухолевых заболеваний желудочно-кишечного тракта, хронических воспалительных заболеваний тонкой и толстой кишки, скрытых форм геморроя и т.д. Например, в наших исследованиях, проведенных у более, чем 100 женщин, страдающих железодефицитными анемиями, обусловленных частыми родами и повышенными маточными кровотечениями, было показано, что почти в 20% случаев отягчающим фактором служили скрытые желудочно-кишечные кровотечения, составлявшие от 5 до 20 мл в сутки. Показано также, что при тромбоцитопенических состояниях (идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, острые лейкозы) при уровне тромбоцитов выше пятидесяти тысяч и отсутствии клинических признаков геморрагического синдрома возможны скрытые желудочно-кишечные кровотечения в объемах до 15-20 мл ежесуточно, а порой и больше. [Сахибов Я.Д. в соавт., 1989, 1990, 1991].

Радионуклидная метка тромбоцитов

Радионуклидная метка тромбоцитов осуществляется путем инкубации собственных или донорских пластинок с ^{111}In или ^{51}Cr . После реинфузии меченных указанными изотопами тромбоцитов осуществляют ежедневный забор проб крови до полного исчезновения радиоактивной метки в циркулирующей крови. В норме это происходит в течение 6-7 дней, что и обозначается как продолжительность жизни тромбоцитов.

Этот метод имеет весьма высокую диагностическую и научную ценность. В частности, при

его использовании у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой можно не только оценить интенсивность разрушения тромбоцитов, что само по себе весьма важно для оценки тяжести аутоагрессивного процесса, но и для уточнения мест преимущественного разрушения пластинок. Динамическая регистрация уровня радиоактивности над селезенкой и печенью позволяет получить дополнительную информацию о перспективности спленэктомии в каждом конкретном случае заболевания. Известно, что хороший лечебный эффект от операции наступает у 80 % больных. Использование метода радионуклидной метки тромбоцитов с динамическим *in vivo* счетом радиоактивности над уровнем селезенки и печени позволяет, в известной мере, прогнозировать будущий лечебный эффект от спленэктомии.

Описываемый метод оценки функции тромбоцитов по их выживаемости представляется весьма перспективным при изучении состояния тромбоцитарного звена гемостаза и приживляемости донорских тромбоцитов у больных гемобластозами. В частности, наши предварительные исследования донорских тромбоцитов у больных острыми лейкозами выявили значительное сокращение времени из выживаемости. Оно составляло не более 2-3 дней. Сравнительные же исследования больных эритремией показали, что выживаемость их собственных тромбоцитов составляла 6-8 дней. Эти данные дают основание ожидать, что продолжение таких исследований может пролить свет на природу ускоренного исчезновения перелитых донорских тромбоцитов и получить ответы на ряд вопросов:

1. Связано ли ускоренное исчезновение пластинок только лишь с их повышенной потребностью или же существуют дополнительные факторы их ускоренного разрушения.
2. Может ли данный метод служить тестом для определения оптимального количества и частоты переливания тромбоцитов для коррекции гемостаза в каждом конкретном случае заболевания и в особенности при проведении операции трансплантации костного мозга.
3. Как изменяется функция тромбоцитов при различных стадиях миелопролиферативных процессов (эритремия, сублейкемический миелоз, хронический миелолейкоз).

Это лишь часть вопросов, постановка которых представляется адекватной информативным возможностям радионуклидной метки собственных и донорских тромбоцитов. [Сахибов Я.Д. и соавт., 1992, 1995; Najean J. et al. 1998].

Исследование функционально-топографического состояния костного мозга

Метод радионуклидной визуализации костного мозга является относительно новым в практике клинической гематологии. Первые сообщения о нем появились лишь в начале 70-х годов. Принцип метода заключается в использовании способности мононуклеарных клеток костного мозга, селезенки и печени к фагоцитозу коллоидных частиц. Радионуклидная метка последних ^{99m}Tc позволяет путем гамма-сцинтиграфии получать визуальное изображение названных выше органов. Справедливости ради следует отметить, что гамма-сцинтиграфический метод исследования функции топографии костного мозга пока еще не имеет своих аналогов. К его преимуществам относятся возможность прижизненного получения визуального изображения больших массивов костного мозга необременительным для больного путем [Сахибов Я.Д. и соавт. 1979; Сахибов Я.Д. и Демидова А.Д., 1981, Сахибов Я.Д., 1981, 1986].

Не умаляя достоинств традиционных методов цито- и гистоморфологического исследования костного мозга (стерильная пункция и трепанобиопсия), следует подчеркнуть, что использования меченого коллоида позволяет получить не только статическую, но и динамическую информацию, позволяющую, наряду с топографией судить и о функции костного мозга.

В норме после введения меченых ^{99m}Tc коллоидных частиц гамма-сцинтиграфически визуализируется костный мозг плоских костей (позвонки, кости таза), а также в проксимальных концах плечевых и бедренных костей. Наибольшее диагностическое значение гамма-сцинтиграфия костного мозга имеет при гемолитических и апластических анемиях, острых лейкозах и миелопролиферативных процессах.

При гемолитических анемиях имеет место весьма выраженное расширение плацдарма кроветворения, выражающееся в появлении изображения функционирующего костного мозга, практически по всему костному скелету. При апластических анемиях, напротив, регистрируется сужение плацдарма кроветворения. Костный мозг визуализируется в обычных, указанных выше, местах. Однако интенсивность накопления радионуклида снижается, подчас пропорционально степени выраженности клинических проявлений болезни.

При острых лейкозах просматривается определенная закономерность между появлением и степенью выраженности патологического расширения плацдарма кроветворения (появление изображения костного мозга во всех группах

длинных трубчатых костей) со степенью бластемии.

Гамма-сцинтиграфическая картина костного мозга при миелопролиферативных процессах зависит от наличия и степени выраженности опухолевой прогрессии заболевания. Так, при хроническом миелолейкозе в развернутой стадии гамма-сцинтиграфическая картина костного мозга, как правило, не отличается от таковой в норме. Однако по мере прогрессирования заболевания в фазе предбластного обострения и особенно в стадии бластного криза наблюдается различная степень патологического расширения костного мозга.

Такая же связь между функционально-топографическим состоянием костного мозга и стадией заболевания наблюдается и при эритремии. Так, если в начальных периодах болезни (развернутая, без миелоидной метаплазии селезенки) гамма-сцинтиграфическая картина костного мозга существенно не отличается от нормы, то в стадии с миелоидной метаплазией селезенки и особенно в терминальной стадии (миелосфиброз) налицо знаки патологического расширения плацдарма кроветворения различной степени выраженности.

Особенностью гамма-сцинтиграфической картины костного мозга у больных сублейкемическим миелозом является расширение плацдарма кроветворения на периферические отделы костной системы при весьма отчетливом сужении его в центральных отделах скелета (позвонки, кости таза).

Исследования, проведенные у больных с хроническим лимфолейкозом, миеломной болезнью, не выявили каких либо существенных особенностей в функционально-топографическом состоянии костного мозга. На сцинтиграммах, как правило, визуализировался костный мозг в обычных участках скелета - позвонки, кости таза, проксимальные концы плечевых и бедренных костей.

Гамма-сцинтиграфия печени и селезенки

Радионуклидная *in vivo* метка мононуклеарных фагоцитирующих клеток, наряду с костным мозгом, позволяет получить визуальное гамма-сцинтиграфическое изображение печени и селезенки. Техника и возможности гамма-топографического исследования печени достаточно подробно изложены в специальных руководствах по радионуклидной диагностике [Лясс Ф.М. и соавт., 1986]. Несколько подробнее остановимся на методе радионуклидной визуализации селезенки, которая, как известно, является не только одним из основных органов лимфосистемы, но и потенциальным органом экстрамедуллярного кроветворения.

Преимуществом гамма-сцинтиграфии селезенки является то, что она может реализовываться одновременно с аналогичным исследованием костного мозга и печени после однократного введения метчика. Кроме того, она позволяет получить весьма наглядную информацию, доступную для оценки не только специалисту, но и практикующему врачу-клиницисту.

Исследование выполняется через 15-30 мин после внутривенного введения коллоида, меченного ^{99m}Tc в двух проекциях - передней и левой косой. В норме получают визуальное изображение селезенки овальной формы размером примерно 7 x 5 см, зафиксированное на бумаге, фотопленке или экране дисплея. Сцинтиграмма позволяет объективно судить о положении, размерах и грубых структурных нарушениях в органе (например, инфаркты селезенки). Все это, в свою очередь, помогает в дифференциальной диагностике неясных образований в левом верхнем квадранте живота (опухоли селезеночного угла толстой кишки, левой почки, различные кистозные образования). Следует подчеркнуть, что бывают случаи увеличения размеров селезенки преимущественно вверх, что не всегда с убедительностью удается распознать с помощью обычных клинических приемов. Известны также случаи наличия дополнительной селезенки. Последнее представляется особенно важным в случае сочетания такой патологии с гемолитическими анемиями и идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, так как «незамеченная» дополнительная селезенка может весьма серьезно ограничить ожидаемый лечебный эффект спленэктомии [Идельсон Л.И. и соавт. 1976].

Наряду с изучением функционально-топографического состояния печени и селезенки в гематологической практике возникает необходимость информации о скорости кровотока в портальной системе. Хорошо известны возможности широко внедренных в клиническую практику методов исследования портального кровотока. Это и рентгеноконтрастная спленопортография, рентгеноконтрастная ангиография, ультразвуковая доплерография. Однако наряду с многими преимуществами они не лишены и ряда недостатков: необходимость введения весьма больших объемов рентгеноконтрастных веществ, наличия дорогих ангиографических установок и подготовленных специалистов для эндоваскулярных манипуляций. В связи с этим, представляется весьма полезным инструментом для диагностических и научных целей при оценке состояния гепатобилиарной системы разработанный нами метод внутриселезеночной сцинтипортографии (Авторское свидетельство № 906517 от 21 X.1981 г.).

Суть метода заключается в следующем: внутриселезеночно вводится очень ограниченный объем раствора ^{99m}Tc -пертехнетата (не более 0,5 мл с последующей динамической регистрацией прохождения болуса через сосуды селезенки, портальной системы, печени до момента попадания его в правые полости сердца. Датчик гамма-камеры устанавливается таким образом, что исследуемые области попадают в поле его зрения. Компьютерная регистрация и обработка данных позволяют получить не только линейные параметры в пределах всей или интересующей зоны исследования, но и получить визуальную информацию состояния сосудов портальной системы.

Лимфосцинтиграфия

Не вызывает сомнений важность получения диагностической информации о состоянии тех участков лимфатической системы, которые не доступны общеклиническим методам исследования. В ряду инструментальных методов, способствующих решению этой проблемы (рентгеноконтрастная лимфография, ультразвуковое исследование, компьютерная томография) свое весьма определенное место занимает так называемая «непрямая» радионуклидная лимфосцинтиграфия. Она может быть осуществлена практически в любом крупном медицинском центре, оснащенном гамма-топографом или гамма-камерой. Не требует специальной подготовки лимфологов и овладения техникой эндолимфатического введения «контрастного» вещества. Радиофармпрепарат (коллоидные частицы, меченные ^{99m}Tc) вводят в межпальцевые пространства нижних конечностей и через несколько часов проводят гамма-сцинтиграфическую детекцию распределения радиометки в лимфосистеме тазовой и нижней парааортальной зон. При наличии опухолевого поражения лимфоузлов появляется асимметричность изображения названных групп узлов с появлением дефектов изображения. Полученную таким путем информацию, безусловно, трудно сравнивать с результатами прямых лимфографических исследований, но в качестве предварительного, скринирующего теста он может быть весьма полезен благодаря простоте исполнения и практически полной необременительности для больного [Морозов А.И. и соавт., 1984].

Общеклинические тесты радионуклидной диагностики

Наряду с радионуклидными тестами чисто гематологической направленности, в клинической практике могут быть широко использованы и радиологические методы исследований других органов и систем, информация о состоянии ко-

торых имеет важное значение. Речь идет о динамических и статических гамма-сцинтиграфических исследованиях таких систем, как гепатобилиарная, почечная, эндокринная и т.д. В качестве примера можно назвать токсикоаллергические гепатиты, развивающиеся у больных лейкозами при реализации программного полихи-

миотерапевтического лечения, опухолевые поражения печени у больных лимфогранулематозом, поражение почек при миеломной болезни и т.д. Однако, учитывая, что все общеклинические методы радионуклидной диагностики подробно изложены в соответствующих специальных руководствах, на них не останавливаемся.

КОМПЬЮТЕРНАЯ И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ

Рентгеновская томография с использованием ЭВМ - компьютерная томография (КТ) представляет собой восстановление с помощью специальных математических программ поперечного среза. Принципы восстановления изображения основаны на измерении ослабления тонкого слоя рентгеновского излучения, проходящего через объект. Точность конечного результата зависит от множества технических составляющих, таких, как качество рентгеновской трубки, количества и качества детекторов, алгоритма восстановления изображения и пр. В клиническую практику КТ внедрил Годфри Хаунсфилд (Godfrey Hounsfield), который изобрел метод в начале 70-х годов. За это достижение, которое многими врачами было признано революционным, Хаунсфилду, совместно с Алленом Кормаском (Allen Cormack) в 1979 г. была присуждена Нобелевская премия.

До 1975 г. компьютерные томографы из-за множества технических ограничений того времени, использовались только для исследования головного мозга. Однако бурное развитие техники привели к созданию приборов для исследования всего тела (рис. 25). Это стало возможным после разработки большой линейки детекторов

возможным визуализировать срезы любых частей тела.

Примерно с 1995 г. в клиническую практику была внедрена новая концепция компьютерной томографии: спиральная КТ (СКТ). Это позволило значительно сократить время обследования пациента (время оборота трубки от 0,5 с). Во время процедуры проводится непрерывное, поступательное движение стола и одновременное движение, непрерывно включенной, рентгеновской трубки (рис. 26). Таким образом, любая анатомическая область может быть изучена за одну задержку дыхания пациентом. После проведения томографии в таком режиме, восстановление изображения может быть выполнено с любой толщиной среза и с любым фильтром на большой матрице (512x512 элементов).

С использованием этой техники стало возможным не только получать высококачественные томограммы, но и выполнять 3-мерные реконструкции органов и КТ-ангиограммы. Компьютерная томография имеет значительно большее разрешение по контрастности, чем традиционная рентгенография. Однако зачастую этого оказывается все же недостаточно для дифференциации нормальных и патологических тканей.

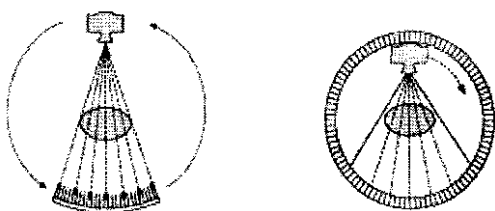


Рис. 25. Принципиальная схема компьютерных томографов 3-го и 4-го поколений.

(до 300 шт.), увеличения скорости вращения рентгеновской трубки (оборот за 3-6 с) и появления первичной матрицы компьютера (до 256x256 элементов). Произошел пересмотр областей применения компьютерной томографии, стало

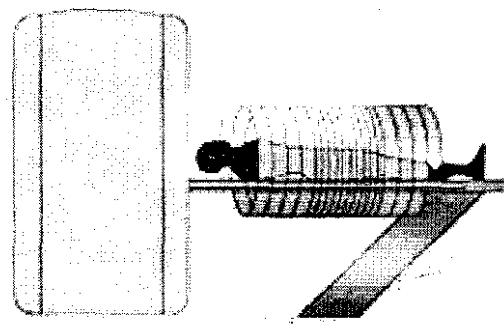


Рис. 26. Принципиальная схема спирального компьютерного томографа.

Поэтому при исследовании приходится внутривенно вводить контрастные вещества, кото-

рые повышают чувствительность КТ. Следует помнить, что различные виды контрастных веществ могут вызывать мягкие, умеренные или тяжелые аллергические реакции. Меньшие по количеству и тяжести реакции вызывают неионные мономерные и димерные контрастные средства. Они могут применяться в амбулаторных условиях и с меньшими предосторожностями. Способ введения контрастных веществ выбирается в зависимости от клинической задачи.

Наиболее полным можно считать выполнение исследования в следующей последовательности: 1) исследование без введения контрастного агента; 2) исследование той же зоны на высоте болюсного введения контраста («сосудистая» фаза); 3) отсроченная (3-5 мин) томография («паренхиматозная» фаза). На практике во многих клиниках зачастую проводят исследование, исключая 1-ю и 3-ю фазы. Это делается для увеличения пропускной способности аппарата и обычно лишь незначительно снижает информативность исследования.

Вместе с тем, дифференциация увеличенных лимфатических узлов и сосудов (особенно в средостении) без введения контрастных веществ удается не всегда. Наоборот, в брюшной полости и забрюшинном пространстве разница в плотности между лимфатическими узлами и окружающей жировой тканью бывает достаточна, чтобы оценить нормальные и измененные лимфатические узлы без введения контрастных веществ. На рис. 27 приводятся нормальные томограммы грудной клетки на высоте введения контрастного агента, а на серии томограмм (рис. 28) - изображения неизмененных органов и тканей брюшной полости на высоте контрастирования («сосудистая» фаза).

Компьютерная томография как цифровой метод визуализации позволяет проводить денситометрию различных тканей. За единицу денситометрии при КТ принимается ослабление ионизирующего излучения - единицы Хаунсфилда (НУ). Для этого используется искусственная шкала, где за 0 принимается плотность воды, за -1000 плотность воздуха, а за +3000 плотность компактного вещества кости. На денситометрию мягких тканей возлагали большие надежды при дифференциации патологических процессов. Однако в настоящее время данные денситометрии следует оценивать весьма осторожно. Это связано с ошибками, обусловленными различными артефактами, неточностями при измерениях и «усреднением» показателей в маленьком объекте.

Для исследования грудной клетки и средостения специальной подготовки пациентов не требуется. При исследовании брюшной полости, забрюшинного пространства и таза необходимо контрастирование пищеварительного канала.

Применение КТ в гематологической практике направлено на выявление патологического состояния лимфатических узлов и селезенки. Такие состояния могут возникнуть при инфекционных заболеваниях и злокачественных новообразованиях (как гематологических, так и при органических метастазах). КТ является одним из самых эффективных методов визуализации лимфатических узлов и других органов ретикуло-эндотелиальной системы.

Роль компьютерной томографии в выявлении вовлечения лимфатической системы в патологический процесс состоит в том, чтобы: 1) выявить поражение лимфатической системы в областях, недоступных для пальпации; 2) документировать взятие материала для цитологического исследования; 3) определить стадию заболевания; 4) определить эффективность проводимой терапии.

Поперечные срезы и использование спиральной КТ с внутривенным контрастированием позволяет в большинстве случаев визуализировать лимфатические узлы, оценивать их размер, количество и внутреннюю структуру. Правда, КТ не может отличить на основании плотности или внешнего вида злокачественные узлы от нормальных или увеличенных вследствие реактивных изменений. На ранних этапах метастазирования единственным критерием для дифференциации нормальных и патологически измененных лимфатических узлов является их размер (в качестве верхней границы нормы для узлов средостения большинство авторов приводят величину 10 мм). Иногда полезно проанализировать внешний вид лимфоузлов: узлы с четкими ровными контурами чаще бывают доброкачественными, а узлы неправильной формы, спаянные между собой могут быть злокачественными. Нормальные мезентериальные и забрюшинные узлы имеют меньший размер, чем средостенные. Подозрительными считаются узлы больше 6 мм, особенно образующие скопления и имеющие нечеткие границы.

КТ можно эффективно использовать для контроля реакции лимфатических узлов на терапию, контролируя изменения размеров. Несмотря на указанные ограничения, КТ остается лучшим методом визуализации органов лимфатической системы благодаря относительной простоте использования и интерпретации и отсутствию артефактов от соседних структур. Кроме того, КТ позволяет проводить пункционную биопсию патологических очагов в труднодоступных участках. Поэтому КТ стала хорошим инструментом для малоинвазивного гистологического подтверждения диагноза. Эта роль КТ будет в дальнейшем возрастать, так как подобные методики распространяются все шире. Помимо того, развивается сфера применения молекуляр-

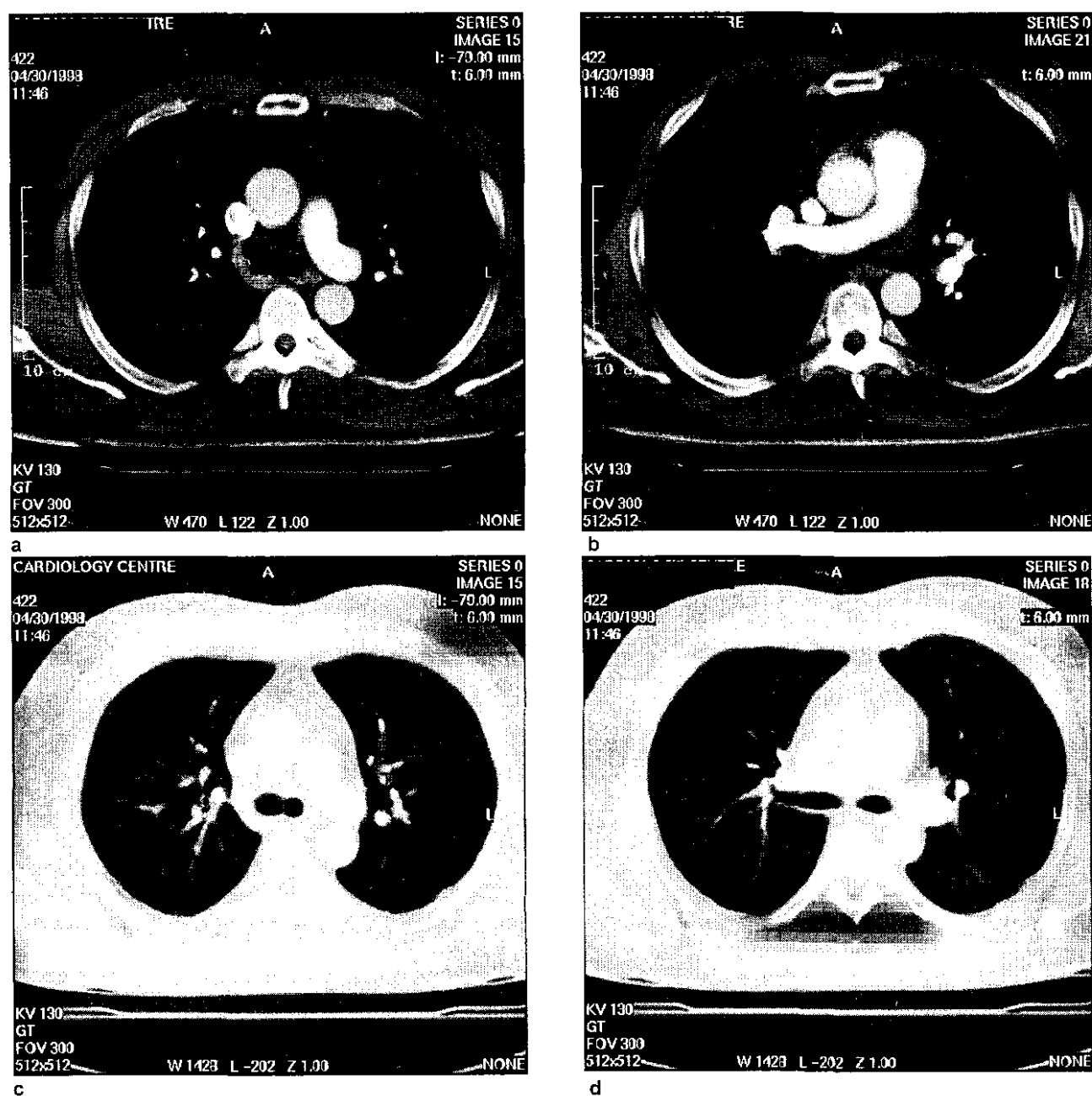


Рис. 27. Нормальные томограммы грудной клетки на высоте введения контрастного вещества (артериальная фаза, 20 с) (а, b - мягкотканное; с, d - легочное «окно»).

но-генетических маркеров, обеспечивающих специфическую и чувствительную диагностику, требующую минимальных количеств биологического материала.

Общепризнано, что основным методом определения стадий лимфопролиферативных заболеваний является КТ. Болезнь Ходжкина поражает преимущественно группы срединно расположенных лимфатических узлов: медиастинальной, паракардиальной и парааортальной областей. Более чем у 60% больных лимфогранулематозом болезнь проявляется в виде медиастинальной лимфаденопатии. Неходжкинские лимфомы поражают преимущественно узлы пери-

ферических областей - подмышечные, мезентериальные, паховые. Только 20% неходжкинских лимфом связаны с поражением лимфатических узлов средостения. Кроме того, болезнь Ходжкина чаще локализуется и распространяется на лимфоузлы прилежащих областей, редко "перепрыгивая" через другие региональные узлы. Неходжкинская лимфома чаще всего имеет множественный или диффузный характер и может легко распространяться на относительно удаленные области. Таким образом, при неходжкинской лимфоме для точного определения стадии необходимо исследовать все тело. При лимфогранулематозе поражаются соседние области.

Большинство пораженных узлов увеличены, они выявляются при КТ с точностью более 90%.

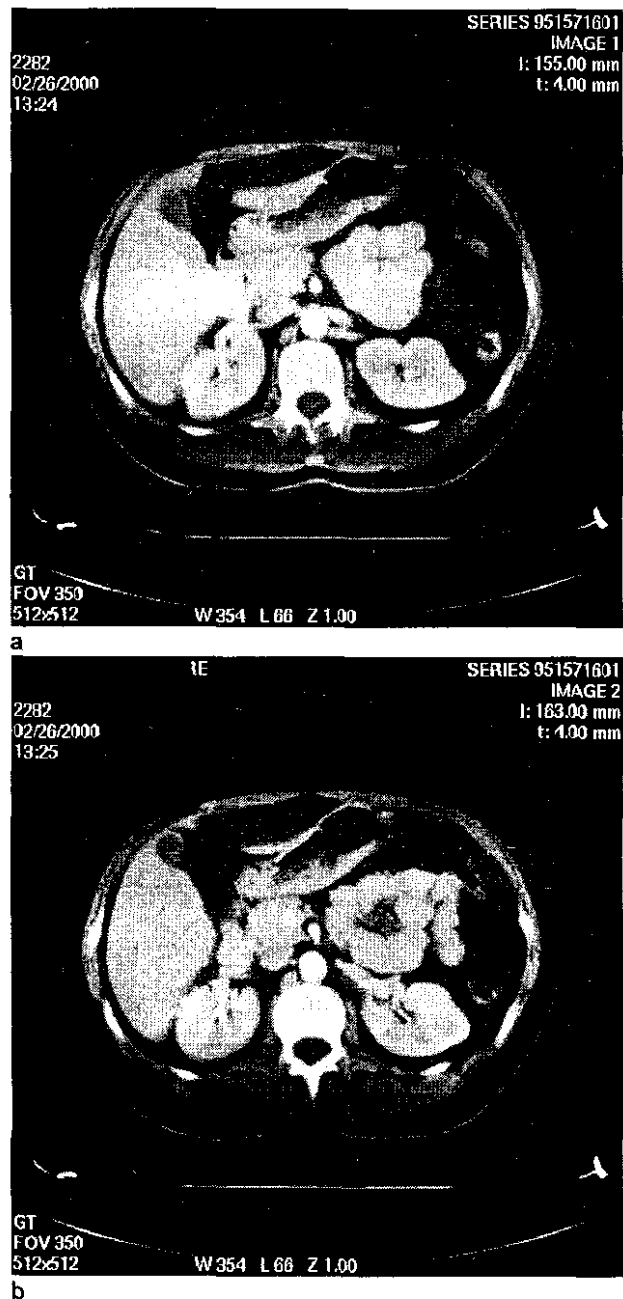


Рис. 28 (а, б). Нормальные томограммы брюшной полости на фоне внутривенного контрастного усиления.

Микроскопические и диффузные патологические очаги в печени, селезенке и костном мозге определить с помощью КТ сложно. При фокальном поражении этих органов КТ хорошо выявляет патологические очаги.

Для нелеченой лимфомы не характерна кальцификация конгломератов лимфатических узлов, но при КТ, проведенной после лечения, особенно лучевой терапии, кальцификаты обычно выявляются.

КТ является важнейшим методом выявления метастазирования злокачественных опухолей в лимфоузлы. При любом новообразовании вовлечение региональных и отдаленных лимфатических узлов связано с неблагоприятным прогнозом. Например, при раке легкого КТ исследование лимфоузлов грудной клетки является ключевым моментом для установления стадии рака легкого. Сочетание КТ с позитрон-эмиссионной томографией (ПЭТ) с FDG-глюкозой позволяют повысить точность диагностики метастатического поражения лимфатических узлов. Считается, что противопоказанием к хирургическому вмешательству является вовлечение контралатеральных и отдаленных узлов, а также узлов верхнего средостения. КТ играет важную роль в выявлении поражения этих узлов. По возможности следует провести исследование с болюсным контрастным усилением, так как в этом случае легче различить кровеносные сосуды, воздухоносные пути и прилежащие объемные образования.

При раке молочной железы оправдана КТ грудной клетки для оценки поражения внутренних лимфатических узлов молочной железы и подмышечной лимфоаденопатии. При опухолях головы и шеи абсолютно необходима оценка глубоких лимфатических узлов с помощью КТ. По сообщениям некоторых исследователей, закономерности в динамике контрастного усиления изображений могут помочь в дифференциации доброкачественных и злокачественных узлов.

При использовании КТ необходимо помнить, что метод имеет и определенные ограничения. Снижается оптимизм исследователей в оценке возможности КТ выявлять малые либо диффузные патологические процессы в печени и селезенке, что ограничивает возможности метода в определении стадии лимфом. На основании денситометрии или визуально невозможно отличить лимфатические узлы со злокачественным ростом от реактивных лимфатических узлов.

Вместе с тем, КТ остается лучшим методом неинвазивной визуализации лимфатической системы. Она легко и быстро выполняется, позволяет проводить направленную, документированную пункционную биопсию, индивидуальную разметку для лучевой терапии и оценивать результаты лечения. Примеры КТ-изображений при заболеваниях органов лимфатической системы приведены на рис. 29-34.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) за последние годы стала одним из ведущих методов неинвазивной диагностики. С 70-х годов, когда принципы магнитного резонанса впервые стали использоваться для исследования человеческого тела, до сегодняшних дней этот метод

медицинской визуализации неузнаваемо изменился и продолжает быстро развиваться. Совершенствуется техническое оснащение, программное обеспечение, развиваются методики

вела к одному из самых выдающихся медицинских открытий XX века, сравнимому лишь с идеей Конрада Рентгена применять в медицине X-лучи. В 1946 г. двое ученых из США Фе-

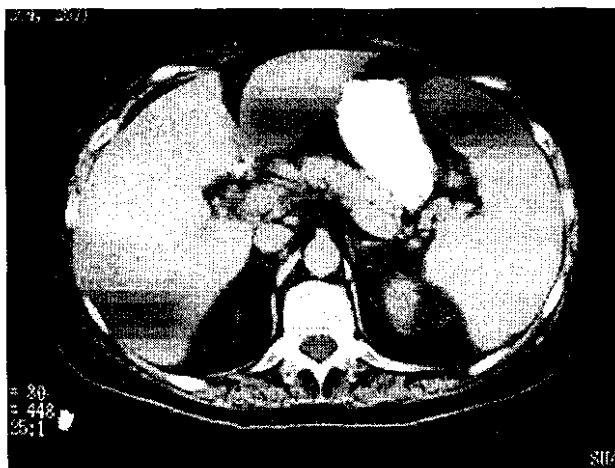


Рис. 29. КТ у пациента с саркоидозом. Отмечается увеличение ретрокавальных, парааортальных лимфатических узлов до 1-1,5 см.

получения изображений, разрабатываются парамагнитные и ферромагнитные контрастные препараты. Все это позволяет постоянно находить новые сферы применения МРТ. Если сначала область ее применения ограничивалась лишь исследованиями центральной нервной системы, то сейчас она с успехом применяется практически во всех областях медицины, в том числе и для изучения органов лимфатической системы.

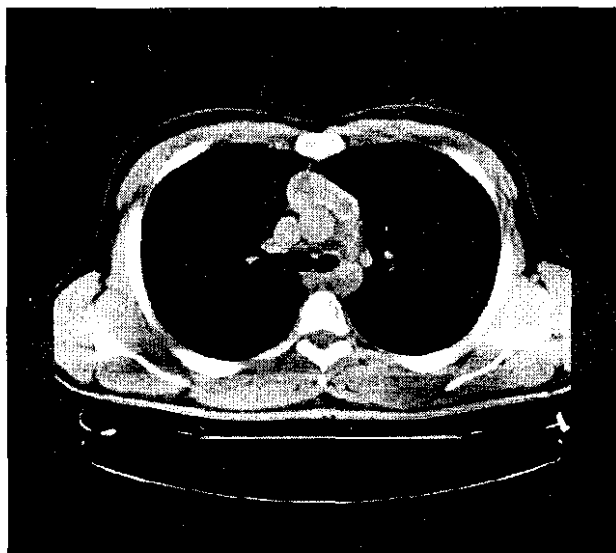


Рис. 30. КТ. Увеличение лимфатических узлов переднего средостения при лимфогранулематозе.

История развития МРТ непродолжительна, однако цепь находок в течение лишь 50 лет при-

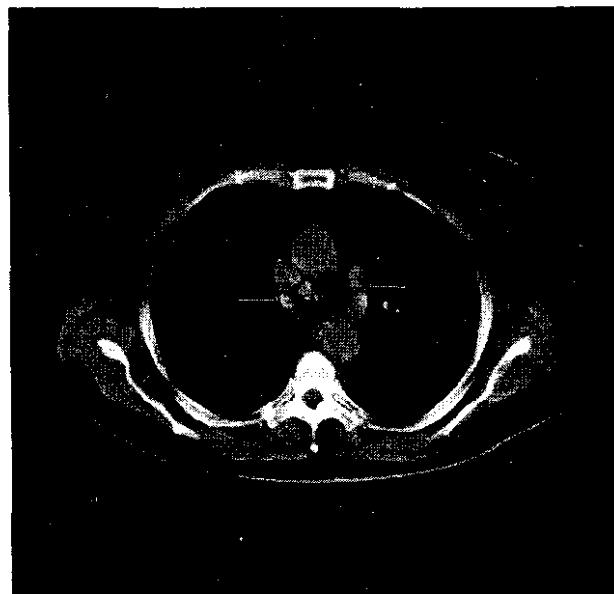


Рис. 31. Поражение забрюшинных лимфатических узлов при лимфосаркоме.

ликс Блох и Ричард Пурселл, независимо друг от друга, открыли явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для жидкостей и твердых тел. В 1952 г. оба они были удостоены Нобелевской премии по физике, а ЯМР начал использоваться в физической и органической химии, физике твердых тел, биофизике и биохимии. В 1972 г.



Рис. 32. Спленомегалия у пациента с лимфогранулематозом.

профессор Пол Лаутербур получил первое в мире двумерное ЯМР-изображение двух стеклян-

ных капилляров, заполненных жидкостью. Правда, на получение этого изображения ушло 4 ч 45 мин. Всего 8 лет потребовалось для появления в клинике первых МР-томографов для исследования всего тела (1980-1981). После включения ЯМР в число методов медицинской томографии прилагательное "ядерный" было опущено из соображений маркетинга и по настоянию специалистов по радиологии из-за того, что оно в массовом сознании связано с ядерным оружием или ядерными электростанциями, с которыми ЯМР не имеет ничего общего. Поэтому в наши дни используется уже термин магнитно-резонансная томография.



Рис. 33. Периферический рак легкого с метастазами в паратрахеальные лимфатические узлы.

Парк МР-томографов рос достаточно быстро - если в 1983 г. во всем мире было всего лишь несколько приборов для МР-томографии, пригодных для клинического использования, то к концу 2000 г. в мире работало, примерно, 20 000 томографов. В СССР первый МР-томограф был установлен в 1984 г. в отделе томографии кардиологического научного центра АМН. Там же в 1994 г. был установлен и первый сверхпроводящий томограф с высоким полем.

Кратко о сущности метода: магнитный резонанс - это физическое явление, основанное на свойствах некоторых атомных ядер при помещении их в магнитном поле поглощать энергию в радиочастотном (РЧ) диапазоне и излучать ее после прекращения воздействия РЧ-импульса. При этом напряженность постоянного магнитного поля и частота радиочастотного магнитного поля должны строго соответствовать друг другу, что и называется ядерным магнитным резонансом: ядерным - поскольку взаимодействие происходит только с магнитными моментами атом-

ных ядер, магнитным - так как эти моменты ориентированы постоянным магнитным полем, а изменение их ориентации вызывается радиочастотным магнитным полем, резонансом - поскольку параметры этих полей строго связаны между собой.

Наиболее интересными для медицины являются ядра ^1H , ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P , так как все они присутствуют в теле человека. Характер интенсивности сигнала в МРТ определяется, в основном, 4 параметрами: протонной плотностью (количеством протонов в исследуемой ткани), временем спин-решетчатой релаксации (T1), временем спин-спиновой релаксации (T2), движением или

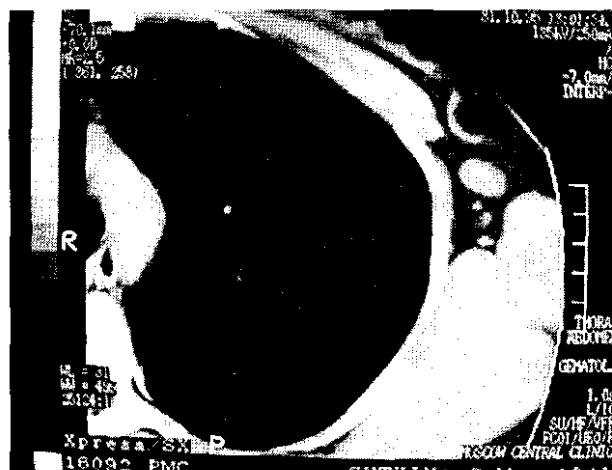


Рис. 34. Метастаз рака легкого в подмышечный лимфатический узел.

диффузией исследуемых структур. Для МРТ разработаны различные импульсные последовательности, которые, в зависимости от цели, определяют вклад того или иного параметра в интенсивность изображения исследуемых структур для получения оптимального контраста между нормальными и измененными тканями.

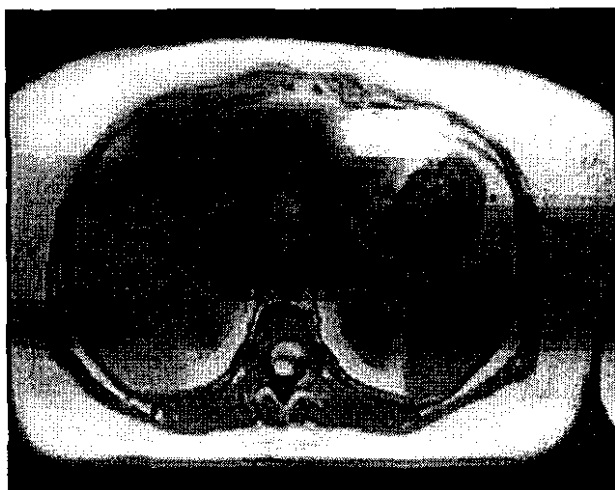
МРТ как методика визуализации имеет большие возможности контрастирования тканей, чем КТ. Как и при КТ, лимфатические узлы можно отличить от окружающей жировой ткани за счет разницы релаксационных характеристик. Тем не менее, не удалось выработать критерии дифференциации нормальных и патологически измененных лимфатических узлов на основании времен магнитной релаксации. МРТ хуже выявляет участки кальцификации, чем КТ. Из-за указанных ограничений, а также в связи с большой стоимостью и продолжительностью исследования при МРТ предпочтительным методом изучения патологии лимфатических узлов остается КТ, за исключением пациентов с аллергией на йодсодержащие контрастные препараты. При исследовании печени и селезенки МРТ так же точна, как и КТ, а в отдельных случаях с ее помощью

можно выявить диффузное или множественное мелкоочаговое поражение печени и селезенки, не обнаруживаемое при КТ. Считается, что при изучении печени и селезенки МРТ и КТ дополняют друг друга, поэтому часто они используются совместно у пациентов с выявленными злокачественными новообразованиями, когда необходимо точное исследование печени и селезенки. МРТ является точным методом выявления диффузных или очаговых поражений костного мозга. Во многих случаях при метастазах опухолей в костный мозг МРТ позволяет выявить их раньше, чем радионуклидные методы, не говоря уже о КТ. При таких формах первичного поражения костного мозга, как миелома и лимфома, МРТ костного мозга является самым точным ме-

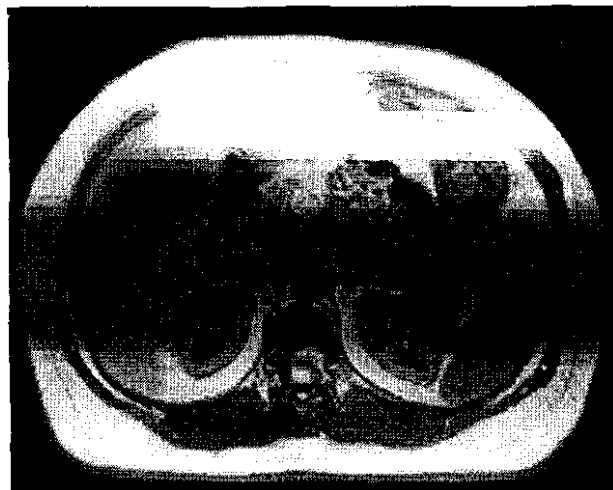
тодом определения распространенности и динамики поражения.

МРТ может помочь в обследовании пациентов с лимфомой, у которых опухоль подверглась частичной регрессии. Такие остаточные явления представляют собой фиброзное разрастание на месте подавленного опухолевого роста.

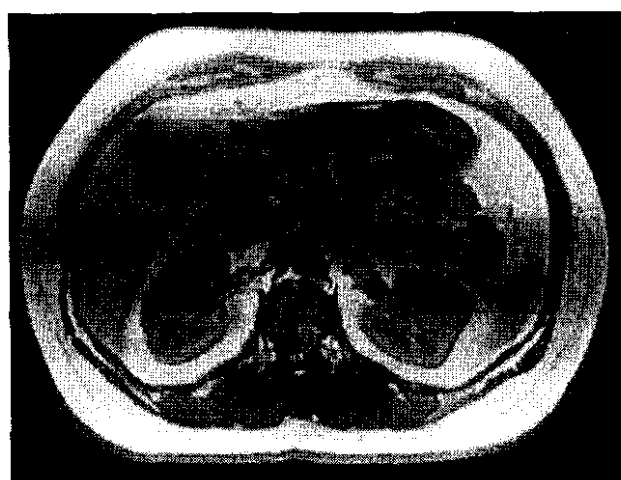
С помощью КТ отличить фиброз от остаточной активности опухоли невозможно. Чтобы расширить возможности выявления и исследования заболеваний лимфатической системы, для МРТ разработаны специальные контрастные препараты. Примеры МР-изображений в норме и при заболеваниях органов лимфатической системы приведены на рис. 35-37.



a



b



c

Рис. 35 (а, б, с). МРТ брюшной полости в норме. Поперечные срезы. Т1-взвешенные изображения.



Рис. 36. Очаг лимфоидной инфильтрации печени у пациента с лимфогранулематозом.

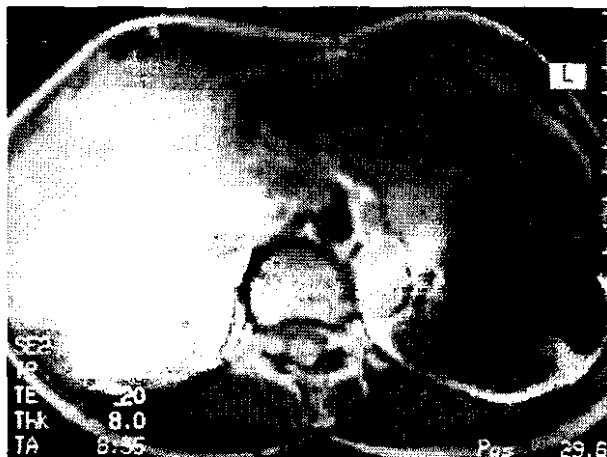


Рис. 37. Метастазы рака почки в парааортальные лимфатические узлы справа.

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ

ГРАНУЛОЦИТЫ

И.И. Мечников в 1880 г. впервые описал процесс миграции фагоцитов к месту повреждения и процесс фагоцитоза. Он связал процесс активности фагоцитоза со степенью защиты от инфекции и резистентностью организма к инфекции. В 1891 г. Пауль Эрлих применил окраску, позволившую дифференцировать клетки крови в цитологических препаратах. С этого времени исследования клеток крови длятся уже более ста лет, но многое в их биологической природе остается неясным.

Нейтрофилы

Цитоплазма нейтрофилов. На стадии метамиелоцита и последующих стадиях созревания редуцируются структуры, обеспечивающие синтез цитоплазматических белков, совершенствуется структура лизосом, обеспечивающих функцию нейтрофилов, усиливается способность к амебовидной подвижности, деформации, обеспечивающих подвижность и инвазивность гранулоцитов.

Первичные гранулы нейтрофилов возникают на стадии промиелоцита и активно развиваются на стадии миелоцита. *Вторичные гранулы*, называемые «специфическими», меньше первичных по размеру и формируются на более поздних стадиях созревания. Поверхностные структуры первичных и вторичных гранул содержат холестерин-фосфолипидные компоненты и протеины в различных соотношениях, формируются на поверхности лизосом. В зрелых гранулоцитах

соотношение вторичных и первичных гранул составляет 3:1. Зрелые первичные гранулы имеют в центре кристалловидную структуру, расположены на мембране лизосом, содержат ферменты и другие субстанции - кислую фосфатазу, эластазу, катепсин С, эстеразу, β -глюкуронидазу, β -галактозидазу, арилсульфатазу, 5'-нуклеозидазу, N-ацетил- β -глюкозаминидазу, α -маннозидазу, лизоцим, сульфатированные мукополисахариды и различные основные (щелочные) протеины [1, 9].

Наиболее важным ферментом первичных гранул считается миелопероксидаза, являющаяся катализатором многих процессов. Она энзим-маркер гранулоцитарного ряда и определяется гистохимическими, цитохимическими и биохимическими методами. Миелопероксидаза имеет высокую бактерицидную активность. При появлении в кровотоке влияет на эндотелий и развитие атеросклероза [51].

Во вторичных гранулах нейтрофилов содержится щелочная фосфатаза, но отсутствуют кислая фосфатаза и сульфатированные мукополисахариды. Кроме того, в них определяются аминопептидазы, лизоцим, коллагеназа, лактоферрин, В₁₂-связывающий белок, основные протеины. Щелочная фосфатаза обнаружена в нейтрофилах крови и экссудатов, но ее содержание сильно варьирует в зависимости от патологии. Лизоцим содержится во вторичных и в первичных гранулах, но во вторичных его значительно больше.

Третичные гранулы выделяются не всегда, появляются на стадии дочерних миелоцитов и возможно, содержат кислую фосфатазу.

Мембрана нейтрофилов. На предшественниках гранулоцитарного роста определяются CD34+CD33+, а также рецепторы для GM-CSF, G-CSF IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-12. Основными маркерами зрелых нейтрофилов периферической крови являются как общие маркеры клеток крови, так и гранулоцитарного ряда - CD10+CD11c+CD13+CD16+CD18+CD32+CD33+CD45+CD50. Специфическим считается сочетание нескольких гликопротеинов на мембране нейтрофила CDw18, представляющих мембранный гликопротеиновый комплекс. На мембране присутствуют также различные молекулы, являющиеся рецепторами для хемотаксических сигналов, к которым относятся CCF, N-формил-пептид (FMLP - N-формил-норлейцил-лейцил-фенилаланин), 5-й компонент комплемента (C5a), LTB₄, PAF [9].

Кинетика нейтрофилов. По способности к делению миелобласты, промиелоциты и миелоциты относятся к митотической группе, т.е. обладают способностью к делению, интенсивность которого падает от миелобласта к миелоциту [4]. Последующие этапы созревания нейтрофилов не связаны с делением. В костном мозге пролиферирующие клетки среди нейтрофилов составляют около 1/3, и столько же приходится на долю гранулоцитарных митозов среди всех пролиферирующих клеток костного мозга. В течение суток вырабатывается до $4,0 \times 10^9$ нейтрофилов на 1 кг массы тела.

Колебания митотической активности костного мозга связаны с гормональными, возрастными факторами и действием различных цитокинов и ростовых факторов. Длительность дифференцировки гранулоцита включает время на образование предшественников (длительность каждого митоза около 8 ч), образование унипотентного предшественника и первой стадии созревания (миелобласт) - 15 ч, затем время митоза и всего клеточного цикла увеличивается: у промиелоцита - 24 ч, у миелоцита - 104 ч. Исследование кинетики ранних стадий созревания - до миелоцитов включительно проводилось с помощью включения ³H-TdR (тимидина) в ядерную ДНК. Общее время генерации до стадии миелоцита составляет у человека от 96 до 144 ч [17]. Следующие стадии созревания были изучены с помощью радиоактивных меток (¹¹¹In, ⁵¹Cr, ³²F), которые включались в цитоплазматические белки [3]. Длительность созревания от метамиелоцита до зрелого нейтрофила составляла 6,6 дней, а от стадии промиелоцита - 11,4 дня.

Зрелые нейтрофилы в костномозговых синусах задерживаются на 3-4 дня. Часть из них

(30%) гибнет в костном мозге в апоптозе. Количество нейтрофилов в депо костного мозга в 10-20 раз превышает их содержание в кровотоке (костномозговой резерв). Количество вырабатываемых в костном мозге нейтрофилов составляет в среднем 160×10^7 /кг массы в сутки, в циркуляции находятся 32×10^7 клеток/кг.

Маргинальный пул нейтрофилов (сосудистый гранулоцитарный резерв), находящихся вне циркуляции у стенок сосудов, состоит в среднем из 29×10^7 /кг. Сроки пребывания нейтрофилов в циркуляции ($T_{1/2}$) - 4-10 ч. Мобилизация и выход в циркуляцию нейтрофилов из маргинального пула, по-видимому, связаны с влиянием нейромедиаторов. Мобилизация костномозгового нейтрофильного резерва, вероятно, зависит от влияния цитокинового спектра, изменяющегося при бактериальной инфекции, особенно септическом процессе, и сопровождается омоложением состава нейтрофилов.

Миграция и активация нейтрофилов. Максимальный выход и секвестрация нейтрофилов происходят в сосудах малого круга кровообращения и в системе портальной вены. Покинув сосудистое русло, нейтрофилы мигрируют в ткани, где осуществляют свою функцию, разрушаются или удаляются с содержимым желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей.

Миграция в ткани через эндотелий занимает несколько минут и происходит под влиянием хемотаксических факторов (IL-1, TNF α и др.), определяющих появление на эндотелиальных клетках адгезивных молекул - интегринов (VCAM). Эти молекулы связываются с гликопротеинами мембраны нейтрофила, составляющими мембранный гликопротеиновый комплекс CDw18. Антитела, направленные против антигенов этого комплекса, резко снижают адгезию и хемотаксис нейтрофилов [7]. Нарушение этого процесса может наблюдаться в старческом возрасте, когда могут появляться дефекты синтеза пептидных цепей CDw18-комплекса. При этом увеличивается частота хронических и возвратных инфекций.

После адгезии к эндотелию, у нейтрофила образуется псевдоподия, проникающая между эндотелиальными клетками. В этом процессе принимают участие различные молекулы, обеспечивающие хемоаттракцию - N-формил-пептид (FMLP - N-формил-норлейцил-лейцил-фенилаланин), 5-й компонент комплемента (C5a), LTB₄, PAF, CCF.

Взаимодействие лигандов с рецептором приводит к изменениям цитоскелета и образованию псевдоподии. Медиатором этого процесса служит протеин С. Дальнейшая миграция через базальную мембрану, перизндотелиальные клетки и прохождение по соединительнотканым струк-

турам (фибриллам коллагена) идет параллельно под влиянием тех же факторов. Эндотелиальные клетки при прохождении нейтрофила в норме не претерпевают морфологических изменений. Нейтрофилы, покинувшие кровеносное русло, обычно в кровоток не возвращаются. В дальнейшем нейтрофилы, как предполагают, путем пенетрации появляются в экскретах - слюне, моче и т.д. Количество их в выделяемых субстанциях коррелирует со степенью необходимой защиты, например, количество лейкоцитов в моче резко увеличивается при пиелонефрите, в норме определяются единичные клетки.

Нейтрофилы - основные участники защиты организма против бактериальной инфекции, инвазии и распространения грибов. В процессе адекватной стимуляции выработки нейтрофилов основная роль принадлежит $TNF\alpha$, G-CSF и IL-6. Основное влияние ростовых факторов и интерлейкина происходит в острую фазу, менее выражен эффект при хронической инфекции [29].

Функциональная полноценность и зрелость системы нейтрофилов у человека после рождения достигаются не сразу. У новорожденного нет адекватной продукции нейтрофилов и не вырабатываются или вырабатываются недостаточно многие другие факторы антибактериальной защиты (компоненты комплемента, фибронектин, IgA, IgG), а также хемотаксические факторы. Хемотаксис нейтрофилов, полученных из сосудов пупочного канатика, редуцирован по сравнению с взрослыми на 20-80%.

В старческом возрасте у нейтрофилов оказывается уменьшенной способность к фагоцитозу. Не исключено, что это имеет отношение к нарушению сложного механизма взаимодействия, так как при этом лимфоциты не только не снижают способности к производству цитокинов, но даже имеют тенденцию к его увеличению [19].

Показано, что способность справляться с инфекционными агентами и чужеродными, в том числе раковыми клетками, связана не только со специфическими механизмами распознавания, но и с неспецифическими механизмами защиты (хемотаксис, фагоцитоз, естественная цитотоксичность, цитокиновые эффекты), которые обеспечивают как первичную защиту от патогена, так и завершение процессов, стимулированных специфическими иммунными Т- и В-лимфоцитами. В этом процессе определенное значение придается системе фагоцитов и их способности к выработке цитокинов и молекул адгезии, которая с возрастом уменьшается.

Базовый уровень лейкоцитов в периферической крови $5,0-7,0 \times 10^9/\text{л}$. В течение суток и в зависимости от приема пищи этот уровень подвергается значительным колебаниям ($4,0-10,0 \times 10^9/\text{л}$). На содержание лейкоцитов дейст-

вуют значительные физические нагрузки (лейкоцитоз до $22,0-35,0 \times 10^9/\text{л}$ у спринтеров, который снижается до нормы через 1 ч), а также пребывание в некоторых климатических зонах (лейкопения у живущих в Антарктиде). Сильная боль, рвота могут вызвать кратковременный лейкоцитоз при отсутствии инфекции. Наркоз и барбитураты снижают содержание лейкоцитов. Заметный лейкоцитоз часто наблюдается при беременности. Значительное увеличение содержания нейтрофилов может наблюдаться при лечении кортикостероидами. При этом одновременно отмечаются эозинопения и лимфопения, наиболее заметные в течение 2-6 ч после приема. Эти изменения могут быть связаны со снижением выхода нейтрофилов из крови и увеличением клеточности в костном мозге [9].

При фагоцитозе материала нейтрофил выделяет большое количество биологически активных и цитотоксических веществ из внутриклеточных гранул в окружающую среду. При этом могут быть повреждены не только бактерии, но и клетки здоровой ткани.

Процесс взаимодействия нейтрофила с различными тканями активно изучается, так как появилась возможность обнаружить существенные моменты, определяющие патогенез хронического течения воспаления.

Не менее важным представляется изучение патогенеза послеоперационных инфекций и установления характера действия наркоза, опиоидов и анестетиков на активность фагоцитоза, а также на скорость переселения нейтрофилов через эндотелий в очаг поражения [24].

Получены данные о том, что интерлейкины IL-17 и IL-10, продуцируемые Т-лимфоцитами, оказывают опосредованное влияние на хемотаксис нейтрофилов, действуя на клетки, вырабатывающие IL-1 и $TNF\alpha$. Это очень важный механизм по защите от гипермобилизации нейтрофилов, что может приводить в повреждающему эффекту тканей, как это наблюдается при obstructивных заболеваниях легких [32].

Функциональная роль нейтрофилов. Главная задача нейтрофильного гранулоцита - захват и переваривание чужеродного материала. Другая важная функция - выработка и секреция ряда цитокинов.

И.И. Мечников в работах 1880 - 1908 гг. показал, что фагоциты мигрируют к очагу повреждения и воспаления, где контактируют непосредственно с чужеродным материалом, поглощают его и переваривают с помощью ферментов. Work, открывший опсоины в 1890 г., считал, что фагоциты играют только пассивную роль захвата опсонизированной частицы. Открытие антигенов и комплемента способствовало тому, что это мнение существовало до 30-40-х гг. Далее Wood

и Irgp продемонстрировали способность нейтрофилов захватывать и переваривать микроорганизмы и в отсутствие антител и факторов сывортки. К тому же этот процесс оказался активным и требовавшим большого количества энергии, осуществлялся как в присутствии кислорода, так в бескислородной среде. В этот же период были открыты энзимы и активные субстанции, содержащиеся в гранулах и осуществляющие свою функцию в составе фаголизосом.

В настоящее время фагоцитоз нейтрофилов рассматривается как сложный многоступенчатый процесс, включающий хемотаксис, способность клетки под влиянием хемотаксических факторов к передвижению и взаимодействию с различными клетками и тканевыми структурами, адгезию и агрегацию, распознавание и абсорбцию, опсонизацию, эндоцитоз, повреждение бактерий и их переваривание, аккумуляцию клеток в зоне повреждения, осуществление межклеточных взаимодействий.

Хемотаксическими факторами для осуществления миграции нейтрофилов и активации фагоцитоза нейтрофилов являются [44]:

- компоненты комплемента (C5a и низкомолекулярные остатки, образующиеся при активации системы комплемента),
- субстанции, вырабатываемые тучными клетками - LTB_4 и другие продукты окислирования арахидоновых кислот, PAF,
- продукты, секретируемые сенсibilизированными лимфоцитами, комплексы антиген-антитело,
- эндотоксин, олигопептиды, образуемые некоторыми бактериями,
- лизосомы с их содержимым, образующиеся при распаде нейтрофилов и макрофагов, продуцируемый нейтрофилами CCF, находящийся в кристаллических гранулах.

Специфические рецепторы для многих хемотаксических факторов уже найдены на мембране нейтрофила. От действия хемотаксических факторов и их концентрации зависит целый ряд специфических эффектов нейтрофилов (подвижность, секреция субстанций гранул, продукция супероксидов, дегрануляция и т.д.). Четкую зависимость от концентрации продемонстрировала реакция между структурами мембраны и лигандом N-формил-пептидом. Насыщение до 50% достигается за 30 с. К последствиям действия активационных механизмов относится изменение текучести мембраны и мембранного потенциала. При этом Fc-части агрегированных молекул IgG могут связываться непосредственно с липидным слоем мембраны и липосомами, что ведет к высвобождению медиаторов из лизосом. Эффект усиления текучести мембран снимается колхицином.

В течение нескольких секунд после стимуляции изменяется мембранный потенциал, увеличивается вход в клетку Na^+ и Ca^{++} , мобилизуется Ca^{++} , связанный с мембранами, и происходит изменение вязкости мембран. Кальций с поверхности мембраны поступает во внутриклеточное пространство. Через 20-60 с начинается дегрануляция, стимулируются окислительные реакции, в том числе поглощение кислорода и продукции перекисей [43].

Кроме низко- и высокомолекулярных компонентов комплемента, участие в активации фагоцитоза могут принимать и пептиды, образующиеся при процессинге других структур. Например, активатором фагоцитарной активности, идентифицированным как лейкокинин, оказался тетрапептид, выделенный из гаммаглобулина (синтезирован под названием «тафцин» (Tuftsin) [46]. Пептиды, выделенные из тучных клеток, участвуют в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Вазоактивные амины (брадикинин, серотонин и гистамин) имеют отношение к хемотаксической активности, но характер их воздействия на фагоцитоз нейтрофилов достоверно не установлен.

При встрече нейтрофила с чужеродным агентом происходит быстрое изменение метаболизма в соответствии с этапами фагоцитоза. Начальная фаза процесса фагоцитоза - эндоцитоз, когда инородный материал окружается частью мембраны и погружается в клетку, образуя внутри клетки вакуоль (фагосому). Этим эндоцитоз отличается от пиноцитоза, при котором чужеродный агент погружается в цитоплазму, проникая через мембрану, не нарушая ее целостности. Процесс образования фагосомы наблюдается только у нейтрофила, моноцита и макрофага. В минимальном количестве он наблюдается у эозинофила и базофила. Другим клеткам свойственен только пиноцитоз.

При образовании псевдоподии и вакуоли (фагосомы) принимают участие система микротрубочек и микрофиламенты. Захваченный опсонизированный материал содержит факторы комплемента, специфические антитела, лизоцим и некоторые другие факторы.

После образования фагосомы, с ее стенкой соединяются лизосомы и реализуется выход из гранул активных субстанций и переваривающих энзимов. Выход происходит быстро (от 30 с до 3 мин). Бактерия быстро погибает и переваривается. При этом происходят увеличение поглощения кислорода, увеличение активности гексозо-монофосфатного шунта, увеличение продуцирования перекиси водорода и супероксид-аниона, увеличение обмена липидов. Восстановление молекулярного кислорода до супероксид-аниона оксидазой, а затем превращение его в перекись водорода с помощью супероксид-дисмутазы

приводит к образованию высоко реактивных видов кислорода и стимуляции активности гексомонофосфатного шунта. В фагосоме обеспечивается низкий pH (3,4-4,0). Перекись водорода вместе с ионами галогенов (хлорид, иодид) и миелопероксидазой, в качестве основного катализатора, образуют мощную киллерную систему [43].

Если частицы, подвергающиеся фагоцитозу, слишком велики, происходит процесс «обратного эндоцитоза» - дегрануляция и высвобождение содержимого лизосом во внеклеточное пространство.

Внутриклеточное движение биологически активных субстратов происходит в вакуолях в три этапа: вакуоль - внутриклеточные мембраны, слияние с другими вакуолями и лизосомами и вакуоль - мембрана цитоплазмы. Далее происходит экзоцитоз. По такому же плану транспортируются и вакуоли, содержащие растворимые молекулы и рецепторы (CD11c, CD18), на поверхность клетки [41].

Бактерицидный механизм нейтрофилов состоит не только из перекисей, но из многих компонентов с различными химическими свойствами. В их составе - белки, пептиды и радикалы переносчиков кислорода. Все эти компоненты работают синергично, ведя к разрушению и уничтожению микроба. Установлено, что катионные пептиды - часть кислороднезависимых бактерицидных субстанций в фагоцитирующих клетках. Широкий спектр пептидов включен в механизм элементов врожденной устойчивости. Детальный механизм киллерного действия для этих эффекторных элементов известен только частично, почти все они связываются с мембраной и проникают в бактериальные мембраны, что заканчивается лизисом бактерий. Эти пептиды могут также проявлять токсичность и по отношению к клеткам микроокружения [22].

Способность нейтрофилов к повреждению и перевариванию чужеродных агентов не ограничивается фагосомой. Активные биологические вещества с повреждающим действием оказываются в окружающей место реакции среде, что приводит к повреждению расположенных рядом клеток. Стимулированные нейтрофилы способны к образованию агрегатов, состоящих из нескольких клеток. Эта реакция может приводить к лейкостазу и лейкопении (потребления). Такая возможность доказана экспериментально с помощью введения хемотаксических пептидов животному. Процессы агрегации, лейкостаза, фагоцитоза и дегрануляции при сепсисе происходят в кровотоке и являются одним из важных патогенетических механизмов при развитии ДВС-синдрома.

Защитой от избытка нейтрофилов служат IL-10 и IL-17, выделяемые Т-лимфоцитами и действующие опосредованно, сокращая выработку стимулирующих цитокинов (TNF α , IL-8, LTB $_4$). При недостаточной выработке этих интерлейкинов, нарушении микроваскулярной проходимость значительная активность миграции нейтрофилов к месту воспаления может привести к поражению ткани и хронизации процесса [45].

Получены данные о том, что нейтрофилы играют ключевую роль в процессах воспаления при ишемии коронарных сосудов. При ишемии под влиянием Р-селектина происходит адгезия нейтрофилов к эндотелию, находящемуся в состоянии дисфункции. Взаимодействие происходит между β_2 -интегринами на лейкоцитах (CD11/CD18) и ICAM-1 на активизированном эндотелии. На последующем этапе происходят миграция нейтрофилов в центр ишемии через эндотелий и дегрануляция с выходом повреждающих субстанций [31].

Апоптоз нейтрофилов. Вопросы апоптоза нейтрофилов стали рассматриваться только в последние годы. Ранее эти сведения ограничивались только данными об апоптозе трети вновь образующихся нейтрофилов в костном мозге. В настоящее время апоптоз нейтрофилов изучается для выяснения недостаточно понятных механизмов острого воспаления и для решения некоторых вопросов патогенеза хронических воспалительных процессов.

Оказалось, что в зоне воспаления в тканях (экстравазально), кроме некротизирующихся нейтрофилов, имеются клетки с альтернативной судьбой, которая заканчивается апоптозом. В апоптозе нейтрофил сохраняет гранулы, секреция цитокинов прекращается. Такие нейтрофилы поглощаются макрофагами, находящимися в области воспаления. При этом макрофаг уже не стимулирует воспалительный процесс. Этот механизм модулируется множеством факторов. Если нейтрофилы во-время не подверглись апоптозу, они подвергаются вторичному некрозу со всеми вредными последствиями гиперстимуляции. Предполагается, что механизм управления апоптозом нейтрофилов отличается от апоптоза эозинофилов. Например, кортикостероиды задерживают апоптоз нейтрофилов, но ускоряют апоптоз эозинофилов, что может свидетельствовать как о неизвестном ранее механизме действия стероидов при аллергических болезнях и бронхиальной астме, так и об их выраженном отрицательном действии при неаллергическом воспалении. Изучение механизмов апоптоза нейтрофилов может в дальнейшем наметить пути уточнения терапевтической тактики при воспалительных процессах [27].

БАЗОФИЛЫ И ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

Цитоплазма базофилов. Основной компонент цитоплазмы - гранулы, содержащие активные субстанции. Гистамин - главный компонент гранул базофилов и мастоцитов - вызывает сокращение гладких мышечных волокон, повышает сосудистую проницаемость, раздражает нервные окончания, действует на присутствующие в тканях Т-лимфоциты, вызывая секрецию лимфокинов, обладает хемотаксическим действием на нейтрофилы и эозинофилы и секрецию их ферментов, увеличивает экспрессию рецепторов для комплемента на эозинофилах.

В гранулах много мукополисахаридов, в том числе гепарин, гиалуроновая кислота и хондроитин сульфат, которые обнаруживаются на всех уровнях созревания базофилов. В цитоплазме обнаруживается активность кислой фосфатазы. Активность хлорацетат-эстеразы снижается при созревании клетки. Обнаруживается много ферментов в цитоплазме - глютаминат-, изоцитрат-дегидрогеназы, арилсульфатазы.

У базофила определяются выраженная PAS-реакция и пероксидаза, отсутствуют протеазы. У мастоцита PAS-реакция слабо выражена, пероксидаза отсутствует, но обнаруживаются протеазы, кислая фосфатаза и щелочная фосфатаза, отсутствующие у базофила [8]. В мастоците содержится протеингликан - предшественник гепарина, хондроитин сульфат.

Мембраны базофилов и тучных клеток. На поверхности базофила и мастоцита расположены рецепторы, из которых наиболее специфическими являются Fc-рецептор для IgE. Эти рецепторы позволяют удерживать большое количество молекул IgE (30-100 тыс). Базофил продуцирует IL-4, IL-13, экспрессирует лиганд CD40L и рецептор для CCR3 на свою мембрану. Имеется также рецептор для эотаксина.

Эотаксин - хемотаксический фактор для эозинофилов и базофилов - экспрессируется во все периоды эмбрионального кроветворения и действует синергично с SCF. Это показано на предшественниках эмбриональных мастоцитов, несущих маркеры Mac-1+/Gr-1- в эксперименте [40].

Основными маркерами зрелых базофилов периферической крови являются как общие маркеры клеток крови и гранулоцитарного ряда - CD13+CD17+CD26+CD33+CD38+CD40L+CD44+CD55+CD59+CD71+HLA-DR-, так и специфические - сочетание 97A6+CD123+Fc-рецептор для IgE. Кроме того, базофилы имеют рецепторы для IL-1, IL-3, GM-CSF.

Предшественники базофилов не имеют CD13+CD17+CD26+, но имеют 97A6+CD123+Fc-рецептор для IgE. На мембране мастоцита мно-

гие маркеры, свойственные миелоидному и моноцитарному ряду, отсутствуют [11].

Тканевые мастоциты были подробно исследованы с употреблением широкого спектра моноклональных антител. Оказались отрицательными к маркерам CD2-CD3-CD4-CD11b-CD14-CD15-CD16-, CDw17-CD19-CD23- к CD116- (GM-CSF-R α), CD123- (IL-3R α), CD121a- (IL-1R type I), CD122- (IL-2R β), и CD127- (IL-7R) и лишены C5aR-(CD88), а стимуляция рекомбинантными C5a, ЭП, IL-1 и GM-CSF не выявила эффекта. И только лиганд-индуцированная активация через рецепторы для IgE (IgE-R) и SCF-R (c-kit) привела к секреции гистамина.

Специфическим маркером тучных клеток, позволяющим дифференцировать их от других форменных элементов, является сочетание 97A6 + c-kit+ (CD117) (в отличие от базофилов, которые являются 97A6+CD123+). У мастоцита обнаружена интересная особенность: до стимуляции на тучных клетках экспрессируются структуры только I класса комплекса гистосовместимости (MHC-I), после стимуляции мастоцитов гамма-интерфероном появляются антигены гистосовместимости II класса (MHC-II) [21].

Высоко аффинный IgE-рецептор (Fc ϵ R1) имеет значение в следующих ситуациях.

1. Для быстрого выброса гистамина из гранул.
2. Для активации метаболизма липидов и продукции лейкотриена 4.
3. Для синтеза иммуномодуляторных цитокинов.

Инициация сигнала от рецептора Fc ϵ R1, как показано на культуре тучных клеток, осуществляется с помощью фосфорилирования остатков тирозина, серина и треонина, содержащихся в β и γ -цепях рецептора Fc ϵ R1, что приводит к активации протеинкиназ [49]. На мембране тучных клеток имеются рецепторы для IL-3, IL-4, IL-9, IL-10.

Кинетика базофилов и мастоцитов. Базофилы подобно другим клеткам гранулоцитарного ростка созревают в костном мозге, циркулируют в крови, но выполняют свои функции в тканях, хотя в норме они не присутствуют в соединительной ткани, как тучные клетки. Кинетика базофилов соответствует кинетике эозинофилов. После созревания они находятся в костном мозге 1,5 дня, в кровотоке - 2,5 дня. Весь цикл в костном мозге и крови завершается в течение 7 дней.

Тучные клетки созревают и мигрируют в соединительную ткань, в адвентицию сосудов, в подэпителиальные слои желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей и кожи. Фактор стволовых клеток, который индуцирует дифферен-

цировку мастоцитов, участвует в созревании клетки и индуцирует агрегацию Fcε RI.

Имеются сведения, что процесс созревания мастоцитов достаточно длительный - при трансплантации костного мозга при болезни Чедиака-Хигаши появление тучных клеток наблюдалось в стенке кишечника через 10 недель, в коже через 290 дней после трансплантации.

Созревание, миграция и активация. Созревание базофилов происходит быстро - меченый тимидин через 3 ч выявляется в метамиелоцитах, появление зрелых базофилов отмечено через 1,5 суток, в периферическую кровь базофилы выходят через 2,5 дня, в крови находятся 6 ч, в тканях их пребывание также недолгое - базофилы подвергаются дегрануляции и разрушению.

В периферической крови содержится до 55/мкл базофилов. Возрастная динамика незначительная.

Миграция базофила и мастоцита через межклеточное пространство эндотелия происходит с помощью адгезивных молекул межклеточных (ICAM-1) и эндотелиальных (VCAM-1), а также и E-селектина [50].

Функциональная роль базофилов и тучных клеток. Одной из основных функций базофилов является участие в аллергических реакциях различного типа. Сигналом к началу ответа базофилов (и мастоцитов) является такое количество антигена, которое при взаимодействии с определенным количеством молекул антител IgE, вызывает их связывание и погружение в цитоплазму. При этом происходит цепь процессов, приводящих к дегрануляции, выделению гистамина и развитию местной реакции. В организме базофилы и тучные клетки являются основными поставщиками гистамина - главного медиатора в реакциях гиперчувствительности немедленного типа, причем особенно много гистамина содержится в тучных клетках [5].

Гистамин действует через H₁- и H₂-рецепторы. При действии через H₁ наблюдается зуд, расширение сосудов, возбудимость. При действии через H₂-рецепторы - сокращаются гладкомышечные волокна, увеличивается сосудистая проницаемость, увеличивается секреция слизи, активируются Т-супрессоры.

В периоде, предшествующем дегрануляции, под воздействием антигена происходит перераспределение IgE-молекул на мембране [6]. В обеспечении процесса дегрануляции принимают участие ионы Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺. Дегрануляция происходит как многоступенчатый процесс, после которого на месте гранулы образуется пузырек или вакуоль. Тормозящее влияние на дегрануляцию оказывают катехоламины, PgE. Дегрануляция базофилов в кровотоке определяет клинически

выраженную реакцию анафилаксии. Гистамин определяется в небольших количествах в эозинофилах, нейтрофилах, макрофагах, что может являться следствием фагоцитоза гранул, содержащих гистамин после дегрануляции базофилов. В отличие от тучных клеток, дифференцировка и созревание которых происходят в тканях, зрелые базофилы поступают в ткани из циркуляции. Базофилы вместе с эозинофилами и Th2-лимфоцитами поступают в место воспаления в позднюю фазу реакции. В этот период появляется действие специфических медиаторов - гистамина, простагландина D₂, лейкотриена C₄. Базофилы быстро оказываются в коже, легких, слизистой носа после воздействия аллергена. До этого происходит адгезия к эндотелию, процесс прохождения через стенку сосуда. В этом процессе ключевую роль играет зотаксин (CCL11) и рецептор к нему (CCR3) на базофилах и эозинофилах, что приводит их к месту развития аллергического воспаления. Нарушения в гене зотаксина в эксперименте приводит к резкому уменьшению количества эозинофилов, реагирующих на аллерген.

Базофилы отвечают и на другие хемокины - зотаксин-2 (CCL24), MCP-3 (CCL7), MCP-1 MIP-1α (как и эозинофилы). Тканевая инфильтрация и активация базофилов происходит также под влиянием гемопоэтических цитокинов - IL-3, IL-5, GM-CSF. Цитокины выделяются Th2-лимфоцитами, которые активируются при кожной аллергии. Эти цитокины (IL-3, IL-5, GM-CSF) являются медиаторами IgE-зависимой стимуляции C5a, C3a и фактора, активирующего тромбоциты. Подобными возможностями обладает и цитокин нейротрофилов NGF, уровень которого также повышается при аллергических реакциях и астме. Базофилы после воздействия IL-3, синтезировали лейкотриен C₄ и увеличивали продукцию IL-4 и IL-13.

Лейкотриены C₄ (LTC₄), а также LTD₄, LTE₄ в смеси представляют собой фактор анафилаксии, вызывающий отек дермы, активацию эндотелия, угнетение активности сердечной мышцы, снижение коронарного кровотока.

Способность продуцировать LTC₄ и цитокины является важным звеном в существовании хронических аллергических воспалительных заболеваний, таких, как астма. Главными стимуляторами базофилов в этом процессе являются IL-3 и C5a. C5a взаимодействует с рецептором на мембране базофила C5aR (CD88). В отличие от базофилов, CD88 не экспрессируется тучными клетками, которые не отвечают на C5a-стимуляцию. Тучные клетки не имеют рецепторов для IL-3 и GM-CSF. Таким образом, базофилы более чувствительны к действию иммуномодулирующих цитокинов и провоспалительных

факторов. Показано, что лечение IL-3 приводит к реакциям гиперчувствительности, выражающимся в высыпаниях, отеке, тошноте, рвоте, артрите и стимуляции гемопоэза.

Секретируемые базофилами после стимуляции IL-4 и IL-13 способствуют поддержанию воспаления в тканях, особенно IL-4, который индуцирует экспрессию молекул VCAM на эндотелиальных клетках и хемотаксис эозинофилов. IL-4 в сочетании с $\text{TNF}\alpha$ способствуют продукции и реализации эотаксина из фибробластов кожи. Базофилы имеют отношение к стимуляции выработки В-лимфоцитами изотипа IgE независимо от Т-клеток [15]. Осуществление этой стимуляции происходит через CD40L под влиянием IL-4 и IL-13 и аллергена, что доказывается экспериментально при воздействии антител к IL-4 и IL-13 или CD40L и при добавлении в культуру В-лимфоцитов [53].

Мастоциты принимают участие в регуляции накопления лейкоцитов при воспалительной реакции. Хемотаксические пептиды, выделенные из мастоцитов легких и клетки тучноклеточной линии (HMC-1), при транскриптаза-полимеразной реакции (RT-PCR) показали наличие экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного протеина в нестимулированных тучных клетках (MCP)-1 mRNA. При добавлении SCF и анти-IgE-антител происходит увеличение выработки MCP-1 [10].

Активированные мастоциты легких активируют эозинофилы к выработке и секреции ECP (эозинофильного катионного протеина). Кроме того, мастоциты способны к продукции IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF и $\text{TNF}\alpha$ в ответ на стимуляцию SCF и анти-IgE [38]. Эта способность мастоцитов была подтверждена и при иммуногистохимическом исследовании мастоцитов подслизистого слоя, в цитоплазме которых были выявлены IL-4, IL-5, IL-6 и $\text{TNF}\alpha$ как у здоровых, так и при аллергии. Представляет интерес, что IL-8 в этой ситуации был выявлен только у больных локальной аллергией [34].

Особенно важное значение придается секреции мастоцитами IL-4, так как последний обладает большим набором регуляторных функций в отношении В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток и фибробластов, принимает участие в аллергических, противовоспалительных и антиопухолевых реакциях. Ген его локализуется в 5-й хромосоме. Секретируется Т-лимфоцитами и мастоцитами. Рецептор к IL-4 состоит из α -

цепей и γ -цепей, причем γ -цепи могут служить рецепторами как к IL-4, так и к IL-13 [13].

При развитии воспаления базофилы и мастоциты выделяют еще ряд активных субстанций, влияющих на местные и общие проявления аллергии. К ним относится PAF, который повышает проницаемость сосудов, является хемоаттрактантом для эозинофилов, способствует легочной гипертензии, отеку легких и активирует тромбоциты.

В мастоцитах и базофилах образуются продукты циклооксигеназного пути метаболитов арахидоновой кислоты PGI_2 (простациклин) PGF_2 PGD_2 и тромбоксан A-2. Синтезируется 5-липоксигеназа, которая участвует в метаболизме гидроксикозатетраеновых кислот и образовании лейкотриенов LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 . Последний (LTD_4) предупреждает агрегацию тромбоцитов.

В гранулах мастоцитов и базофилов имеются 2 основных фермента - триптаза и химаза. Триптаза составляет 25% белка гранул, высвобождается при активации по IgE-зависимому механизму. Она расщепляет кининоген до кинина, снижает свертываемость крови, активируется C_3 , проявляет митогенные свойства по отношению к фибробластам. Триптаза является маркером анафилактической реакции, после окончания которой на некоторое время задерживается в кровотоке.

Другой фермент - химаза - превращает ангиотензиноген в ангиотензин и активирует IL-1.

Кроме участия в иммунных реакциях, базофил и тучная клетка оказывают влияние на свертывающую систему крови. При дегрануляции базофилов в окружающую среду выходят гистамин, фактор агглютинации тромбоцитов, калликреин, вазоактивные амины, способствующие спазму сосудов в месте реакции и образования тромбов. С другой стороны, базофил и тучная клетка являются основными поставщиками гепарина, участвующего в физиологическом механизме коагуляции и жировом обмене. Гепарин - структурный протеогликан, антикоагулянт - угнетает активность комплемента, участвует в ангиогенезе, связывает фактор роста сосудов и гистамин [9]. Гепарин активирует липопротеиновую липазу, участвующую в обмене липидов и предотвращающую выраженную алиментарную гиперлипидемию, воздействуя на метаболизм триглицеридов.

ЭОЗИНОФИЛЫ

Цитоплазма эозинофилов. В цитоплазме эозинофилов имеются, как было указано выше,

гранулы и другие структуры, позволяющие выполнять разнообразные физиологические эф-

факторные функции. В цитоплазме осуществляется синтез цитотоксичных белков, энзимов, супероксидных субстанций, производятся лейкотриены и цитокины.

Энзимы эозинофилов значительно изменяются при активации эозинофилов, возрастает их цитотоксичность. Наиболее известные энзимы эозинофилов - пероксидаза и арилсульфатаза. Пероксидаза эозинофилов отличается от пероксидазы нейтрофилов более низкой бактерицидной активностью и чувствительностью к азиду натрия. Протистостафилококковая активность эозинофилов под действием азида натрия увеличивается, а бактерицидная активность нейтрофилов уменьшается [12]. Пероксидаза эозинофилов вместе с перекисями и галлоидами осуществляет киллерный противопаразитарный эффект и усиливает противомикробный эффект нейтрофилов.

Арилсульфатаза инактивирует субстанции анафилаксии, уменьшая выраженность реакции немедленной гиперчувствительности. Содержится в мелких гранулах эозинофилов в большом количестве (в 15 раз выше, чем в нейтрофилах).

Фосфолипаза D нейтрализует фактор активации тромбоцитов, уменьшает способность тромбоцитов к дегрануляции. Количество фосфолипазы D в эозинофилах в 10 раз превышает ее концентрацию в нейтрофилах. Лизофосфолипаза определяется в тканях и жидкостях в местах воспаления, в том числе в больших количествах в кристаллах Шарко-Лейдена.

Коллагеназа воздействует на I и III типы коллагена, которых особенно много в легочной ткани.

В эозинофилах в 8 раз больше лизофосфолипазы, в 2,5 раз больше пероксидазы, в 2 раза больше β -глюкуронидазы и в 2 раза больше β -глицерофосфатазы, чем в нейтрофилах.

Нейротоксин, содержащийся в эозинофилах, способен повреждать миелиновые нервные волокна у паразитов (и у хозяина). Его токсичность проявляется при гиперэозинофилиях.

Важнейшими в функциональном отношении являются белковые структуры цитоплазмы эозинофилов - большой основной белок и катионный белок. Большой основной белок (молекулярная масса 9200) составляет около половины белка больших гранул, обладает сродством к анилиновым красителям, определяющим окраску гранул, способен нейтрализовать гепарин и повреждать личинки ряда паразитов и некоторые клетки организма [20]. Эозинофильный катионный белок (м.м. около 21 000) содержит большое количество аргинина и цинка, очень токсичен для личинок (в 8-10 раз более активен, чем большой основной белок), вызывает их деструкцию и фрагмен-

тацию. Эозинофильный катионный белок принимает активное участие в воспалительных реакциях, оказывают влияние на плазменный гемостаз через XII фактор свертывания, повреждающее действие на эндотелий сосудов. От этих белков зависит повреждение эндокарда при длительных гиперэозинофилиях. Большой основной белок и эозинофильный катионный белок связываются и нейтрализуются гепарином, что особенно важно при их появлении в кровотоке.

Кинетика эозинофилов. Начальные стадии эозинофилопоза в костном мозге длятся 34 ч. В циркуляции эозинофилы находятся 6-12 ч, после чего мигрируют в покровные ткани (кожа, слизистые оболочки дыхательного и желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей), в которых их количество в 100 раз превышает содержание эозинофилов в кровотоке. При острых воспалительных процессах значительное количество эозинофилов накапливается по периферии воспаления.

При состояниях, сопровождающихся эозинофилией, наблюдается укорочение клеточных циклов на ранних этапах созревания эозинофилов, увеличивается митотический индекс, время генерации сокращается в 3 раза, время появления в кровотоке ускоряется в 2 раза. Из циркуляции эозинофилы быстро исчезают, но при эозинофилиях могут возвращаться в кровоток из тканей и длительно ($T_{1/2}$ - 44 ч) рециркулировать. Физиологическая норма эозинофилов в крови до 350 / мкл.

Адреналовые стероиды и адренотропный гормон подавляют эозинофилопоз. Эозинопения при острой инфекции впервые описана в 1893 г., затем в многочисленных работах отмечена при острой бактериальной и вирусной инфекции, системной красной волчанке и обострении хронических процессов. Этот процесс связывают с адреналовой стимуляцией, хотя это не доказано, так как у адреналэктомированных животных в период острой инфекции наблюдалась эозинопения. Не исключается механизм усиленной секвестрации эозинофилов в тканях в первые дни инфекции [9].

Кортикостероиды вызывают эозинопению в течение 2-6 ч. При длительном приеме кортикостероидов эозинофилопоз снижается, возможно, за счет подавления выработки гистамина и стабилизации мембран лизосом в базофилах и тучных клетках. Введение гистамина стимулирует продукцию эозинофилов.

Синтез цитокинов. Эозинофилы способны синтезировать, хранить и секретировать до 18 цитокинов и факторов роста, включая IL-6 и GM-CSF. Эозинофилы, секретировав широкий спектр цитокинов, вместе с тучными клетками и базо-

филами, не только служат исполнительным звеном в иммунных реакциях, но и способны участвовать в иммунорегуляторных процессах.

IL-6, как показал иммунофлюоресцентный анализ, находится в матрице кристаллоидных гранул в эозинофилах крови, взятой от больного atopической астмой.

Эозинофилы секретируют IL-2 и INF γ . Показано, что секреторные иммуноглобулиновые комплексы IgA-anti-IgA индуцируют IL-10, что приводит к значительному подавлению ответа эозинофилов и снижению выработки IL-2 и INF γ . Это указывает на иммунорегуляторную функцию эозинофилов в иммунном ответе.

Кроме участия в иммунном ответе, активированные эозинофилы секретируют активные вещества, которые могут непосредственно стимулировать чувствительные нейроны к синтезу нейропептидов [18].

Мембрана эозинофилов несет антигенные структуры, свойственные гранулоцитарному росту (CD13, CD33), а также молекулы, определяющие способность к адгезии и активации. Среди них, с помощью моноклональных антител, выделяются CD9, CD11b, CD18, CD25, CD28L, CD62L, CD37, CD53, CD63, CD81 [36], рецепторы для активированных компонентов комплемента (C3b, C3d, C4) и Fc-рецепторы для молекул IgG (в небольшой степени для IgE и IgM), рецепторы для гистамина (H₁ и H₂). Все эти структуры не являются специфическими только для эозинофилов.

Наибольшее значение в агрегации эозинофилов и их адгезии к фибронектину придается CD9. На экспрессию CD9 оказывают влияние факторы, вырабатываемые тромбоцитами, а также эотаксин (хемотаксический фактор, вырабатываемый фибробластами) и IL-5. После адгезии к фибронектину, концентрация CD9 снижается. Антитела к CD9 снижают адгезивные свойства эозинофилов к фибронектину [16].

CD69 - маркер активации, определяемый не только на эозинофилах, но и на гранулоцитах, лимфоцитах. Количество CD69 на эозинофилах увеличивается при аллергии и бактериальном воспалении, а также после провокации аллергеном.

Экспрессии CD11b/CD18 (α и β -цепей интегрин Mac-1) и CD66b увеличивается при воспалительных процессах. Другие адгезивные молекулы (CD11a, CD29, CD49d, CD49f, CD44, Fc γ рецепторы II и III) при воспалении заметно не увеличиваются. Лечение преднизолоном уменьшает выраженность экспрессии CD11b на нейтрофилах и CD11b, CD18, CD66b на эозинофилах до уровня нормы.

Экспрессия на эозинофилах костимуляторной молекулы CD28-лиганд (CD28L) необходима в

качестве второго контрольного сигнала для оптимальной активации эозинофила при взаимодействии с CD4⁺ Т-клетками [23]. Благодаря этому сигналу увеличивается секреция эозинофилами интерлейкина IL-2 и INF γ .

Функция другой костимуляторной молекулы - CD86 на эозинофилах не уточнена. Установлено, что если для Т-клеток необходимы два сигнала для эффективной стимуляции, то для эффективной активации эозинофилов достаточно одного костимуляторного сигнала - через CD28-лиганд.

На эозинофилах имеются рецепторы для иммуноглобулинов и иммунных комплексов. Ранее утверждалось, что количество рецепторов для агрегированного IgG и иммунных комплексов, содержащих IgE, значительно увеличивается при активации. В настоящее время появились данные, что это является справедливым только для Fc-рецепторов для низкоаффинного IgG. Оказалось, что на эозинофилах имеется высокий уровень низкоаффинного IgG-рецептора (Fc γ RII, CD32). Fc ϵ RI появляется после сенситизации на очень малом количестве эозинофилов - на 0,5%. На стимуляцию анти-IgE антителами эозинофилы не отвечают ни продукцией лейкотриена C₄, ни супероксидными анионами, ни дегрануляцией. Отвечают на стимуляцию античеловеческим IgG и цитокинами (IL-5, IL-4 и другими) [28].

Концентрация рецепторов для ряда компонентов комплемента C3, C4 и C3b увеличивается в период участия эозинофилов в иммунных реакциях. Подробное изучение субпопуляций лейкоцитов показало, что концентрация рецепторов C3aR и C5aR различаются незначительно (в 1,5 раза выше C5aR, чем C3aR). На моноцитах в 6 раз больше C5aR, чем C3aR, на нейтрофилах в 20 раз выше C5aR, чем C3aR.

Поскольку именно C5a играет роль анафилотоксина - провоспалительного пептида, образующегося при активации системы комплемента, концентрация рецепторов, связывающих его, имеет отношение к нейтрализации воспалительных повреждений. Кроме клеток крови, рецепторы для C5a обнаружены на клетках различных тканей (эндотелий, клетки гладкой мускулатуры, нейроглии), что оказывает влияние на эмиграцию клеток из крови и тканевой отек [39].

Наличие рецепторов для интерлейкинов, вырабатываемых клетками, участвующими в ответе на антиген, показано при исследовании культуры человеческих лейкозных эозинофилов (EoI-1). С помощью проточной цитофлуорометрии на эозинофилах определена экспрессия рецепторов для IL-3, IL-5, GM-CSF, обнаружены адгезивные молекулы (CD49b, CD11b) и CD95(Fas). С помощью ПЦР и иммуноэнзимоло-

гического исследования выявлена экспрессия эозинофильного катионного протеина ЕСР. Еол-1 клетки могли дифференцироваться в вакуоли содержащие клетки. Антитела к CD95 индуцировали апоптоз лейкоэмических эозинофилов [52].

Сравнение маркеров мембраны эозинофила и базофилов выявило ряд совпадений. Базофилы несут большой основной протеин и гистамин. Пероксидазные гранулы в базофилах человека окрашивались антителами к эозинофильной пероксидазе. Базофилы несли на поверхности маркеры CD11a/CD11b/CD11c/CD25/CD13/CD33, сходные с маркерами эозинофилов. Отличает базофил высокоаффинный Fcε-рецептор. Нейтрофилы отличаются от эозинофилов и базофилов по ряду маркеров - на нейтрофилах определялись CD114 (G-CSFR), /CD116 (GM-CSFR), /CD124 (IL-4R), CD126 (IL-6R) и не определялись CD123 (IL-3R)/CD125 (IL-5R), свойственные эозинофилам [48].

Созревание, миграция и активация эозинофилов происходит под влиянием хемотаксических факторов - IL, иммунных комплексов, содержащих IgG2, активированные факторы комплемента (C5a, C567). Высокоактивными хемотаксическими факторами являются пептиды тучных клеток и базофилы, образующие фактор анафилаксии, и простагландин D (производное от арахидоновой кислоты). Таким же действием обладают гистамин и другие активные вещества, выделяемые при активации базофилами и тучными клетками при их активации IgE и антигеном [9]. Источниками хемотаксических факторов являются также нейтрофилы, Th2-лимфоциты и В-лимфоциты, синтезирующие IgE, клетки некоторых опухолей, гельминты.

Особое влияние на рост, созревание, распределение в тканях эозинофилов оказывают множество цитокинов, вырабатываемых Т-лимфоцитами. IL-4, вырабатываемый Th2-лимфоцитами, мощный индуктор накопления эозинофила *in vivo*. Ответ на IL-4 осуществляется во взаимодействии с TNFα, β₂-интегринами и молекулами адгезии сосудов (α₄-integrin/VCAM-1). IL-4 в дозозависимой зависимости стимулирует mRNA зотаксина в фибробластах кожи. Воздействие IL-4 и TNF приводило к 10-кратному увеличению трех различных биохимических форм зотаксина. Привлечение эозинофилов при IL-4-зависимых реакциях кожи, по крайней мере, частично, может быть следствием Th2-зависимой индукции зотаксина в фибробластах кожи. Сами Th2-лимфоциты не продуцируют зотаксин.

Особенно заметно взаимодействие IL-4 и TNFα в присутствии IL-13 [33]. Эти цитокины активируют эозинофилы *in vitro*, на них увеличивается экспрессия CD69 и существенно возрастает

выживаемость. Такой же синергический эффект наблюдается при сочетании с IL-5 вместо TNFα.

IL-5 активизирует эозинофилы и увеличивает их выживание *in vitro*, задерживая апоптоз, увеличивает их дегрануляцию, оказывает влияние на концентрацию пероксидазы эозинофилов. Это было показано в эксперименте, при культивировании эозинофилов в присутствии IL-3, GM-CSF или IL-5. Увеличенная концентрация пероксидазы эозинофилов была обнаружена, когда культивирование происходило в присутствии IL-5. IL-5 синтезируются лимфоцитами, а также микроваскулярными эндотелиальными клетками костного мозга и участвует в поддержании роста и дифференцировки гемопоэтических предшественников, в том числе предшественников эозинофилов, а также способствует их ускоренному росту и дифференцировке. Ингибиторным влиянием на выработку в микроваскулярных клетках интерлейкина IL-5 обладает IFNγ [37].

IL-8 - потенциально важный цитокин в иммунологических ответах. Кроме лимфоцитов, продуцируется и некоторыми другими клетками легкого. Является мощным хемотаксическим фактором для гранулоцитов. При воздействии IgE, IL-8 воспроизводился в количествах, достаточных для перемещения нейтрофилов и эозинофилов через фильтр, эндотелиальные клетки и монослой легочного эпителия, находящихся на фильтре.

Оказалось, что при всей значимости факторов, вырабатываемых Т-лимфоцитами-хелперами 2-го типа (Th2), для ответа по типу аллергического воспаления имеют значение и γδ-Т-клетки (Т-лимфоциты, несущие рецептор TCRγδ), и дендритные клетки (DC), уменьшение которых в эксперименте приводит к недостаточной стимуляции IL-4-зависимых IgE и IgG1 ответов. Показано, что DC дыхательных путей необходимы для стимулирования наивных Т-лимфоцитов при первичном иммунном ответе на вдыхаемые антигены и для развития аллергической сенсibilизации. Роль DC заключается и в стимулировании Т-лимфоцитов памяти при вторичном ответе на вдыхаемые антигены и последующем развитии хронического воспаления дыхательных путей. В эксперименте действие аллергена приводит к перибронхиальной и периваскулярной эозинофильной инфильтрации, обусловленной цитокинами, вырабатываемыми CD4+Th2-клетками, и влиянием специфического к аллергену IgE, молекулы которого фиксированы на тучных клетках и базофилах подслизистого слоя. Истощение DC в эксперименте показало, что они необходимы для представления вдыхаемого антигена Th2-клеткам в легком, и обеспечивают хроническое эозинофильное воспаление дыхательных путей [30].

Тучные клетки, кроме участия в реакциях анафилаксии, способствуют активации эозинофилов и освобождению пероксидазы эозинофилов, а также увеличивают выживаемость и производство эозинофилами цитокина выживания GM-CSF. Кроме интерлейкинов, хемотаксическим влиянием на эозинофилы обладает тахикинин (субстанция P), способствующий дегрануляции эозинофилов при действии нейротоксина.

Хемотаксическим эффектом по отношению к эозинофилам обладает секретонейрин, по характеру и эффективности действия сопоставимый с IL-8. Секретонейрин стимулирует хемотаксис человеческого эозинофила, передавая сигнал через уникальный путь трансдукции сигнала, который вовлекает в активацию фосфатидилэстеразы, фосфолипазу D и фосфатидилинозитол-3-киназу. Секретонейрин представляет собой 33-аминокислотный нейропептид, полученный из секретогранина, выделенного из сенсорных центростремительных C-волокон [14].

Факторы тромбоцитов оказывают стимулирующую роль в отношении адгезии эозинофилов, при этом увеличивается концентрация CD9 на эозинофилах, а на тромбоцитах CD61 - специфический маркер. Показано, что в присутствии тромбоцитов значительно возрастает способность эозинофилов прикрепляться к фибронектину. О важной роли тромбоцитов в развитии аллергических процессов может свидетельствовать наличие FcεRI не только на поверхности тучных клеток и базофилов, но и на тромбоцитах человека и в цитоплазме мегакариоцитов, что доказано с помощью молекулярных исследований RNA. Кроме того, рецептор FcεRI определен в некотором количестве на клетках Лангерганса, моноцитах, эозинофилах. Стимуляция тромбоцитов человека через регион FcεRI индуцировало появление серотонина.

Добавление секреторных иммуноглобулиновых комплексов IgA-anti-IgA индуцирует IL-10, что приводит к значительному подавлению ответа эозинофилов и снижению выработки IL-2 и INFγ. Это указывает на иммунорегуляторную функцию эозинофилов в иммунном ответе.

Кроме хемотаксического эффекта, многие из перечисленных факторов являются активаторами эозинофилов. При активации увеличивается концентрация многих рецепторов на мембране эозинофила и количество малых гранул в цитоплазме. Активация завершается фагоцитозом гранул, образующихся при дегрануляции базофилов, дегрануляцией собственных гранул эозинофилов, выходом активных субстанций и ферментов эозинофилов в окружающую среду и секрецией PgE1 и PgE2.

Функциональная роль эозинофилов заключается в предупреждении проникновения ан-

тигена в сосудистое русло, т.е. генерализации иммунного ответа. Область локальной иммунной реакции, развивающейся при проникновении антигена (или гельминта), эозинофилы отграничивают с помощью нейтрализации метаболитов, участвующих в уничтожении антигена. При образовании большого количества метаболитов место реакции отграничивается с помощью местного некроза и активации фиброобразования вокруг этого участка. В организации этого процесса своеобразная роль принадлежит эозинофилам, которые завершают иммунный ответ на уровне подслизистого и подэпителиального слоя, защищая, таким образом, организм от множества нецелесообразных общих иммунных реакций на небольшие дозы проникающих чужеродных антигенов.

Значительную роль играют эозинофилы при развитии реакций гиперчувствительности немедленного типа. Под влиянием хемотаксических факторов, выделяемых сенсibilизированными Т-лимфоцитами, эозинофилы мигрируют к месту иммунной реакции на самых первых ее этапах. В период миграции и инфильтрации происходит усиленное созревание эозинофилов, увеличение концентрации ферментов и рецепторов для иммуноглобулинсодержащих комплексов и активированных факторов комплемента. Реализация реакции немедленной гиперчувствительности, заключающаяся во взаимодействии IgE-антител с аллергеном на поверхности тучных клеток, приводит к выходу субстанций анафилаксии и гистамина. Ответ эозинофилов состоит в выделении инактивирующих субстанций - гистаминазы инактивируют гистамин, арилсульфатаза - медленно действующие субстанции анафилаксии, хемотаксические пептиды. Фосфолипаза B и D инактивирует литический фактор тромбоцитов и препятствует выходу серотонина из тромбоцитов. Большой основной белок эозинофилов инактивирует гепарин, простагландин PgE1 и PgE2, подавляют гистамин. Эозинофилы могут фагоцитировать гранулы, выделяемые тучными клетками, препятствуя выходу из гранул гистамина и протеаз. После всестороннего подавления реакции гиперчувствительности немедленного типа эозинофилы способствуют восстановлению тканевых тучных клеток, выполняя при этом репарационную функцию [26].

При проникновении паразитов (гельминтов и их личинок) эозинофил осуществляет местную киллерную функцию одновременно с антителами и базофилами. Эта система особенно важна для случаев, когда объект не может подвергнуться фагоцитозу из-за его размеров. При этом эозинофил прикрепляется к мембране паразита, обычно покрытой специфическими антителами,

с помощью своих рецепторов для компонентов комплемента и Fc-рецептора. Затем происходит дегрануляция с выделением большого основного белка и эозинофильного катионного белка и эозинофильной пероксидазы на поверхность личинки. Наибольшее значение в этом механизме принадлежит IgE-антителам. Они появляются последними, когда первые этапы, связанные с реакцией IgA и IgG, не привели к удалению паразита из организма. Цитотоксичность активированных эозинофилов по отношению к личинкам достигает 70-80 %, в то время как у моноцитов и макрофагов она в 2-3 раза ниже. Гиперэозинофилия, наблюдаемая при миграции личинок, является основой противопаразитарной защиты при снижении функции Т-клеточного иммунитета и стимуляции синтеза IgE [2].

Апоптоз эозинофилов. Эозинофилы, подвергающиеся апоптозу, несут классические морфологические изменения, включая конденсацию и интернуклеосомные изменения ДНК под действием эндогенных эндонуклеаз. Аутологичные макрофаги узнают эозинофилы, находящиеся в состоянии апоптоза, и поглощают их. Сигналами к индукции апоптоза в эозинофилах человека могут быть изменения концентрации цитокинов, действие антител на лиганд Fas

CD69, действие глюкокортикоидов, IL-5 и TGF β [36, 47].

GM-CSF участвует не только в продукции и выживании эозинофилов, но и в их апоптозе. Было показано [47], что усиление апоптоза под влиянием GM-CSF связано с отсутствием стимулирующего действия хемотаксинов (эотаксина), хотя эотаксин и другие хемотаксические факторы сами по себе не способствуют выживанию или апоптозу.

Механизм, определяющий способность макрофагов узнавать и поглощать апоптотические эозинофилы, связан с взаимодействиями между интегринами и лектинами на мембранах этих клеток. Кроме макрофагов, в процессе поглощения клеток, как предполагают авторы [25], участвуют непрофессиональные фагоциты - фибробласты, клетки гладкой мускулатуры, дендритные клетки, клетки эпителия дыхательных путей. Большую роль в осуществлении этого процесса отводят медиаторам эозинофилов, в том числе большому основному протеину. Возможности поглощения клеток непрофессиональными фагоцитами усиливаются IL-1 α и TNF α . Подавление апоптоза или дефекты системы апоптоза могут быть одной из причин гиперэозинофилий [42].

МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ

Моноциты и макрофаги являются основными клетками системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ - термин комитета ВОЗ, 1972) или макрофагальной системы И.И. Мечникова. Клетки, объединенные в эту систему, составляют единую линию дифференцировки, включающую:

- костномозговых предшественников,
- пул относительно незрелых клеток, циркулирующих в крови (моноциты),
- конечную стадию дифференцировки - органо- и тканеспецифические макрофаги [1, 15].

Ранние предшественники мононуклеарных фагоцитов ведут свое происхождение от полипотентной стволовой кроветворной клетки и являются быстро делящимся пулом клеток-предшественниц грануломоноцитопоза - КОЕ-ГМ. Коммитированные КОЕ-ГМ дают начало пролиферирующему пулу монобластов, а монобласты - пулу промоноцитов. Последние являются наиболее ранними морфологически идентифицированными в составе нормального костного мозга клетками СМФ, обладающими высоким пролиферативным потенциалом; индекс метки H₃-тимидином равен $78,8 \pm 7,7\%$ [7, 15, 16].

В физиологических условиях промоноциты после 2-3 делений дифференцируются в моноциты, которые, в отличие от клеток гранулоцитарного ряда, не проходят стадии созревания в костном мозге, а сразу выходят в кровоток. Вследствие этого в костном мозге отсутствует сколько-нибудь значительный резервный пул моноцитов, их общее количество не превышает 1,5% от всех ядерных элементов гемопоэза [6, 7]. Сравнительно небольшая часть моноцитов дифференцируется в макрофаги костного мозга [7, 16]. Продукция моноцитов находится под контролем целой группы ростовых факторов, одни из которых (IL-3, GM-CSF и M-CSF) стимулируют митотическую активность предшественников моноцитов, другие (PGE, INF α и β) ингибируют деление этих клеток [6, 17]. В норме количество продуцируемых моноцитов составляет $0,62 \times 10^5$ клеток/ч [6]. При воспалении продукция моноцитов резко увеличивается, чтобы обеспечить возросшие потребности в фагоцитирующих клетках. Факторами, усиливающими моноцитопоз, являются провоспалительные цитокины, которые секретируются макрофагами в очаге воспаления [6, 7, 17].

В крови моноциты составляют от 1 до 6% (редко более 10%) всех лейкоцитов, что соответствует абсолютному количеству, равному 80-600 клеток в 1 мм³ у взрослых при подсчете в окрашенных мазках крови [6, 17, 21]. В токе крови моноциты распределяются на циркулирующих и пристеночный пулы, их соотношение по размерам 1:3 [7]. Циркулирующие моноциты попадают в образец крови при ее заборе для исследования, а пристеночные моноциты достаточно прочно прикреплены к эндотелию сосудов и готовы к трансэндотелиальной миграции из сосуда в ткани. Обычное время транзита моноцита через кровь составляет не более 48 ч. При воспалении количество моноцитов, поступающих в кровеносное русло, увеличивается, а время их транзита через кровь сокращается [6, 7, 17].

Закономерная миграция моноцитов из кровотока в ткани опосредована экспрессией на моноцитах и эндотелиальных клетках специализированных адгезионных молекул. Экспрессия этих молекул усиливается под влиянием провоспалительных цитокинов: IL-1, TNF α , IL-6, INF- γ . Адгезия моноцитов к активированным эндотелиальным клеткам опосредуется поверхностными молекулами CD11a/CD18, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1. Далее следует распластывание моноцитов на поверхности эндотелиальных клеток, проникновение между двух соседних эндотелиоцитов, преодоление базальной мембраны и выход в ткани. Этот процесс является обычной стадией жизненного цикла моноцитов [6, 17, 24].

После выхода из кровотока в ткани моноциты дифференцируются в органо- и тканеспецифические макрофаги и не способны к рециркуляции [7, 16]. Исследования клеточных культур *in vitro* показали, что в процессе дифференцировки моноцитов в макрофаги постоянно выявляются переходные формы между моноцитами, незрелыми и зрелыми макрофагами. Среди этих форм морфологически наиболее четко охарактеризованы так называемые моноцитоподобные клетки, близкие по структуре к моноциту, и характеризующиеся округлой формой, бобовидным ядром с достаточно грубым распределением ядерного хроматина, ядерно-цитоплазматическим отношением, близким к 1, и сравнительно гладкой поверхностной мембраной [7, 13, 27]. Зрелые макрофаги имеют ряд общих морфологических признаков: значительные размеры (диаметр от 20-25 до 80 мкм), овальное ядро, с петлистостью хроматина и остатками ядрышек, широкую цитоплазму без четких границ с наличием псевдоподий. Цитоплазма может содержать азурофильные и незрелые гранулы и, зачастую, обилие фагоцитированных частиц.

При электронной микроскопии в цитоплазме выявляются большое количество лизосом, раз-

витый аппарат Гольджи и выраженный шероховатый эндоплазматический ретикулум [1, 16, 20]. Цитоплазма макрофагов может содержать много вакуолей, придающих клетке пенистый вид. Определение «пенистая клетка» закреплено за макрофагами, вакуоли которых содержат липиды, в частности, холестерин и эфиры холестерина, такие клетки встречаются в норме и при патологии, в том числе - при воспалении [1, 21].

Внесосудистый пул клеток макрофагальной системы значительно превышает их содержание в крови; наибольшее количество макрофагов содержится в печени, селезенке и легких [3, 7, 21]. Тканевые макрофаги относятся к долгоживущим клеткам, продолжительность их жизни исчисляется месяцами и годами. Если не происходит их мобилизации в очаг инфекции или воспаления, они погибают, мигрируя в селезенку или лимфатические узлы. Легочные макрофаги покидают легкие через воздухоносные пути [17]. Обновление пула тканевых макрофагов происходит за счет притока моноцитов из кровеносного русла, лишь незначительная часть (менее 5%) макрофагов проявляет способность к однократному делению [6, 7, 16, 17]. Быстрый прирост числа макрофагов в очаге острого воспаления также обеспечивается в основном притоком моноцитов из крови, хотя способность макрофагов к делению в очаге воспаления возрастает. На месте хронического воспаления нередко образуется гранулема, которая содержит макрофаги, происходящие как из моноцитов крови, так и в результате местного деления [3, 5, 7, 16]. Активированные макрофаги гранулемы постепенно увеличиваются в размерах, приобретают морфологию «эпителиоидных» клеток или сливаются, образуя гигантские многоядерные клетки [5, 7, 16].

Под влиянием микроокружения и специализации функций макрофаги органов и тканей приобретают ярко выраженные морфологические и функциональные особенности, в соответствии с которыми выделяют два основных класса клеток: *антигенперерабатывающие макрофаги* (синоним - *профессиональные фагоциты*) и *антигенпредставляющие дендритные клетки* (синоним - *иммунные акцессоры*) [13, 16].

Класс профессиональных фагоцитов включает свободные макрофаги соединительной ткани, подкожного жирового слоя, серозных полостей, альвеолярные макрофаги легких, фиксированные макрофаги печени, центральной нервной системы, костного мозга, селезенки и лимфатических узлов, а также остеокласты, эпителиоидные клетки и гигантские многоядерные клетки очагов воспаления [7, 15, 16]. Несмотря на резкие отличия морфологических характеристик, перечисленные клетки имеют сходные цитохимические (альфа-нафтилацетат-эстераза+, кис-

лая фосфатаза+, лизоцим+) и иммунофенотипические признаки (Fc-IgG+, CD4+, CD11+, CD14+), что подтверждает принадлежность их к общей линии. Основной функцией профессиональных фагоцитов являются поглощение и уничтожение внедрившихся микроорганизмов, поврежденных, дегенерирующих и инфицированных вирусами клеток, а также иммунных комплексов и различных объектов органической и неорганической природы, попавших в организм. Функции профессиональных фагоцитов включают также секрецию биологически активных продуктов (монокининов) и представление антигенов лимфоцитам, однако, в последнем отношении они гораздо менее эффективны, чем дендритные клетки [7, 13, 16, 21].

Моноциты крови дифференцируются не только в антигенперерабатывающие макрофаги, но и, в присутствии определенных факторов, в дендритные клетки. В опытах *in vitro* установлено, что такими факторами являются цитокины GM-CSF, TNF α и IL-4.

Специфической функцией дендритных клеток является захват, переработка и представление антигенов лимфоцитам. В семейство дендритных клеток объединены клетки Лангерганса (белые отросчатые эпидермоциты), интердигитальные ретикулярные клетки и дендритные ретикулярные клетки. Последние концентрируются в фолликулах лимфатических узлов и селезенки и осуществляют представление антигенов В-лимфоцитам [6, 10, 27].

Клетки Лангерганса локализуются преимущественно в эпидермисе и составляют около 2% от общей популяции эпидермоцитов. Морфологически это клетки диаметром 15-20 мкм с обильной бледно окрашенной цитоплазмой и овальным, почковидным или изрезанным ядром, с нежным, равномерно распределенным хроматином и 1-2 мелкими ядрышками. Специфическими ультраструктурными маркерами клеток Лангерганса являются своеобразные цитоплазматические органеллы, имеющие вид теннисных ракеток - гранулы Бирбека [10]. После связывания антигена клетки Лангерганса с током лимфы мигрируют в паракортикальные зоны региональных лимфатических узлов, где дифференцируются в интердигитальные дендритные клетки, осуществляющие представление переработанного антигена Т-лимфоцитам. Отличительным иммунофенотипическим маркером клеток Лангерганса и интердигитальных дендритных клеток является поверхностный антиген незрелых тимоцитов v CD1a [10, 13]. Общими структурно-функциональными признаками всех дендритных клеток являются низкая способность к фагоцитозу, отсутствие в цитоплазме лизоцима, наличие S-100 протеина и маркерного фермента аденозинтрифосфатазы, а также сильная экс-

прессия на их поверхности продуктов генов гистосовместимости I и II классов.

Характерной особенностью клеток Лангерганса является высокая чувствительность к действию ультрафиолетовых лучей, вызывающих функциональную инактивацию и гибель клеток. В коже мышей обнаружена разновидность отросчатых эпидермоцитов - клетки Гранштейна, функция которых выявляется после инактивации ультрафиолетовыми лучами клеток Лангерганса. В этом случае связывание антигена клетками Гранштейна приводит к активации супрессорных клеток и развитию неответственности на антиген. Предполагается, что аналогичные клетки содержатся и в коже человека.

Выраженные отличия поверхностных и функциональных характеристик дендритных клеток дают основание рассматривать их как семейство клеток, стоящее особняком от макрофагальной системы [6, 8, 27].

При всем разнообразии клеток макрофагальной системы, обусловленном разной степенью зрелости и различной тканевой специализацией, их связывают общность основных функций, сходство структур и метаболических процессов, обеспечивающих реализацию этих функций. Сходными для всех макрофагов структурами являются развитый лизосомный аппарат и складчатая цитоплазматическая мембрана, от полноценности которой зависят специфические функции макрофагов: адгезия, миграция, фагоцитоз, секреция, цитотоксичность, межклеточные кооперации [7, 16, 21].

На поверхностной мембране моноцитов и макрофагов выявлены многочисленные рецепторы, в том числе рецепторы для захвата микроорганизмов (маннозный рецептор, scavenger-рецептор, CD14 v рецептор для захвата бактериальных липополисахаридов), связывания компонента, Fc-Ig, цитокинов, трансферрина, многих гормонов.

Наибольшее практическое значение для идентификации моноцитов и макрофагов имеют рецепторы для третьего и четвертого компонентов комплемента (C3, C4-рецепторы) и рецепторы для Fc-IgG, опосредующие иммунную адгезию и иммунный фагоцитоз. Количество данных рецепторов значительно увеличивается по мере созревания мононуклеарных фагоцитов и достигает максимальных значений у высокодифференцированных. Повышение экспрессии Fc- и C3, C4-рецепторов ассоциируется с увеличением функциональной активности макрофагов и может модулироваться биологически активными субстанциями: усиливаться лимфокинами, ингибироваться кортикостероидами, ретиноидами и колхицином [6, 7, 17]. Поверхностные Fc-IgG связывают мономерные и агрегированные IgG, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК).

Избыток иммуноглобулинов и ЦИК способен обратимо блокировать соответствующие Fc-рецепторы, тогда как взаимодействие с агрегатами иммуноглобулинов ведет к необратимой утрате Fc-рецепторов и для их восстановления требуется синтез *de novo* [7]. В экспериментальных и клинико-иммунологических исследованиях описана дефектность Fc-рецепторов макрофагов, с которой связывают пролонгированную циркуляцию иммунных комплексов и прогрессирование иммунопатологического процесса у больных с некоторыми аутоагрессивными заболеваниями [7, 17, 20]. В последние годы идентификация Fc-, C₃- и C₄-рецепторов осуществляется с помощью моноклональных антител CD64, CD11b и CD11c соответственно [6, 8, 17]. Помимо указанных рецепторов с помощью моноклональных антител на поверхности моноцитов и макрофагов идентифицировано большое количество других антигенов и рецепторов, ни один из которых, однако, не является строго специфичным для клеток макрофагальной системы [7, 20]. Наиболее характерный - CD14 - выявляется почти на 100% моноцитов и антигенперерабатывающих макрофагов, функционирует как рецептор для комплекса липополисахаридов и кодируется в длинном плече 5-й хромосомы, в непосредственной близости от генов, кодирующих факторы роста (IL-3, GM-CSF) и рецепторы для факторов роста гемопозитических клеток [13, 18, 20, 27]. Связывание антигеном CD14 комплекса липополисахаридов вызывает немедленную активацию моноцитов/макрофагов и включение синтеза TNF α , что дает основание рассматривать CD14 как рецептор для фактора роста клеток макрофагальной системы [18, 20, 30].

Характерным функциональным признаком моноцитов и макрофагов служит обилие лизосомных гранул и высокая активность лизосомных ферментов. Первичные лизосомы цитохимически принято подразделять на азурофильные и специфические гранулы. Азурофильные гранулы содержат в основном кислые гидролазы, из которых наибольшее практическое значение имеют α -нафтилацетат-эстераза и кислая фосфатаза. Подавляющаяся фторидом натрия α -нафтилацетат-эстераза считается линейно-специфичным ферментом клеток макрофагальной системы. Биологическая роль неспецифических эстераз окончательно не установлена; предполагается, что данные ферменты являются частью детоксицирующих систем моноцитов/макрофагов [1, 7, 11, 16]. Наиболее высокая активность α -нафтилацетат-эстеразы свойственна моноцитам, в зрелых макрофагах активность фермента значительно варьирует и зачастую не подавляется фторидом натрия [11, 21, 26]. Кислая фосфатаза является общепринятым

цитохимическим маркером лизосом [7]. В ряду клеток макрофагальной системы наиболее высокая активность кислой фосфатазы регистрируется в зрелых антигенперерабатывающих макрофагах, для которых характерны обилие лизосом и высокая активность лизосомных ферментов [16, 21, 23]. Специфические гранулы включают лизоцим, реже специфическую коллагеназу и не содержат кислых гидролаз [7].

Лизоцим (мурамидаза) - фермент, расщепляющий пептидогликаны микробной стенки, является надежным внутриклеточным маркером моноцитов и антигенперерабатывающих макрофагов. В отличие от гранулоцитов, выбрасывающих лизоцим только при дегрануляции, клетки СМФ постоянно секретируют лизоцим в окружающее пространство (конститутивный тип секреции). Продукция лизоцима не изменяется под воздействием факторов, стимулирующих или подавляющих функциональную активность клеток.

Вторичные лизосомы образуются в результате слияния первичных лизосом с фагоцитарными вакуолями и содержат, помимо лизосомных ферментов, фагоцитированный материал и/или продукты его деградации [6, 7]. Спектр и активность лизосомных ферментов отчетливо нарастают в процессе функциональной дифференцировки моноцитов в макрофаги и значительно отличаются в макрофагах различных типов [7, 13, 16, 21, 23].

По основным биохимическим параметрам макрофаги не имеют принципиальных отличий от других клеток, однако, характерной особенностью их метаболизма является способность к активации под влиянием различных стимулирующих факторов экзогенного (бактериальные антигены и токсины, ксенобиотики органической и неорганической природы) и эндогенного (лимфокины, компоненты комплемента, ЦИК) происхождения [7].

В процессе активации происходит резкое увеличение интенсивности метаболических процессов, получившее образное название "метаболический взрыв", повышаются уровни синтеза и секреции монокинов, активность лизосомных ферментов, экспрессия поверхностных рецепторов и антигенов (Fc-IgG, C₃, C₄-рецепторы, CD14), что в функциональном отношении проявляется усилением фагоцитарной активности, цитотоксичности и микробицидности макрофагов [6, 7, 17, 20]. У активированных макрофагов существенно изменяются морфологические характеристики: увеличиваются размеры клетки и складчатость цитоплазматической мембраны, нарастает количество цитоплазматических гранул и вакуолей, появляются включения фагоцитированного материала [7, 16, 20, 21]. В момент максимальной активации энергетического обме-

на, соответствующей «метаболическому взрыву», макрофаги генерируют высокоактивные нестабильные продукты восстановления кислорода: супероксиданион, гидроксильный радикал, синглетный кислород, перекись водорода, обладающие мощным антимикробным и цитотоксическим действием [3, 6, 7, 21]. Активные формы кислорода вступают в окислительные реакции с субстратами фаголизосом и служат источником повышенной хемолюминесценции макрофагов [7, 21]. Окислительные реакции сопровождаются накоплением токсичных метаболитов, в том числе продуктов перекисного окисления липидов, которые в физиологических условиях нейтрализуются защитной антиоксидантной системой клетки, включающей глутатион, супероксиддисмутазу, витамины Е, С и другие низкомолекулярные соединения. При недостаточности антиоксидантной защиты концентрация токсичных продуктов перекисного окисления может нарастать до критического уровня, при котором нарушается целостность лизосомных и цитоплазматических мембран макрофагов, что ведет к утечке активированных гидролаз и токсичных метаболитов в окружающую среду с последующими повреждающими эффектами [4, 7, 19].

Среди кислородзависимых продуктов секреции макрофагов особое значение имеют нитроокисные радикалы, обладающие высокой токсичностью в отношении различных бактерий, грибов и простейших и одновременно выраженной цитотоксичностью в отношении собственных клеток и тканей макроорганизма. С гиперпродукцией нитроокисных радикалов связан патогенез септического шока и некоторых аутоиммунных заболеваний [6, 8, 24].

Активированные макрофаги секретируют широкий спектр биологически активных продуктов (более 100) [6, 7, 9, 17, 25]. Среди секреторных продуктов главное место занимают провоспалительные и противовоспалительные цитокины.

Провоспалительные цитокины: IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 секретируются моноцитами и макрофагами в ответ на стимуляцию активирующими факторами (микроорганизмы, ЦИК, аутоантигены, лимфокины) и обладают чрезвычайно широким и во многом перекрывающимся спектром действия, который включает:

- воздействие на терморегуляторный центр гипоталамуса с развитием лихорадки;
- стимуляцию пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, в том числе стимуляцию синтеза и секреции IL-2 и иммуноглобулинов;
- повышение функциональной активности нейтрофилов, остеокластов и фибробластов и, как следствие, - усиление фагоцитоза, ре-

зорбция кости и образование коллагена соответственно;

- стимуляцию прокоагулянтной активности эндотелия, а также синтеза и секреции макрофагами тромбопластина, фактора, активирующего тромбоциты и других прокоагулянтных субстанций;
- синтез клетками печени белков острой фазы;
- аутокринную активацию других макрофагов, синтез и секрецию последними монокинов, в том числе IL-1, TNF α , GM-CSF, INF α [7-9, 13, 17, 24, 25].

Активированные макрофаги являются основными продуцентами провоспалительных цитокинов, вне активации эти цитокины не секретируются или продуцируются в крайне низких концентрациях, недоступных количественному определению современными методами [6, 9, 17, 24]. Альтернативную группу представляют противовоспалительные цитокины, из числа которых в наибольшей степени охарактеризованы IL-10 и TNF α . Макрофаги секретируют последовательно: провоспалительные цитокины, затем противовоспалительные, являющиеся сильнейшими ингибиторами их функций. IL-10 ингибирует продукцию макрофагами всех провоспалительных цитокинов, подавляет экспрессию поверхностных рецепторов для провоспалительных цитокинов, выключает секрецию лимфоцитами INF α . Особенностью биологического действия TNF α является мощная ингибция пролиферации Т- и В-лимфоцитов и естественных киллеров, угнетение функциональной активности макрофагов и лимфоцитов, а также стимуляция роста фибробластов и синтеза коллагена [6, 17].

Биологическая роль макрофагальной системы в поддержании гомеостаза организма человека чрезвычайно велика. Структурно-функциональные особенности моноцитов и макрофагов определяют участие этих клеток практически во всех метаболических процессах, в регуляции гемопоза и гемостаза, обеспечении неспецифической резистентности и специфических реакций иммунного ответа.

Участие в углеводном обмене определяется наличием у этих клеток мембранных рецепторов к инсулину и способностью к синтезу медиатора, обладающего инсулиноподобной активностью [6, 7]. Участие в обмене липидов опосредуется наличием у моноцитов и макрофагов поверхностных рецепторов для липопротеинов низкой плотности и способности к продукции липопротеиновой липазы. Образование и поглощение моноцитами/макрофагами больших количеств низкомолекулярных липидных метаболитов приводит к трансформации макрофагов в «пенистые клетки», которые играют активную роль в патогенезе атеросклеротического поражения со-

судов [7, 14]. Существенную роль в метаболизме липидов играют фиксированные макрофаги печени (клетки Купфера), которые являются первым макрофагальным барьером для крови, поступающей из сосудов кишечника, богатой хиломикронами и пищевым холестерином [3, 7].

Моноциты и макрофаги играют основную роль в поддержании постоянного уровня железа в организме. Железо является абсолютно необходимым и в то же время исключительно токсичным элементом, если присутствует в организме в концентрациях, превышающих емкость железосвязывающих белков [19, 28]. Потенциальная токсичность свободного железа объясняется его способностью как переходного металла запускать цепные свободнорадикальные реакции, приводящие к окислительным повреждениям биологических мембран, белков и нуклеиновых кислот [4, 19, 28]. Участие моноцитов и макрофагов в метаболизме железа опосредуется следующими основными механизмами:

- обеспечение рециркуляции железа путем фагоцитоза состарившихся эритроцитов и освобождения железа из гемоглобина;
- хранение основных фондов запасного железа в виде ферритина;
- продукция железосвязывающих белков - трансферрина и ферритина;
- продукция IL-1, модифицирующего обмен железа в условиях воспаления [3, 9, 19-21, 25].

Изучение роли IL-1 в обмене железа тесно связано с расшифровкой механизмов анемии, развивающейся в процессе опухолевых и хронических воспалительных заболеваний. IL-1 вызывает блокаду освобождения железа из тканевых запасов, снижение всасывания железа в кишечнике и повышение продукции моноцитами и макрофагами ферритина, что в совокупности приводит к развитию перераспределительного дефицита железа, снижению синтеза гемоглобина и развитию анемии [9, 12, 19, 22].

Макрофагальная система в целом рассматривается как своеобразный биологический фильтр крови и лимфы, удаляющий из них микроорганизмы, опухолевые и инфицированные вирусами клетки, токсины, различные метаболиты, некоторые лекарственные препараты и ЦИК. Основную роль в процессе очищения крови играют макрофаги печени и селезенки, при чем 85-95% этой функции обеспечивается клетками Купфера [3, 7]. Эффективность очищения крови резко снижается под действием препаратов, избирательно блокирующих функциональную активность макрофагов, например циклоспорина А, что приводит к значительному ослаблению резистентности организма к инфекциям и другим неблагоприятным воздействиям [3, 6, 21]. Повышение эффективности фагоцитарного филь-

ра крови наблюдали в экспериментальных условиях адаптации к умеренной гипоксии [2].

Участие моноцитов и макрофагов в регуляции гемостаза и гемопоза, как и многие другие функции, опосредуется секрецией биологически активных продуктов, оказывающих активирующее или ингибирующее воздействие. Активированные макрофаги секретируют прокоагулянтные факторы, одним из которых является тканевой тромбопластин [17, 21]. Важное практическое значение имеет тот факт, что некоторые цитостатические препараты (адриамицин, цисплатина) обладают способностью потенцировать прокоагулянтную активность моноцитов и макрофагов, особенно в присутствии бактериальных эндотоксинов [29].

Нормальное кроветворение является результатом баланса цитокинов с активирующими и ингибирующими эффектами. К монокинам, активирующим гемопоз, относятся IL-1, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток, а также гемопозитические факторы роста GM-CSF и M-CSF, стимулирующие грануло- и моноцитопоз. Ингибирующее влияние на гемопоз оказывают TNF α и TGF α (6, 9, 12, 17).

Макрофагам отводится существенная роль в процессах репарации и заживления ран. В начале процессов репарации макрофаги участвуют в удалении продуктов разрушенных тканей за счет эндоцитоза и деградации лизосомными гидролазами, затем рана очищается с помощью секретируемых нейтральных протеаз. На более поздней стадии репаративных процессов активированные макрофаги участвуют в регенерации эндотелиальных клеток, фибробластов и эпидермальных клеток, в восстановлении внеклеточного матрикса. Макрофаги секретируют несколько ростовых факторов, опосредующих ангиогенез и формирование фиброзной ткани: базисный фактор роста фибробластов, TGF β , TGF α , инсулиноподобный фактор роста [6, 7].

Представления о роли макрофагальной системы в реализации иммунных реакций организма претерпели существенные изменения в течение последних 15 лет. Иммунные функции макрофагов включают:

- обеспечение неспецифической резистентности посредством фагоцитоза и секреции цитотоксических медиаторов - лизоцима, INF α , TNF α , кислородных и нитроксидных радикалов;
- захват, обработку и представление антигенов Т- и В-лимфоцитам;
- секрецию биологически активных продуктов, регулирующих пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т- и В-

- лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, тучных клеток и естественных киллеров;
- цитотоксическую активность в отношении клеток, несущих аутоантитела, дегенерирующих, инфицированных микроорганизмами, а также опухолевых клеток [6-8, 10, 13, 17].

Перечисленные функции дают основание заключить, что клетки макрофагальной системы играют центральную роль как в обеспечении неспецифической резистентности, так и в реализации специфического иммунного ответа организма.

ЛИМФОЦИТЫ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНАЯ СИСТЕМА

Иммунокомпетентная система, морфологическим субстратом которой является лимфатическая ткань, поддерживает гомеостаз организма путем специфического распознавания и обезвреживания чужеродных субстанций.

Специфическое распознавание чужеродных веществ клетками иммунной системы приводит к активации этих клеток и развитию иммунного ответа. Различают два основных типа иммунного ответа: гуморальный и клеточный. При гуморальном иммунном ответе чужеродные вещества обезвреживаются антителами; антитела и комплемент¹ убивают клетки и вызывают воспаление. При клеточном иммунном ответе чужеродные или измененные собственные клетки убиваются лимфоцитами. Выделяют две главных популяции лимфоцитов - Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Т-лимфоциты участвуют, преимущественно, в клеточном иммунитете и регулируют уровень гуморального иммунитета. В-лимфоциты и их наиболее зрелые формы - плазматические клетки - продуцируют иммуноглобулины (антитела), то есть осуществляют синтез эффекторов гуморального иммунитета. Помимо Т- и В-клеток, в пределах лимфоцитов есть К- и NK-клетки. К-клетки не имеют специфических рецепторов для антигена и осуществляют свое действие при посредстве антител. NK-клетки способны специфически распознавать клетки-мишени и лизировать их без участия антител.

Иммунокомпетентная система представляет собой наиболее зрелое (дифференцированное) звено иммунной системы, способное к осуществлению различного рода иммунологических реакций. В составе иммунной системы есть и «иммунологически не компетентное» звено, которое

включает центральные органы иммуногенеза - костный мозг и тимус (рис. 38). Лимфоидные клетки костного мозга и тимуса представлены, в основном, незрелыми и дифференцирующимися предшественниками иммуноцитов (иммунокомпетентных клеток), в большинстве своем не способными осуществлять иммунологические реакции.

К числу периферических органов иммунной системы относятся инкапсулированные органы (селезенка, лимфатические узлы), неинкапсулированная лимфоидная ткань, связанная со слизистыми оболочками, кожей и другими органами, а также диссеминированный пул зрелых лимфоидных клеток крови и лимфы.

Главной клеткой иммунной системы является лимфоцит. Т- и В-лимфоциты для осуществления своих функций должны распознать антиген и перейти в активное состояние. Этот процесс осуществляется при помощи Т- и В-клеточных рецепторных комплексов, присутствующих на мембране лимфоцитов. В состав этих комплексов наряду со специфическими рецепторами антигена входят так называемые трансдьюсерные молекулы, то есть молекулы, обеспечивающие передачу сигнала внутрь клетки.

Специфическими рецепторами В-лимфоцитов являются молекулы иммуноглобулинов (описание структуры иммуноглобулинов дано в разделе, посвященном иммунохимическим методам диагностики). На В-лимфоцитах Ig-рецепторы нековалентно ассоциированы с двумя трансмембранными белками - $Ig\alpha$ и $Ig\beta$ или $Ig\alpha$ и $Ig\gamma$ (рис. 39). Молекулы Ig и полипептидные цепи, входящие в состав В-клеточного рецептора, являются наиболее надежными маркерами В-линейной принадлежности.

Т-клетки, так же, как и В-клетки, способны специфически распознавать антиген. Опознание антигена производится Т-клеточным рецептором, который по своей структуре во многом напоминает молекулу Ig, а точнее - Fab-фрагмент Ig.

Т-клеточные рецепторы могут существовать в двух гетеродимерных формах - $\alpha\beta$ (большинство периферических Т-клеток) и $\gamma\delta$ (примерно 5% периферических Т-клеток). Каждая цепь состоит из 2 доменов - один "константный", другой - "ва-

¹ Комплемент - неспецифический гуморальный фактор защиты (в основном от микроорганизмов). Состоит из 15 белков, многие из которых являются ферментами. Активация компонентов комплемента ведет к воспалительным процессам, лизису клеток или их опсонизации, стимулирующей фагоцитоз. Классическая активация комплемента происходит при взаимодействии антигена и антител, альтернативный путь активации не требует подобных взаимодействий.

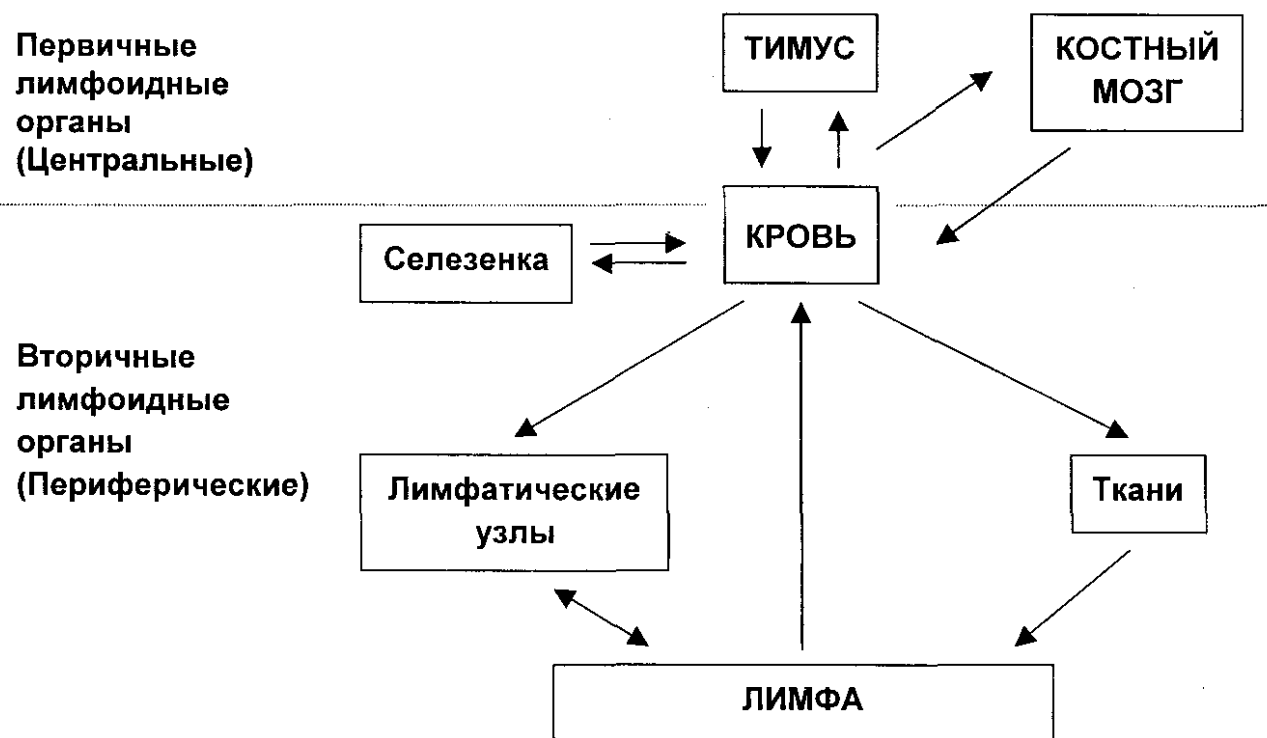


Рис. 38. Периферические и центральные органы иммунитета. Стрелками показано направление движения лимфоидных клеток.

риабельный”, причем вариабельность выражена значительно больше, чем в V-областях Ig. Только при объединении обеих цепей рецептор приобретает функциональную специфичность.

Передача сигнала, ведущего к активации Т-клеток после связывания TCR с презентруемым антигеном¹, осуществляется комплексом CD3. В составе CD3 присутствуют 3 полипептидных цепи: γ , δ , ϵ . Вдобавок, с CD3 ассоциирован димер молекул ζ , не относящихся к CD3. Цитоплазматические домены CD3 и ζ способны взаимодействовать с белковыми тирозинкиназами после стимуляции TCR и, таким образом, передавать сигнал внутрь клетки.

TCR, CD3 и сигнальные двухцепочечные молекулы ($\zeta\zeta$) образуют Т-клеточный рецепторный комплекс. На рис. 40 представлено взаимодействие TCR CD8-лимфоцита с антигеном на АПК.

Для активации Т- и В-лимфоцитов необходимы межклеточные контакты, а также растворимые факторы, называемые цитокинами. В ходе межклеточных контактов происходит распознавание антигена и получение Т-клеткой так называемых костимуляторных сигналов.²

Термин цитокины пришел на смену понятиям лимфокины и монокины. Цитокины - это продуцируемые клетками небольшие белковые молекулы, активно участвующие в межклеточных взаимодействиях и неспецифичные к антигену. Это колониестимулирующие факторы, интерлейкины, интерфероны и факторы некроза опухоли. В настоящее время известно более 20 различных цитокинов. Остановимся на тех из них, которые участвуют в созревании иммунокомпетентных клеток и регуляции иммунного ответа.

Интерлейкин-1 (IL-1). Известен так же как фактор, активирующий лимфоциты, или эндогенный пироген. Существует в двух формах α и β . Продуцируется большинством клеток, в ходе иммунного ответа, главным образом, макрофагами. Играет центральную роль в иммунных и воспалительных ответах *in vivo*. Индуцирует пролиферацию преактивированных Т-клеток. Оказывает действие на многие клеточные типы. В комбинации с IL-3, IL-6 и G-CSF стимулирует пролиферацию стволовых клеток. Имеет перекрестную активность человек-мышь. Стимулирует рост фибробластов.

¹ Пептидный фрагмент в комплексе с молекулами HLA на поверхности АПК.

² Костимуляторной молекулой для CD8 Т-клеток является B7, взаимодействующая с CD28 и необходи-

мая для активации Т-клеток и секреции ими IL-2. Костимуляторной молекулой для CD4 Т-клеток является CD40.

HLA практически всегда губительны для патогена: убийство инфицированных вирусом клеток, активация микробицидного действия макрофагов в отношении внутриклеточных бактерий, активация В-клеток для продукции антител, способных элиминировать или нейтрализовать внеклеточные патогены.

Т-хелперные лимфоциты имеют на мембране рецептор CD4 для молекул HLA-II, а Т-цитотоксические лимфоциты имеют рецептор CD8 для молекул HLA-I.

Если микробный агент (вирус) способен размножаться в клетке, то такая клетка должна быть уничтожена Т-цитотоксическими лимфоцитами (Т-киллерами). Вирусные пептиды, синтезированные внутриклеточно, связываются с молекулами HLA-I внутри клетки. Затем образовавшийся комплекс транспортируется на мембрану клетки, где CD8+ цитотоксический Т-лимфоцит распознает комбинацию вирусного пептида с молекулой HLA-I и убивает эту клетку.

В случаях фагоцитоза микроорганизма макрофагами (реже - дендритными клетками) происходит его переваривание лизосомальными ферментами, связывание с молекулами HLA-II и транспортировка на мембрану клеток. Здесь комплекс пептид - HLA-II распознается CD4 Т-хелперами (воспалительные Т-хелперы, T_H1), которые не убивают представляющую антиген клетку, а начинают синтезировать серию цитокинов для активации макрофагов. Другая популяция Т-хелперов (T_H2) усиливает специфические иммунные ответы, поддерживая пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов.

Помимо киллерного действия, активации макрофагов и В-клеток, Т-лимфоциты (Т-супрессоры) способны специфически подавлять активность других Т-клеток, то есть снижать силу иммунного ответа или индуцировать толерантность. Подавление аллореактивности (действия Т-киллеров) или аутоиммунных проявлений (действия T_H1) опосредуется CD4 Т-клетками, продуцирующими TGF β и IL-4.

В-лимфоциты также способны перерабатывать антиген, поступивший в клетку посредством иммуноглобулиновых рецепторов, и презентовать его Т-хелперам (T_H2). Первичная иммунизация Т-клеток возможна только при их взаимодействии с профессиональными АПК (но не фибробластами или эпителиальными клетками) и при обеспечении костимуляторных сигналов. Это обеспечивается при взаимодействии ряда молекул адгезии Т-лимфоцитов (CD28, CD2, LFA-1) с комплементарными структурами антигенпрезентирующих клеток (B7, LFA-3, ICAM-1). Иммунизированные таким образом Т-лимфоциты превращаются в клетки памяти или, иначе говоря, становятся армированными (воо-

руженными) Т-лимфоцитами. Для активации армированных Т-лимфоцитов костимуляторные сигналы (B7-CD28) не требуются. Армированные T_H2 , взаимодействуя с презентующей антиген В-клеткой, продуцируют серию цитокинов для дифференцировки В-лимфоцита и образования В-клеток памяти.

Формирование функционально активного рецепторного комплекса происходит постепенно по мере дифференцировки Т- и В-лимфоцитов.

Лимфоциты в костном мозге

В костном мозге человека после рождения происходят наиболее ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. Незрелые предшественники Т- и В-лимфоцитов (протимоциты, про-В лимфоциты, пре-пре-В лимфоциты, пре-В лимфоциты) образуются только в костном мозге. Для развития в зрелые Т-клетки или В-клетки примитивные костномозговые клетки-предшественницы нуждаются в специфическом микроокружении. Необходимыми являются межклеточные контакты (в тимусе, костном мозге) и продукция специфических цитокинов: IL-7 для раннего развития В-клеток, IL-2 для Т-клеток.

Костномозговой В-лимфопоз. В-лимфопоз характеризуется последовательными событиями, заключающимися в формировании специфических рецепторов (Ig), избирательной экспрессией мембранных и цитоплазматических маркеров, изменением чувствительности к ростовым и дифференцировочным сигналам, выделяемым стромальными клетками, и цитокинам.

Созревание В-клеточного рецептора. Количество специфичностей В-клеток и продуцируемых ими иммуноглобулинов чрезвычайно велико. Однако в зародышевой клетке не присутствуют гены антител для каждого изолированно взятого антигена. Генерация репертуара антител во многом обусловлена соматическими комбинаторными механизмами на уровне генных сегментов ДНК. Молекула иммуноглобулина состоит из 2 легких и 2 тяжелых полипептидных цепей. Известны 2 типа легких (L) цепей (κ и λ) и 5 классов тяжелых (H) цепей (μ , γ , α , δ , ϵ), а также их подтипы и подклассы. В молекуле Ig имеется 2 идентичные L-цепи и 2 идентичные H-цепи. Строение легких и тяжелых цепей Ig различное. Тип или класс иммуноглобулина обусловлен константной (C) областью H- и L-цепей, а его специфичность - вариабельной (V) областью. При объединении вариабельных областей H- и L-цепей в молекуле Ig образуется 2 специфических антигенсвязывающих участка.

H- и L-полипептидные цепи Ig не наследуются как нечто целое, напротив, генные сегменты, кодирующие различные участки этих белков в молекуле ДНК, разобщены. Они начинают груп-

Интерлейкин-2 (IL-2) является одним из наиболее полно изученных цитокинов. Это гликопротеид с молекулярной массой 15 кДа, который участвует почти во всех клеточных иммунных ответах. Продуцируется, главным образом, Т-хелперными лимфоцитами, активированными антигенпрезентирующими макрофагами или митогеном. Эффект IL-2 опосредуется его взаимодействием со специфическим рецептором (IL-2R). IL-2R экспрессирован на Т-клетках, некоторых В-клетках и моноцитах после их активации. Существует 3 изоформы IL-2R. После связывания IL-2 с высокоаффинными рецепторами запускаются события внутриклеточной активации. Лимфоциты, отвечающие на IL-2, пролиферируют, дифференцируются и продуцируют широкий набор молекул, участвующих в межклеточных взаимодействиях.

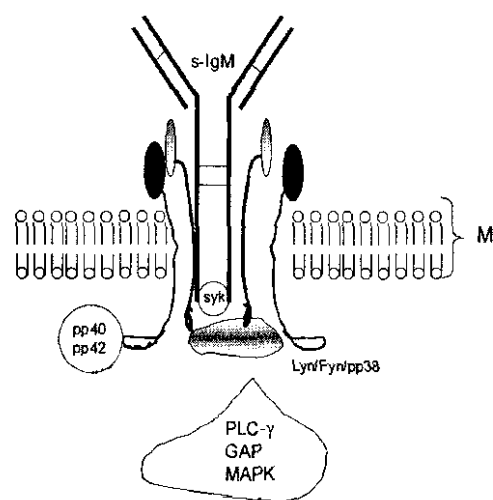


Рис. 39. Структура В-клеточного рецепторного комплекса.

Syk, Lyn, Fyn, pp38, pp40, pp42, PLC-γ, GAP, MAPK - молекулы, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала.

Интерлейкин-4 (IL-4) ранее назывался В-клеточным фактором роста, поскольку он увеличивает синтез ДНК в клетках, обработанных анти-IgM. IL-4 характеризуется широким спектром действия на В-клетки (вхождение в S-фазу), Т-клетки, тимоциты, макрофаги (повышение экспрессии Ia-антигенов), гемопоэтические предшественники, эозинофилы (поддерживает рост), нейтрофилы и эндотелиальные клетки. Влияет на изотипическое переключение синтеза IgE и IgG1 в В-клетках, стимулированных липополисахаридом (ЛПС). IL-4 синтезируется Т-клетками, тимоцитами и, возможно, предшественниками тучных клеток [10]. Плеоморфизм действия IL-4, секретируемого при Т-клеточных лимфомах, служит одним из объяснений многообразия кле-

точных компонентов в участках опухолевого роста (плазмочиты, эпителиоидные гистиоциты, эозинофилы). IL-4 может быть фактором аутокринной регуляции при некоторых В-клеточных лимфомах, в том числе CD5-положительных. Подавляет пролиферацию клеток неходжкинских лимфом, вызванную анти-Ig. В культуре тканей наиболее активен для человеческих периферических лимфоцитов.

Интерлейкин-5 (IL-5) описан как Т-клеточный лимфокин, стимулирующий активированные В-клетки к продукции антител. Действует на Т-лимфоциты, В-лимфоциты и гемопоэтические предшественники. Является фактором дифференцировки эозинофилов. Продуцируется Т-клетками и В-лимфоцитами, трансформированными вирусом Эпштейна-Барра. Стимулирует дифференцировку 14-дневных КОЕ.

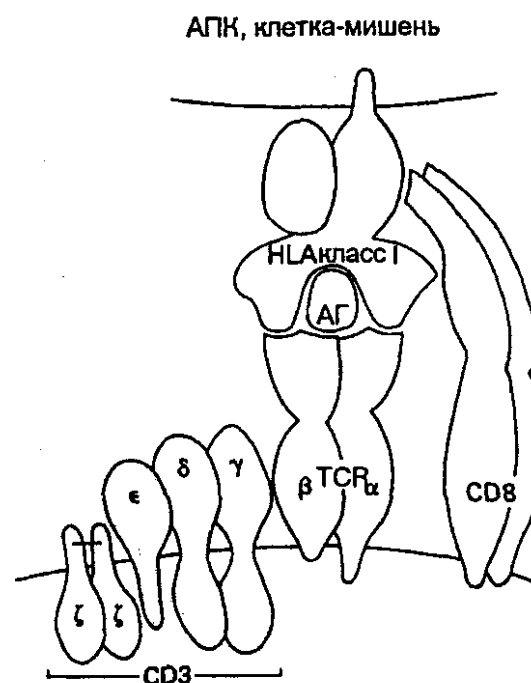


Рис. 40. Структура Т-клеточного рецепторного комплекса.

Обозначения см. в тексте.

Интерлейкин-6 (IL-6) описан как Т-клеточный фактор стимуляции В-клеток (BSF-2), вызывающий терминальную дифференцировку В-клеток до плазматических клеток. Действует на множество клеток: Т-клетки, миеломные клетки, мегакариоциты, гемопоэтические стволовые клетки, гепатоциты, нервные клетки, мезангиальные клетки и кератиноциты эпидермиса. Введение IL-6 in vivo ведет к увеличению числа тромбоцитов. Продуцируется разнообразными клетками: Т-клетками, В-клетками, моноцитами, макрофагами, синцитиотрофобластом, мезангиальными

клетками, фибробластами, эндотелиальными клетками и кератиноцитами эпидермиса. В состав IL-6 семейства цитокинов помимо IL-6 входят IL-11, ЦНТФ, кардиотрофин-1 (КТ-1), LIF и онкостатин М (ОМ). Наблюдающееся в ряде случаев сходство действия этих факторов на клетки обусловлено тем, что для передачи сигнала IL-6 цитокины используют общую трансдучерную молекулу gp130. Поэтому их иначе называют gp130 цитокинами. В процессе функционирования gp130 димеризуется и изменяет эпигенетическую структуру, что позволяет судить об его активации при некоторых В-клеточных лимфомах и миеломе [Tupitsyn et al., 1998]. IL-6 играет патогенетическую роль при ряде заболеваний: миксеме сердца (продуцируется опухолевыми клетками), миеломной болезни, болезни Кастельмана, ряде неходжкинских лимфом и синусном гистиоцитозе.

Интерлейкин-7 (IL-7) первоначально охарактеризован по способности поддерживать пролиферацию В-клеточных предшественников (B220+ IgG-) у мышей. Продуцируется клетками селезенки, тимуса, костного мозга. Стимулирует пролиферацию про-В и пре-В клеток, но не slgM+ клеток. Поддерживает пролиферацию ранних предшественников Т-клеток (CD4-CD8-). IL-7 является мощным ростовым фактором при синдроме Сезари и может участвовать в паракринной регуляции при кожных Т-клеточных лимфомах. В комбинации с IL-2 действует на зрелые Т-клетки.

Интерлейкин-10 (IL-10) первоначально описан как продуцируемый Т-клетками цитокин, способный блокировать продукцию INF γ Т-хелперными клетками первого типа (Т_{H1}) так же, как продуцируемый В-клетками фактор роста тимоцитов. IL-10 оказывает действие на Т- и В-лимфоциты (фактор роста и дифференцировки) и моноциты. Ингибирует антигенспецифичную Т-клеточную активацию, блокирует продукцию цитокинов моноцитами и макрофагами. Продуцируется Т-хелперами (Т_{H0}, Т_{H2}), а также моноцитами, макрофагами и В-клетками. Аутокринная секреция IL-10 может поддерживать пролиферацию ряда В-клеточных лимфом.

Интерферон- γ (INF γ) - это белок с молекулярной массой 17 кДа. INF γ продуцируется Т-хелперными клетками (основные продуценты), Т-супрессорными клетками, NK-клетками и макрофагами. Активация экспрессии гена INF γ в Т-хелперных клетках происходит под действием IL-2, а также некоторых микробных антигенов. Для продукции INF γ пролиферация Т-клеток не является обязательной. INF γ обладает противовирусным действием, а, кроме того, к нему чувствителен целый ряд других патогенов (простейшие, гельминты, бактерии, грибы, хламидии,

риккетсии). Биологическое действие INF γ различно для разных клеточных типов:

- Индуцирует повышение экспрессии молекул HLA-DR (часто в сочетании с ICAM-1) на эпителиальных, эндотелиальных клетках и макрофагах.
- Т-клетки: индукция созревания цитотоксических клеток, ингибирование созревания супрессоров, повышение пролиферативной активности в ответ на IL-2.
- В-клетки: дифференцированный контроль синтеза различных изотипов Ig.
- NK-клетки: повышение цитотоксичности.
- Макрофаги: индукция синтеза IL-1 и TNF, активация респираторного взрыва, микробцидной и туморцидной активности.
- Опухолевые клетки: индукция/повышение экспрессии молекул HLA-I и II классов, а также опухолеассоциированных антигенов.

Фактор некроза опухоли, туморонекротический фактор (TNF) получил свое название из-за способности вызывать некроз целого ряда опухолей, является одним из самых мощных и плеотропных цитокинов. Молекулярная масса 17 кДа, нативная молекула является нековалентным тримером. Описана трансмембранная форма с молекулярной массой 26 кДа, участвующая в контактной клеточной цитотоксичности. После связывания со специфическими рецепторами (присутствуют практически на всех клеточных типах) TNF подвергается эндоцитозу. Влияние на гемопоэтические и лимфоидные клетки:

- подавляет колониеобразование и пролиферацию эритроидных предшественников;
- стимулирует дифференцировку и пролиферацию миеломоноцитарных клеток;
- повышает дегрануляцию, продукцию активных радикалов кислорода, фагоцитоз и опосредованную антителами клеточную цитотоксичность нейтрофилов;
- стимулирует синтез цитокинов макрофагами (M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6 и IL-8);
- является митогеном для Т- и В-клеток;
- индуцирует синтез INF γ , рецептора IL-2 и HLA-I зрелыми Т-клетками человека;
- играет важную роль в развитии кахексии, септического шока и аутоиммунных расстройств.

Межклеточные взаимодействия в ходе иммунного ответа играют решающую роль в процессах распознавания чужеродных антигенов, активации и дифференцировки лимфоидных клеток. Т-клетка распознает антиген в комплексе с молекулами HLA. Функция молекул HLA состоит в том, чтобы связывать пептидные фрагменты, происходящие из патогенов, и перемещать их на клеточную мембрану для распознавания соответствующими Т-клетками. Последствия распознавания Т-клетками комплекса пептид-

пироваться, объединяться и приобретать новую конфигурацию (перестройка или реаранжировка генов Ig) лишь после того, как лимфоцит избирает В-линейную направленность дифференцировки. В упрощенном виде можно сказать, что ген переменной области L-цепей собирается из 2 сегментов (V, J), а ген переменной области H-цепей - из 3 сегментов (V, D, J): V - вариативный, D - разнородный, J - объединяющий. Полный ген иммуноглобулиновых цепей включает, наряду с перечисленными сегментами, участки ДНК для константной (C) области L-цепи (κ , λ) и H-цепи (μ , δ , γ , α , ϵ). Для тяжелых цепей описано около 200 V-генов, 10 D-сегментов и 6 J-сегментов. Для κ и λ цепей описано более 40 V-генов, 5 J κ и 6 J λ сегментов. В ходе созревания В-клетки в ней используется лишь по одному из существующих V-, J- и D-генов, что позволяет образовывать в результате комбинаций и сочетания V_H и V_L огромное разнообразие антителных специфичностей ($\sim 10^6$). Процесс реаранжировки генов Ig контролируется комплексом энзимов, носящих общее название "V(D)J-рекомбиназа". Особенностью данного комплекса ферментов, присущей только В-лимфоцитам, является наличие гетеродимерной эндонуклеазы RAG-1/RAG-2 (recombination-activating genes), необходимой на начальных этапах расщепления ДНК. Вторым специфическим компонентом V(D)J-эндонуклеазного комплекса является TdT-фермент, функционирующий лишь в течение очень короткого периода дифференцировки В-клеток (только на этапе сборки μ -цепей) и являющийся ядерным маркером незрелых В-клеток. Схематично процесс реаранжировки генов Ig представлен на рис. 41.

Два наиболее ранних события в ходе дифференцировки В-лимфоцитов происходят практически одновременно: перестройка генов тяжелых μ -цепей иммуноглобулинов и появление на мембране клеток молекулы CD19. Происходит это в клетках, экспрессирующих молекулы HLA-DR, часто в сочетании с CD38 и CD34. Самый ранний распознаваемый этап дифференцировки В-клеток носит название про-В-лимфоцита. На этой стадии дифференцировки клетки могут иметь цитоплазматические CD22, экспрессия CD10 («common») антигена отсутствует. На стадии про-В-лимфоцитов происходит объединение D и J κ -сегментов тяжелой цепи IgM, то есть начальный этап перестройки генов Ig.

Отличительной чертой следующего этапа дифференцировки В-лимфоцитов является постоянство экспрессии CD10 («common») антигена. Эта стадия дифференцировки носит название пре-пре-В. Происходит формирование функционального гена μ -цепи (V-сегмент объединяется с J κ), однако, цитоплазматическая

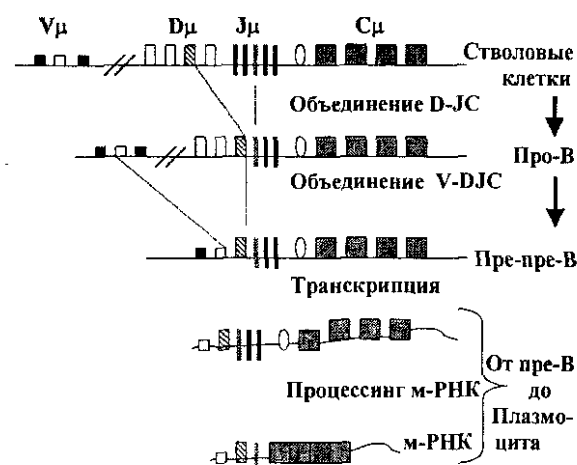


Рис. 41. Схема перестройки генов Ig и формирования м-РНК для μ -цепи IgM.

μ -цепь еще не экспрессируется. На данном этапе созревания В-лимфоцита гены легких полипептидных цепей иммуноглобулинов остаются в зародышевой конфигурации. После появления цитоплазматических μ -цепей клетка приобретает фенотип пре-В-лимфоцита. На данной стадии дифференцировки происходит перестройка генов κ -цепей, а затем - λ -цепей (объединение V и J λ). Легкие цепи иммуноглобулинов еще не синтезируются в пре-В-клетках. В последние годы установлено, что продукты перестроенных генов μ -цепей (D μ J μ C μ и μ H) экспрессируются на мембране В-клеточных предшественников в комплексе с «суррогатными» λ -цепями (нековалентно ассоциированные белки, напоминающие структуру легкой цепи). Данный комплекс служит своеобразным индикатором того, что произошла продуктивная перестройка генов Ig, и клетка может вступить в следующую стадию своей дифференцировки. Клетки, с непродуктивно перестроенными генами Ig гибнут в костном мозге, вероятно, апоптозом [43].

Последовательность появления В-клеточных антигенов и рецепторов на мембране костномозговых В-лимфоцитов такова: CD19 → CD24 → CD10 → CD20 → CD22 → cIg(μ) → CD21 → sIgM → sIg(M+D).

Процесс дифференцировки В-клеток в костном мозге регулируется стромальными клетками костного мозга посредством адгезионных взаимодействий и продукции цитокинов (рис. 42).

Важную роль в поддержании пролиферации и дифференцировки ранних предшественников В-клеток играют растворимые факторы и цитокины (IL-7, c-kit, IL-11, IGF), которые продуцируются клетками стромы. Адгезионные взаимодействия регулируют связь стромальных клеток с клетками-предшественниками и выход последних в циркуляторное русло. В-клеточные предшест-

венники экспрессируют CD29 (β_1 -цепь адгезионных структур интегринов) и CD18 (β_2), необходимые для взаимодействия со стромой. Большую роль в этих взаимодействиях играет семейство молекул CD44.

Конечные этапы созревания В-лимфоцитов в костном мозге соответствуют незрелым В-клеткам (мембранные IgM) и зрелым девственным (virgin) В-клеткам (мембранные IgM+IgD). В-клетка покидает костный мозг, имея сформированный рецепторный иммуноглобулиновый аппарат (коэкспрессия мембранных IgM и IgD), причем активационные антигены CD23 и CD5 на мембране отсутствуют.

Незрелые sIgM⁺ В-клетки костного мозга имеют уникальный фенотип: sIgM⁺ sIgD⁻ CD21⁻ CD22⁻. Таких клеток в периферической крови нет. IgD отсутствует примерно на 30% костномозговых IgM⁺ клеток (диапазон 5-60%). Большинство из них не имеет мембранных CD21 и CD22 [17] или экспрессирует эти антигены на крайне низком уровне [15]. Незрелые В-клетки могут быть необратимо инактивированы (стать толерантными) низкими дозами антигена или анти-Ig, так как не способны к синтезу имму-

ноглобулинов после перекрестного связывания и кэплинга мембранных IgM.

Костномозговой Т-лимфопоэз. В организме взрослого человека продукция предшественника Т-клеток происходит в костном мозге. И лишь затем они заселяют тимус и далее - периферические лимфоидные ткани. Плюрипотентные клетки-предшественницы, способные давать начало всем росткам кроветворения, сосредоточены в костном мозге во фракции лимфоидных клеток, экспрессирующих на мембране антиген стволовых гемопоэтических клеток (CD34). Эти клетки способны давать начало также стромальным клеткам. Появление на мембране CD34⁺ клеток HLA-DR антигенов свидетельствует об их направленности к гемопоэтической дифференцировке.

Наиболее ранним Т-клеточным антигеном является CD7. Вместе с тем, экспрессия только CD7 или CD7 в сочетании с CD34 еще не указывает на принадлежность клеток к Т-линии. Часть этих клеток впоследствии дифференцируется по миелоидной линии гемопоэза. На этапе самых ранних протимоцитов экспрессия CD7 может быть ассоциирована с «лимфоидным» антиге-

СТРОМА КОСТНОГО МОЗГА

Клетки стромы: VCAM, IL-7, IL-11, СФ, ИнсФР

Матрикс: фибронектин, гиалуронат, протеогликаны, ИнсФР

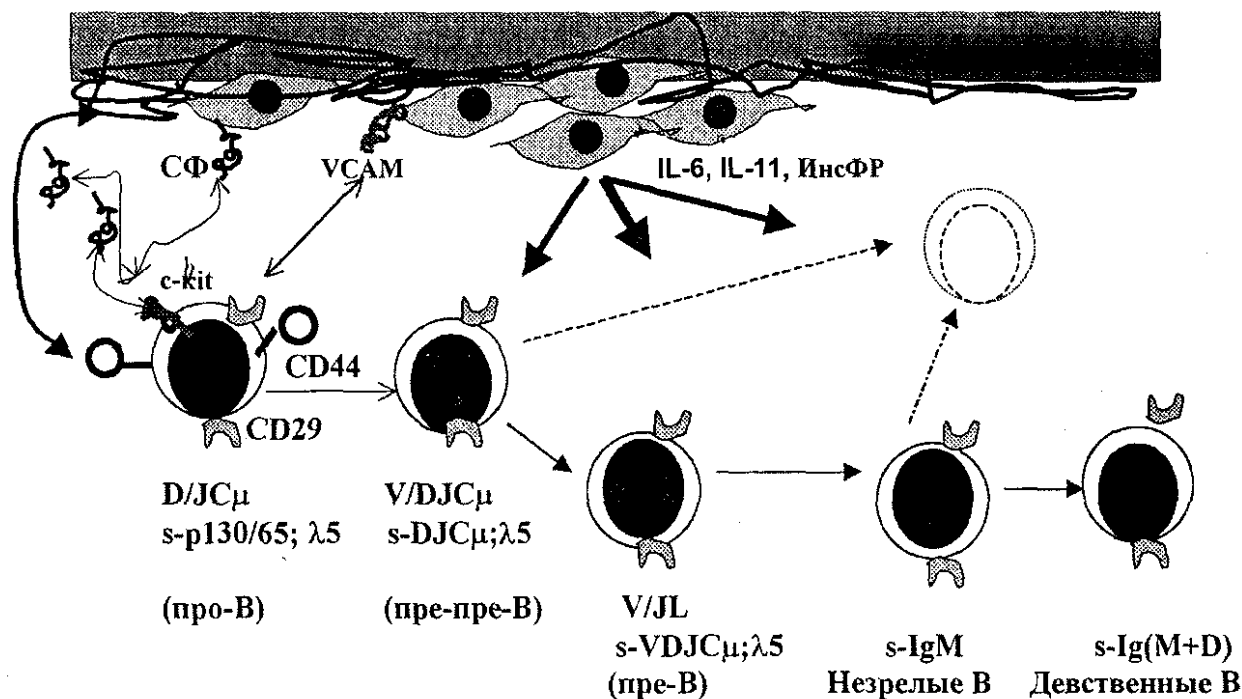


Рис. 42. Взаимодействие В-клеточных предшественников с микроокружением в костном мозге.

ном CD10. Практически одновременно с CD7 или чуть позже на Т-клеточных предшественниках появляется молекула CD5, а затем и CD2. Начальные костномозговые этапы Т-лимфоцитопоэза еще не до конца изучены. Незрелые протимоциты экспрессируют CD45, но не имеют молекул HLA-II, TdT и CD3 [16].

Подобно иммуноглобулиновым генам, гены, кодирующие полипептидные цепи Т-клеточного рецептора, собираются из отдельных сегментов - V-D-J-С (β) или V-J-С (α). Процесс перестройки TCR $\gamma\delta$ начинается наиболее рано в онтогенезе Т-лимфоцитов, по-видимому, на этапе костномозговых протимоцитов; γ -ген формируется из V γ (существует 15 сегментов V γ , 10 из них подвергаются перестройке, но лишь 8 являются функциональными: V γ ₂₋₅, V γ ₈₋₁₁), J γ (3 локуса для J γ 1 и 2 локуса для J γ 2), а также C γ 1 и C γ 2. TCR δ -генные последовательности располагаются между V α и J α -генными кластерами. Охарактеризованы 6 различных функциональных V δ -генов, 4 D-сегмента, 3 J-сегмента и 1 С-ген. Количество различных комбинаторных вариантов TCR $\gamma\delta$ составляет 10^{13} .

Лимфоциты и тимус

Незрелые предшественники Т-лимфоцитов из костного мозга с током крови поступают в тимус. Становление репертуара Т-лимфоцитов происходит в тимусе. В механизмах интратимического созревания и селекции Т-клеток активную роль играют процессы генной рекомбинации и клеточного апоптоза. В тимусе формируется набор специфичностей Т-лимфоцитов, участвующих в эффекторных реакциях в периферических лимфоидных тканях.

Тимус (вилочковая железа) является лимфоидно-эпителиальным органом. Основным структурным элементом тимуса является тимическая доля (рис. 43). Процессы внутритимической дифференцировки и селекции происходят в различных отделах доли. В тимусе представлен широкий спектр лимфоидных и эпителиальных клеток: субкапсулярные тимические бласты, кортикальные тимоциты, медуллярные тимоциты, тельца Гассаля, дендритные клетки и т.д.

Тимоцитарная пролиферация предшествует экспрессии TCR $\alpha\beta$. При поступлении в тимус протимоциты становятся коммитированными по Т-клеточной линии и начинают экспрессировать CD3 в цитоплазме (сCD3) и TdT. Эти незрелые тимоциты являются крупными бластами и клетками среднего размера с высокими уровнями экспрессии TdT и самой большой пролиферативной активностью среди всех тимоцитов. Они являются негативными в отношении CD4 и CD8, не экспрессируют CD1 и TCR β (перестройка β -генов происходит на данной стадии, и они еще

не функционируют). Более 90% сCD3+ незрелых тимоцитов экспрессируют рецептор IL-2 (CD25). На следующем этапе дифференцировки обычные (common) или кортикальные тимоциты являются сCD3+ TdT-.

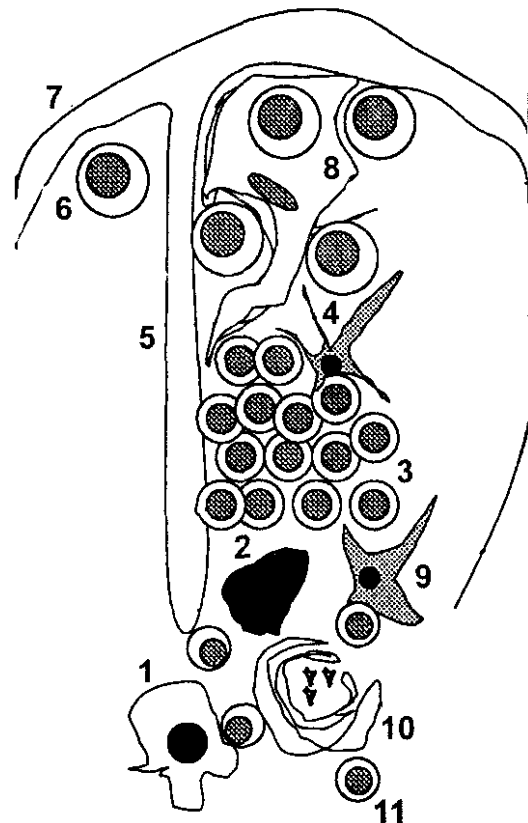


Рис. 43. Структура тимической доли.

1 - медуллярные эпителиальные клетки; 2 - макрофаг; 3 - агрегаты кортикальных тимоцитов; 4 - кортикальная дендритная клетка; 5 - септа; 6 - лимфобласт; 7 - капсула; 8 - клетка-нянька; 9 - интердигитирующая клетка; 10 - тельце Гассаля; 11 - медуллярный тимоцит.

Они имеют средний уровень пролиферативной активности и отличаются по появлению цитоплазматической экспрессии TCR β . В кортикальных тимоцитах только начинается перестройка α -генов и TCR $\alpha\beta$ еще не экспрессирован. Клетки имеют на мембране CD4 и CD8, CD1+, CD2+. На поздних стадиях тимического развития зрелые (медуллярные) тимоциты экспрессируют либо CD4 либо CD8, мембранные CD3+ (mCD3+), CD2+, TCR $\alpha\beta$ +, TdT и CD1 утрачиваются (TdT-, CD1-).

Многие данные относительно генов TCR получены экспериментально и, возможно, у человека еще будут уточнены. Последовательность перестройки генов TCR по всей видимости такова: δ , γ , β , α . Продуктивная перестройка TCR β на одной хромосоме ведет к блокаде рекомбинации TCR β -локуса на другой хромосоме (аллельное исключение [53]). TCR α -гены не характеризуются

аллельным исключением и в Т-лимфоцитах человека может быть 2 продуктивных TCR α -гена. Собирается α -цепь из 3 сегментов (V-J-C), а β -цепь - из 4 (V-D-J-C) - рис.44. Существуют 44 гена V α , 61 ген J α и 1 ген C α . Для β -цепей это разнообразие также очень выражено: 65 V β сегментов, 2 D-сегмента, 13 J-сегментов. При объединении α и β -полипептидов может образоваться до 10^{19} различных комбинаций.

Существует примерно 32 V α и V β родственных последовательностей. В специализированной Т-клетке объединены один V α и один J α сегменты; V β -ген объединен с D β_1 и одним из J β_1 -сегментов или с D β_2 и J β_2 -сегментом. Итоговые пептиды соответствуют комбинации V α J α C α либо с V β D β J β_1 C β_1 либо с V β D β J β_2 C β_2 .

Разделение на $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ линий происходит во время или после перестройки TCR β , так как β -ген часто перестроен в $\gamma\delta$ Т-клетках. Во время перестройки TCR α -гена TCR δ -ген делегируется, так как он расположен между V α и J α -генными сегментами.

Из огромного числа образованных в тимусе Т-лимфоцитов, несущих различные специфичности $\alpha\beta$ -рецепторов, лишь незначительная часть отбирается для последующего поступления в периферические лимфоидные органы, а остальные Т-лимфоциты гибнут. Позитивной тимической селекции подвергаются те CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ + тимоциты, которые потенциально полезны для организма. Они толерантны к аутологичным антигенам и способны распознавать чужеродные антигены в комплексе с собственными молекулами HLA, причем взаимодействие с собственными HLA осуществляется с достаточно низким аффинитетом. Клоны тимоцитов, которые не взаимодействуют или сильно взаимодействуют с собственными молекулами HLA, элиминируются в тимусе (отрицательная селекция). Тимоциты, распознавшие молекулу HLA-I, теряют CD4 и сохраняют CD8, а клетки, распознавшие молекулу HLA-II, сохраняют CD4 и теряют CD8.

Процессы селекции, действующие на TCR $\gamma\delta$ -клетки, отличаются от селекции, известной для TCR $\alpha\beta$ -клеток, так как для $\gamma\delta$ -клеток нет HLA-ограничения. Тимоциты, экспрессирующие TCR и прошедшие этапы интратимической селекции, дифференцируются в функционально зрелые CD4+ или CD8+ популяции. В периферические лимфоидные органы из тимуса поступают наивные Т-лимфоциты (CD4+ или CD8+). Характерной иммунофенотипической особенностью этих клеток является мембранная экспрессия молекулы CD45RA.

Таким образом, тимус является центральным органом иммунной системы, ответственным за образование пула наивных Т-лимфоцитов. Позитивно отобранные клетки в итоге покидают тимус и патрулируют тело в качестве длительно живущих покоящихся лимфоцитов. Их реактивация может произойти, как правило, только под влиянием чужеродных пептидов, представленных собственными молекулами HLA.

Лимфоциты в периферических лимфоидных органах

В периферических или вторичных лимфоидных органах происходит генерация эффекторных молекул (антител) и эффекторных клеток (Т- и В-лимфоцитов) в ходе первичного или вторичного контакта лимфоцитов с антигеном. Характерной особенностью периферических лимфоидных органов является четкое анатомическое разобщение Т- и В-клеточных зон. При этом В-клеточные зоны, в основном, выглядят как компактные шаровидные образования, носящие название фолликулов. Сказанное справедливо для лимфатических узлов, селезенки и лимфоидной ткани слизистых (MALT).

Рециркуляция лимфоцитов. Наивные лимфоциты поступают в периферические лимфоидные органы с током крови и возвращаются в циркуляторное русло уже в виде зрелых или эффекторных клеток для последующего распределения по лимфатической системе и селектив-

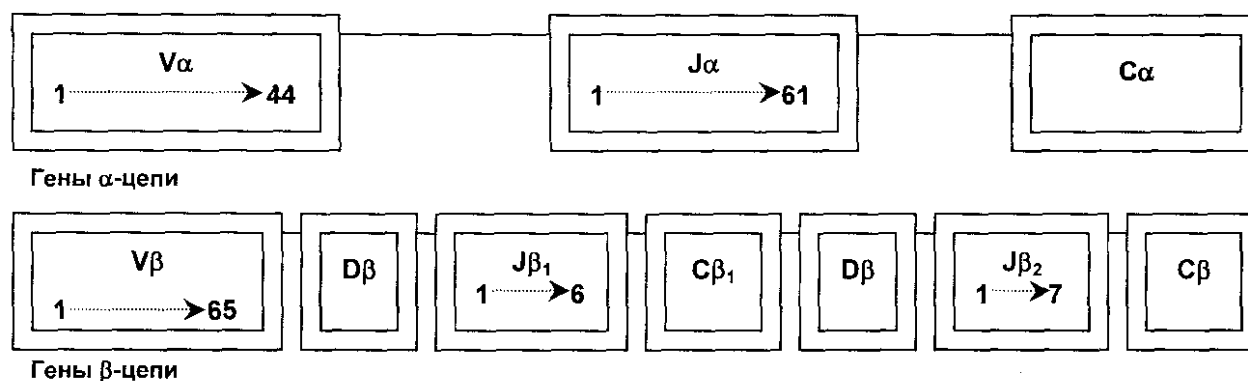


Рис. 44. Гены, кодирующие α - и β - полипептидные цепи Т-клеточного рецептора.

ного возвращения в место первичного контакта с антигеном (homing). Из селезенки лимфоциты возвращаются непосредственно в кровоток, из лимфатических узлов и лимфоидной системы слизистых - опосредованно через эфферентные лимфоидные сосуды и грудной проток. Поступление зрелых лимфоидных клеток в лимфатические узлы осуществляется также через афферентную лимфу от тех областей, которые дренирует данный лимфоузел. Лимфоидная система слизистых не окружена капсулой, и ее клетки могут непосредственно контактировать с антигеном и перемещаться в более компактные лимфоидные образования для генерации иммунного ответа.

Существуют некоторые общие правила миграции зрелых и наивных лимфоцитов в организме, которые зависят от структуры вторичных лимфоидных органов. В большей степени эти правила применимы к Т-клеткам, хотя и для В-лимфоцитов являются вполне справедливыми:

- Наивные клетки мигрируют в лимфатические узлы, в то время как клетки памяти находят свой "дом" предпочтительно в экстранодальных участках.
- Клетки памяти обычно возвращаются в тот участок тела, где они подверглись первичному контакту с антигеном.
- При воспалении поступление лимфоцитов в соответствующие органы и ткани усиливается, но снижается селективность хоминга [49].

Проникновение лимфоцитов в ткань лимфатического узла регулируется взаимодействием с эндотелием ВЭВ. В этих взаимодействиях участвуют селектины, CD44 и интегрины, экспрессированные на лимфоцитах. Селектины (CD62L) связываются с сиалированными углеводами эндотелиоцитов, CD44 - с гиалуронатом, интегрины LFA-1 и VLA-4 - с ICAM-1 и VCAM-1 соответственно. На Т-клетках памяти уровни молекул адгезии повышены в сравнении с наивными Т-клетками.

Лимфатический узел является основным органом, формирующим иммунологический ответ при проникновении чужеродных веществ в организм через кожные и эпителиальные покровы, служит вторичным барьером на пути распространения инфекции после иммунной системы кожи и слизистых оболочек.

Структура лимфатического узла (рис. 45) является типичным примером разобщения Т- и В-клеточных лимфоидных зон. Этот принцип во многом характерен и для селезенки, и лимфоидной системы слизистых.

В-клетки лимфатического узла сгруппированы в компактные шаровидные образования (фолликулы), расположенные, в "покоящемся" лимфа-

тическом узле, в основном, субкапсулярно. Совокупность этих В-клеточных образований расположена в так называемой кортикальной зоне. Т-клеточная (паракортикальная) зона находится под кортикальной зоной, то есть более удалена от капсулы лимфатического узла. Лимфоидная ткань лимфатического узла пронизана системой синусов, в которые лимфоциты прибывают с афферентной лимфой (субкапсулярный синус) и покидают узел (медуллярные синусы), поступая в эфферентные лимфатические сосуды. В лимфатическом узле представлены различные популяции фагоцитирующих (макрофаги, гистиоциты) и нефагоцитирующих (дендритные клетки) антигенпрезентирующих клеток. Они весьма разнообразны и имеют тропность к Т-зонам (интердигитирующие клетки) или фолликулам лимфатического узла (фолликулярные дендритические клетки). При развитии иммунного ответа архитектура лимфатического узла претерпевает существенные изменения.

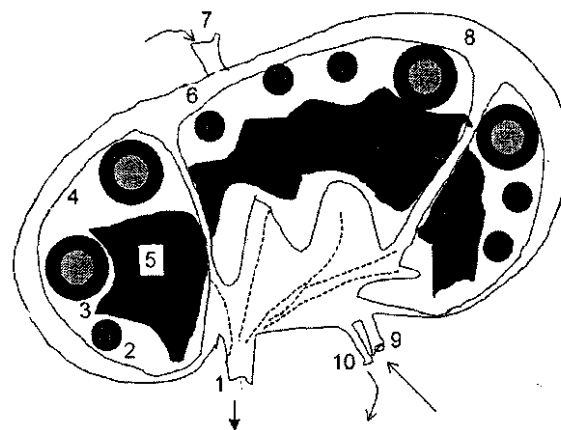


Рис. 45. Схематическое изображение лимфатического узла.

1 - эфферентный лимфатический сосуд; 2 - первичный фолликул; 3 - вторичный фолликул; 4 - корковая зона; 5 - паракортикальная зона; 6 - капсула; 7 - афферентный лимфатический сосуд; 8 - субкапсулярный синус; 9 - артерия; 10 - вена.

Большинство лимфоцитов поступает в лимфатические узлы из крови через специализированный сосудистый эндотелий посткапиллярных венул (ВЭВ). Происходит это, главным образом, на границе кортикальной и паракортикальной областей. Другой путь поступления лимфоцитов в лимфатические узлы - через афферентные лимфатические сосуды.

Т-лимфоциты лимфатических узлов. Наивные, то есть еще не участвовавшие в иммунных ответах, CD4⁺ Т-клетки, поступающие из

тимуса, проникают в лимфатические узлы из крови через ВЭВ. Наивные CD4+ клетки продуцируют IL-2, но практически не продуцируют IL-4 или INF γ при стимуляции, обусловленной связыванием рецептора и костимуляторными сигналами. Они экспрессируют CD45RA и называются предшественниками Т-хелперных клеток (pT_H). В процессе иммунного ответа наивные Т-клетки (хелперные, цитотоксические) дают начало эффекторным клеткам и клеткам памяти.

В сравнении с CD45RA+ наивными Т-клетками, CD45RO+ Т-клетки памяти являются функционально значительно более мощными, активируются значительно более низким содержанием антигена, не требуют костимуляторов (например B7). CD4, CD45 и TCR более близко ассоциированы на Т-клетках памяти, но не на наивных Т-клетках. Подобная связь делает значительно большей эффективность Т-клеточной стимуляции. Т-клетки памяти имеют много сходства с активированными Т-клетками или Т-клеточными клонами: как те, так и другие являются CD45RO+ и экспрессируют повышенные уровни молекул адгезии, молекул HLA-II и рецепторов IL-2. CD45RO+ Т-клетки, по размеру несколько больше CD45RA+ клеток, но мельче активированных Т-клеток.

Активированные хелперные клетки могут дифференцироваться в T_{H1}-клетки, которые секретируют, главным образом, TNF и INF γ , или в T_{H2}-клетки, которые продуцируют, главным образом, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10. T_{H1}-клетки за счет продукции INF γ и TNF β являются хорошими индукторами повышения микробицидной активности макрофагов (повышенный клеточный иммунитет), эти клетки известны как клетки гиперчувствительности замедленного типа. T_{H2}-клоны синтезируют набор цитокинов, необходимый для гуморального иммунного ответа.

T_{H2}-клетки экспрессируют CD40-лиганд (CD40L), то есть структуру, с которой связывается CD40-рецептор, присутствующий на мембране В-лимфоцитов. Связывание CD40L и действие цитокинов, секретируемых T_{H2}-клетками, ведет к В-клеточной пролиферации, переключению классов и развитию В-клеток памяти [34]. Секретция IL-10 и IL-4 T_{H2}-клетками противодействует влиянию INF γ на макрофаги и, возможно, подавляет продукцию INF γ и других цитокинов T_{H1}-клетками. Эти отрицательные регуляторные воздействия могут быть важными в контроле аутологичного повреждения.

CD8+ Т-клетки, так же, как и CD4+ Т-клетки, могут быть подразделены на CD45RA+ и CD45RO+ подклассы. Т-клетки локализуются в паракортикальных областях лимфатических узлов, а, кроме того, обнаруживаются в медуллярной зоне в смеси с В-лимфоцитами и плазматическими клетками.

В этих областях CD4+ Т-клетки преобладают над CD8+ Т-лимфоцитами и располагаются кластерами вокруг интердигтирующих клеток. Отдельные Т-клетки с хелперным фенотипом встречаются также в зародышевых центрах. Все лимфоциты, которые поступили в лимфатический узел из крови или из лимфы, так же, как и клетки, образовавшиеся непосредственно в лимфатическом узле в результате клональной экспансии, покидают узел с эфферентной лимфой через медуллярные синусы. Эфферентные лимфоциты являются ответственными за становление иммунологической памяти и распределение иммунного ответа в другие лимфоидные органы. Т-клетки эфферентной лимфы являются преимущественно CD4+ в сравнении с CD8+, и это предполагает преимущественную рециркуляцию CD4+ клеток в ткань лимфатического узла [40].

Иммунная активация в норме ведет к тому, что Т-клетки покидают состояние G₀, входят в клеточный цикл и дают начало клону дифференцирующихся эффекторных клеток, например Т-клеток, секретирующих цитокины. Это называется клональной селекцией. Устранение аутореактивных Т-лимфоцитов называется клональной делецией. Функциональная инактивация лимфоцитов под действием антигена не обязательно сопровождается гибелью этих лимфоцитов. Состояние неответственности описывает термин клональная анергия. Преактивированные эффекторные Т-клетки подвергаются апоптозу, когда они сталкиваются с аутологичным антигеном, представленным собственными молекулами HLA, но в отсутствие «профессиональных» АПК [36, 55]. Индукция анергии или апоптоз активированных Т-лимфоцитов также имеет место в периферических лимфоидных органах как составная часть событий посттимической негативной селекции.

Т-клетки памяти экспрессируют повышенные уровни молекул адгезии, включая CD2, LFA-1, LFA-3, CD44, ICAM-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6. Они не требуют костимуляторов B7, и потому способны поражать любые непрезентирующие клетки, зараженные вирусом.

Т-лимфоциты функционально гетерогенны. Их активация приводит к Т-клеточно-опосредованным иммунным реакциям. В ходе этих реакций эффекторные Т-лимфоциты вырабатывают цитокины или осуществляют цитотоксическое действие.

Следующие типы иммунологических реакций опосредуются Т-клетками: гиперчувствительность замедленного типа (T_{H1}), отторжение аллотрансплантата (T_K), реакция трансплантат против хозяина (T_K, T_{H1}), убийство инфицированных вирусами клеток-мишеней (T_K), противоопухолевый иммунитет (T_K, T_{H1}).

В большинстве случаев проявления Т-клеточного иммунитета осуществляются экстранодально. Вместе с тем, практически при любом из перечисленных типов реакций в процесс вовлечены Т-клетки регионарных (по отношению к очагу поражения) лимфатических узлов. Так, например, при отторжении трансплантатов, контактной чувствительности (разновидность гиперчувствительности замедленного типа) в паракортикальной зоне регионарных лимфатических узлов наблюдается выраженная пролиферация Т-клеток, в том числе бластных клеток и иммунобластов (выраженная гиперплазия паракортикальной зоны). Бластогенная реакция Т-клеток регионарных лимфатических узлов сопровождается в последующем пролиферативными изменениями и в В-клеточных зонах лимфатических узлов. В случаях ГЗТ, обусловленных микроорганизмами (например, после введения БЦЖ) в лимфатических узлах происходит формирование гранул. В них присутствуют макрофаги, поступившие из первичного очага и содержащие микроорганизмы. В паракортикальной зоне лимфатического узла эти макрофаги приобретают вид эпителиоидных клеток, входящих в состав гранул. В ходе этих и других реакций подкласс Т-хелперных клеток ($TCR\alpha\beta+$, $CD3+$, $CD4+$) регулирует клональную экспансию Т-и/или В-лимфоцитов.

В-лимфоциты лимфатических узлов. Первичные фолликулы и зона мантии вторичных фолликулов состоят из малых лимфоцитов, большинство из которых не имеет признаков активации. Чаще всего эти клетки имеют изотип $IgM+IgD$ или IgM . Антигены $CD23$, $CD5$, $CD10$, $CD38$, как правило, отсутствуют. Лимфоциты экспрессируют на мембране $CD19$, $CD20$, $HLA-DR$, $CD21$, $CD22$, $CD24$, $CD37$ и т.д., то есть их иммунологический фенотип является характерным для периферических В-клеток. У плода и новорожденных фенотип клеток первичных фолликулов лимфатических узлов и селезенки отличается от фенотипа клеток первичных фолликулов тех же органов взрослых тем, что большинство лимфоцитов имеют на мембране маркер $CD5$ [12]. Содержание $CD5+$ клеток в лимфатических узлах у взрослых невелико и составляет 2-3% в пределах В-лимфоцитов [13].

Первичная активация В-клеток происходит в Т-клеточных областях периферических лимфоидных органов: паракортикальной зоне лимфатических узлов и лимфоидной ткани слизистых, периартериоллярных лимфоидных муфтах селезенки [40, 48]. Последствия связывания иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов с антигеном во многом зависят от свойств самого антигена.

Некоторые антигены (так называемые тимуснезависимые) способны вызывать пролиферацию и дифференцировку В-клеток без помощи Т-лимфоцитов. Тимуснезависимые антигены первого типа являются поликлональными активаторами, а тимуснезависимые антигены второго типа - это, как правило, полисахариды с множеством регулярно повторяющихся одинаковых антигенных детерминант, способных перекрестно связывать мембранные IgM В-клеток и вызывать их активацию.

Активация В-клеток под действием тимусзависимых антигенов (чаще это белки, нуждающиеся в переработке-процессинге и комплексировании с молекулами HLA для эффективного распознавания Т-лимфоцитами) происходит при участии Т-хелперных клеток и дендритических клеток в паракортикальной зоне. В-лимфоциты взаимодействуют с $CD4+$ Т-хелперными клетками, активированными антигенными производными, представленными в комплексе с молекулами $HLA-II$ на интердигитирующих клетках. В срезах лимфатических узлов интердигитирующие клетки легко визуализируются по экспрессии $CD1a$. При активации хелперных клеток молекула $CD28$ на $CD4+$ лимфоцитах связывается с ее лигандом $CD80$ на интердигитирующих клетках. Взаимодействие Т- и В-лимфоцитов осуществляется двумя способами - контактным (клетка-клетка) и с помощью цитокинов. В контактных взаимодействиях принимают участие со стороны В-клеток молекулы $CD40$, $LFA-1$, $LFA-3$ и комплементарные им структуры Т-лимфоцитов - лиганд $CD40$ (появляется на активированных Т-клетках), $ICAM-1$ и $CD2$. Основными цитокинами, синтезируемыми Т-хелперными лимфоцитами и поддерживающими активацию и пролиферацию антигенспецифических В-клеток, являются $IL-4$, а также $IL-5$ и $INF\gamma$.

Отражением процесса активации является появление на мембране В-лимфоцита молекулы $CD23$, повышенная экспрессия молекул $HLA-II$, а затем - утрата мембранного IgD . Особая группа антигенов, включающая, главным образом, аутологичные антигены и немногочисленные (преимущественно тимуснезависимые) экзогенные антигены, взаимодействуя с В-лимфоцитами, ведет к появлению экспрессии $CD5$ в процессе активации. В-лимфоциты $CD5$ -линии используют ограниченный репертуар V_H -генов.

В ходе иммунного ответа на тимусзависимые и независимые антигены активированные В-лимфоциты могут далее дифференцироваться в плазматические клетки, синтезирующие антитела IgM -класса, или дать начало реакциям зародышевых центров.

Здесь следует обратить внимание на особенности терминологии. Понятие первичный им-

иммунный ответ применимо обычно к ответу Т- или В-лимфоцитов на первый контакт с антигеном, то есть наблюдается в неиммунном к данному антигену организме. Термин "первичный иммунный ответ" как бы противопоставляется "вторичному иммунному ответу", то есть более быстрому ответу В-клеток памяти на повторный контакт с антигеном. Вторичный иммунный ответ бывает, как правило, IgG-класса (или IgA и IgE) в отличие от первичного преимущественно IgM-ответа. Вместе с тем, следует помнить, что в ходе первичного иммунного ответа на сложные антигены (например, эритроциты барана) существует ряд фаз:

1. Активация и деление лимфоцитов через 1-2 дня после иммунизации. Частота Т-клеточных митозов становится максимальной примерно на 3-й день, а В-клеточных - на один день позже.
2. Антителообразующие клетки, преимущественно IgM-класса, появляются на 3-4-й день и вскоре становятся основным компонентом мягкотных тяжей.
3. На 4-5-й день, т.е. уже после появления сывороточных антител, обнаруживаются зародышевые центры. Они не принимают участия в первичном (IgM) ответе [6].
4. 5-7-й день - нарастание сывороточных титров IgG.
5. 9-15-й - день нарастание титров IgA [5], то есть формирование зародышевых центров с переключением классов Ig и образованием клеток памяти - это вторая фаза (первая - это продукция IgM без формирования зародышевых центров) в ходе реализации иммунного ответа на первичный контакт с антигеном.

Внутрифолликулярная дифференцировка В-клеток. Активированные в паракортикальной зоне CD5-CD23+ В-клетки утрачивают IgD и поступают в фолликул, структура которого из-за их быстрой пролиферации видоизменяется. В центре мономорфной шарообразной структуры из малых лимфоцитов появляется более светлая (при световой микроскопии) область. Она окружена мантийной зоной из малых лимфоцитов, которая имеет неравномерную толщину (истончена у одного из полюсов). Мантия окружает внутреннее содержимое вторичного фолликула - зародышевый или светлый центр.

В условиях микроокружения зародышевого центра происходит многоступенчатый процесс антигензависимого созревания и дифференцировки В-клеток, который ведет к созданию плазматических клеток и В-клеток памяти. Многогранны взаимодействия между В-клетками, антигеном, Т-клетками, макрофагами и фолликулярными дендритическими клетками (ФДК) в пределах светлого центра фолликула.

В базальной (она иначе называется темной) зоне зародышевого центра активированные В-лимфоциты утрачивают CD23 и превращаются в крупные бластные формы (центробласты), которые активно пролиферируют. Для центробластов характерна экспрессия CD77, CD38, отсутствие IgD, практически полное отсутствие IgM, сниженные уровни CD44 и L-селектинов. Большинство этих клеток гибнет апоптозом, поскольку ген анти-апоптоза bcl-2 в центробластах не функционирует.

Разрушенные погибшие клетки поглощаются макрофагами зародышевых центров, носящими название макрофагов инородных тел (tingible-body macrophages). Выжившие клетки уменьшаются в размере, их ядро сморщивается, становится как бы расщепленным (центроциты). На центроцитах вновь появляются мембранные Ig. Эти лимфоидные элементы уже прошли этап изотипического переключения и экспрессируют IgG, IgA или IgE. В результате соматических гипермутаций центроциты приобретают высокий аффинитет к антигену. Они не экспрессируют CD23. На части клеток зародышевых центров присутствуют антигены CD10, а также активационные антигены CD25, CD71 и т.д.

Одна из точек зрения состоит в том, что при продолжающейся антигенной стимуляции центроциты способны трансформироваться во вторичные В-бласты, экспрессирующие молекулу CD30 [11]. Из центроцитов формируются В-клетки памяти и плазматические клетки. Это происходит в апикальной светлой зоне зародышевого центра фолликула, густо населенной CD23+ фолликулярными дендритическими клетками. ФДК обсыпаны огромным количеством антигена, к которому формируется ответ в данном зародышевом центре. Антиген на поверхности ФДК удерживается в виде иммунных комплексов с антителами и комплементом. Это происходит благодаря тому, что ФДК экспрессируют широкий набор Fc-рецепторов (CD23, CD16, CD32) и рецепторов комплемента (CD35, CD21, CD11b). Антиген, присутствующий на ФДК, преподносится В-клеткам в свободном виде или в виде маленьких мембранных телец, нагруженных антигеном, которые называются "икосомы". Важную роль играет субпопуляция интрафолликулярных Т-хелперов с фенотипом CD4+ CD45RO+ CD57+: при отсутствии этих клеток не происходит формирования зародышевых центров, изотипического переключения и формирования В-лимфоцитов памяти. Наружная зона фолликула содержит CD75+ клетки, способные к перемещению между различными отделами фолликула.

Направленность дифференцировки В-лимфоцитов - в клетки памяти или в плазмоциты - регулируется в апикальной светлой зоне зародышевых центров. Связывание молекулы В-

лимфоцитов CD40 с соответствующим лигандом, присутствующим на активированных Т-клетках, ведет к формированию В-клеток памяти. Ранее считалось, что эти клетки, прошедшие через зародышевый центр и изотипическое переключение (для изотипического переключения также абсолютно необходим CD40L), не несут мембранных IgM (чаще это IgG, IgA клетки). В последнее время описано существование IgM+ В-клеток памяти. Плазмочитарная дифференцировка В-лимфоцитов происходит после их взаимодействия с растворимым фрагментом CD23 или с антигеном CD23, присутствующим на ФДК. В этих взаимодействиях участвует рецептор CD21 и IL-1.

Судьба CD5+ В-клеток изучена менее подробно. По-видимому, как и CD5- активированные В-лимфоциты, они первоначально утрачивают IgD и CD23. Субпопуляция таких клеток присутствует на границе зародышевого центра и внутреннего слоя мантии. Однако не известно, подвержены ли CD5+ лимфоциты типичным превращениям в фолликулярных центрах, так как механизм соматических гипермутаций в них неэффективен, и при активации сигнал к апоптозу преобладает над стимуляторным сигналом. Вместе с тем, эти клетки способны к дифференцировке в зрелые плазмциты и к переключению классов иммуноглобулинов с IgM на IgG и IgA.

Интересно отметить, что в детском возрасте лимфомы и лейкозы из CD5+ лимфоцитов практически не встречаются, в то время как у взрослых они составляют более половины всех зрело-В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний: В-ХЛЛ (IgM+ IgD+ CD5+ CD23+), лимфомы из клеток мантии (IgM+ CD5+ CD23-), часть крупноклеточных В-лимфом.

Один из весьма распространенных типов периферических В-клеток - клетки маргинальной зоны - представлен в лимфатических узлах в незначительном количестве в сравнении с селезенкой и лимфоидной тканью слизистых. Аналогом этих клеток в лимфатическом узле считаются так называемые "незрелые синусные гистиоциты" или "моноцитоподобные В-клетки". Термины отражают их расположение в субкапсулярных и промежуточных синусах, а также их внешнее сходство с моноцитоподобными элементами (неправильная форма ядра, широкая светлая цитоплазма). Иммунологически установлено, что эти клетки являются зрелыми (антигензависимыми) элементами В-лимфоцитарной линии. Выраженная пролиферация этих клеток в лимфатическом узле наблюдается при ряде инфекционных процессов (токсоплазмоз, инфекционный мононуклеоз, краснуха, ВИЧ-инфекция) и некоторых лимфатических опухолях. По иммунофенотипу клетки более соответствуют активированным В-лимфоцитам, близким к терминальным стадиям

дифференцировки [44]. Наряду с обще В-клеточными антигенами CD19, CD20, CD22, моноцитоподобные В-клетки имеют мембранные CD37, CD40, IgM. Экспрессия CD21, CD23 и CD24 обычно отсутствует, что отличает их от лимфоидных элементов светлых центров и зоны мантии фолликулов. Наибольшее сходство этот тип клеток имеет с лимфоцитами маргинальной зоны селезенки, но отличается от них большим постоянством экспрессии CD20, CD39, CD75 [54], а также CD38 [44].

Лимфоциты и селезенка

Селезенка является одним из важнейших органов иммунной системы. В ней происходят разрушение и утилизация погибающих или поврежденных форменных элементов крови, а также циркулирующих микроорганизмов; формирование иммунного ответа на растворимые антигены, циркулирующие в крови; селекция, активация и развитие толерантности В-лимфоцитов. Селезенка является мощным фильтром крови и барьером для чужеродных веществ на пути из магистрального сосуда (аорты) в систему воротной вены.

Структура селезенки представлена на рис. 46. Лимфатическая ткань селезенки имеет дос-

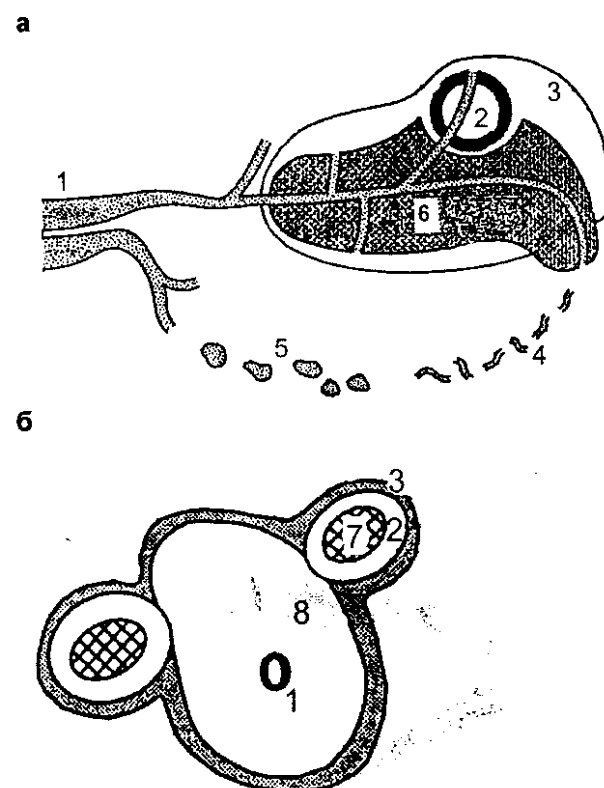


Рис. 46. Схематическое изображение селезенки. а - срез вдоль артериолы; б - срез поперечно артериоле; 1 - центральная артериола; 2 - фолликул; 3 - маргинальная зона; 4 - хорды; 5 - синусоиды; 6 - Т-зона; 7 - зародышевый центр; 8 - лимфоидная муфта.

таточно сложное анатомическое строение. Она представлена белой пульпой и лимфоидными элементами красной пульпы. Белая пульпа сосредоточена вдоль артериол селезенки и состоит из периартериоллярных лимфоидных муфт, ассоциированных с ними лимфоидных фолликулов, эллипсоидных макрофагально-лимфоидных муфт, располагающихся на концах ветвления артериальных сосудов, и венозных синусов, в которые впадают артериолы и истинные капилляры селезенки [8].

Схематично строение белой пульпы селезенки представлено на рис. 46 а, б. В пределах ПЛМ выделяют наружную и внутреннюю часть. ПЛМ можно считать аналогом паракортикальной (тимусзависимой) зоны лимфатических узлов. Фолликулы представляют собой В-клеточные образования. Кроме того, в селезенке имеется особая популяция В-клеток, которые отграничивают белую пульпу (периартериоллярные муфты и фолликулы) от красной пульпы. Эта область получила название краевой или маргинальной зоны.

Т-клетки и селезенка. В селезенке присутствуют только периферические (наивные и зрелые) Т-лимфоциты, прошедшие селекцию в тимусе. Под влиянием антигенного стимула эти клетки активируются, подобно тому, как это происходит в лимфатических узлах.

В белой пульпе селезенки (периартериоллярных лимфоидных муфтах) CD4 Т-клетки преобладают над CD8 Т-клетками, а в красной пульпе наблюдается обратное соотношение между этими популяциями.

TCR $\gamma\delta$ Т-клетки предпочтительно оседают в синусоидах селезенки, в то время как лимфоциты, несущие TCR $\alpha\beta$, главным образом, заселяют ПЛМ.

В-клетки и селезенка. В селезенке происходят процессы активации В-клеток в ходе первичных и вторичных иммунных ответов. В-клетки, специфичные в отношении аутологических антигенов, не поступают в фолликулы, они задерживаются в наружной зоне ПЛМ и гибнут [20].

Движение всех В-клеток в наружной зоне ПЛМ приостанавливается. Это универсальное явление происходит после связывания иммуноглобулинового рецептора во время иммунного ответа на различные антигены. Биологический смысл процесса состоит в том, что накопление активированных, пролиферирующих В-клеток в наружной зоне ПЛМ в течение первых нескольких дней иммунного ответа необходимо для встречи этих клеток с редкими типами антиген-специфичных Т-лимфоцитов. При отсутствии Т-клеточной помощи, которая необходима для реализации иммунологических ответов на тимусзависимые антигены, активированные В-

клетки погибают. При наличии Т-клеточной помощи наивные В-клетки поступают преимущественно в фолликулы, где подвергаются дифференцировке в зародышевых центрах в ходе первичных иммунных ответов. При вторичных иммунных ответах В-клеток памяти на тимусзависимые антигены наблюдается выраженная В-клеточная пролиферация и дифференцировка в плазматические клетки в пределах наружной зоны ПЛМ, фолликулярная В-клеточная пролиферация является несколько более слабой, чем при первичных ответах.

Антиген-специфические Т-клетки уничтожают в наружных зонах ПЛМ определенную часть В-лимфоцитов. Лиганд Fas-антигена, экспрессированный на этих Т-хелперах, включает программу гибели (апоптоз) в В-клетках с несвязанными антигенными рецепторами, а также в В-клетках, не имеющих нормального пути внутриклеточного проведения антигенного сигнала.

В тимуснезависимых иммунных ответах В-клетки способны дифференцироваться в плазматические без Т-клеточной помощи. При ответе на TI-1 антигены (ЛПС) происходит выраженная антигенспецифическая В-клеточная пролиферация и плазматическая дифференцировка в наружной зоне ПЛМ и в красной пульпе; фолликулярная В-клеточная пролиферация умеренная. Считается, что именно поликлональные активаторы типа TI-1, а также аутологичные антигены ведут к индукции CD5 на В-лимфоцитах. CD5+ В-клетки обычно не проходят через светлый центр и не подвергаются изотипическому переключению. Интересно существование некоторого сходства CD5-лимфоцитов с толерантными аутореактивными В-клетками, которые подвергаются в наружных зонах ПЛМ abortивной активации, препятствующей их дальнейшей миграции в фолликул [39].

В TI-2 ответах (фиколл) большинство пролиферирующих В-клеток в наружной зоне ПЛМ дифференцируется в плазматические клетки. В селезенке существует особая область, окружающая периартериоллярные лимфоидные муфты, так называемая маргинальная зона. Клетки этой области являются нормальным эквивалентом клеток, из которых возникают лимфомы маргинальной зоны или лимфоцитомы селезенки [А.И. Воробьев и др., 1995]. В маргинальной зоне селезенки реализуются В-клеточные иммунные ответы на тимуснезависимые антигены, циркулирующие в периферической крови. В-клетки маргинальной зоны имеют специфические морфологические и иммунологические черты. На мембране В-лимфоцитов маргинальной зоны селезенки экспрессированы IgM, но отсутствуют IgD. Эти клетки не являются рециркулирующими, специализированы к иммунному ответу на тимуснезависимые углеводные антигены [28].

Вместе с тем, эти лимфоциты происходят из пула рециркулирующих В-клеток, возвратившихся в маргинальную зону селезенки (хоминг). Клетки маргинальной зоны расположены в сети первичных кровяных синусоидов селезенки, что позволяет им взаимодействовать с антигенами, переносимыми кровью. Популяция клеток маргинальной зоны не столь гомогенна, как принято считать. Сюда входят В-клетки памяти, генерированные как в ходе Т-зависимых, так и Т-независимых антительных ответов первого типа, а также девственные В-клетки, которые еще не подверглись пролиферации, зависящей от присутствия антигена. Клетки маргинальной зоны способны *in vivo* отвечать на все типы антигенов: Т-зависимые, Т-независимые I и II типов. Характеристики этих клеток указывают на то, что они покоятся в фазе G₁, а не G₀. Ответ *in vivo* на TI-II антигены (но не на TI-1 антигены) сильно повреждается при спленэктомии [10], что подтверждает отсутствие способности к рециркуляции клеток маргинальной зоны селезенки. Их иммунофенотип сходен с иммунофенотипом большинства рециркулирующих В-клеток, но есть и некоторые отличия. Обобщенно иммунофенотипические черты В-клеток маргинальной зоны селезенки можно представить следующим образом: sIgM+ sIgD- CD21- CD35+ CD23- CD76+/- CD75-/+ CD78- 2C9-/+ CD22+ CD37+ CD24- CD19+/- CD20+/- CD44+/- CD10-.

В последние годы получены новые данные относительно роли селезенки в формировании репертуара длительно живущих наивных В-лимфоцитов. Из числа ежедневно продуцируемых костным мозгом $\sim 10^{10}$ девственных В-лимфоцитов лишь примерно 10% переходят в длительно живущий пул. Девственные В-лимфоциты IgM+ IgD+ CD23- CD5- поступают первоначально в селезенку. Через концевые ветви центральных артериол и синусы маргинальной зоны они попадают в наружную зону ПЛМ. Далее небольшая часть В-клеток поступает в фолликулы. Именно эти клетки переходят в долгоживущий рециркулирующий пул. Положительная селекция В-лимфоцитов осуществляется на основании экспрессии IgV_H-генов в ответ на низкие дозы экзогенных антигенов или на элементы идиотипической сети (например, сывороточные иммуноглобулины). В процессе перехода девственных клеток в наивные длительно живущие рециркулирующие лимфоциты не происходит соматических гипермутаций и переключения классов иммуноглобулинов [18, 26, 30]. На сегодняшний день не совсем понятно, в чем состоят иммунофенотипические различия между девственными и наивными В-лимфоцитами.

Девственные В-клетки, не подвергнувшиеся положительной селекции и не поступившие в фолликулы, погибают в наружной зоне ПЛМ [38, 41]. Таким образом, селезенка в В-клеточной дифференцировке играет роль, отчасти схожую с таковой, которую играет тимус в дифференцировке Т-лимфоцитов: в обоих органах формируется пул наивных лимфоцитов (Т- в тимусе, В- в селезенке).

Костный мозг как периферический лимфоидный орган

Костный мозг сочетает в себе черты центрального и периферического лимфоидного органа. Здесь происходит продукция протимоцитов и девственных В-лимфоцитов, с одной стороны, и реализация определенных звеньев гуморального и клеточного иммунитета, - с другой. Популяция лимфоидных клеток костного мозга весьма гетерогенна и включает незрелые лимфоидные предшественники, также зрелые антителопродуценты и периферические Т-клетки.

Самые зрелые этапы В-клеточной дифференцировки представлены в костном мозге плазмочитами (около 1%), которые синтезируют большую часть сывороточных IgG. Выработка антител костномозговыми плазмочитами начинается не столь быстро, как в лимфатических узлах. Однако именно для костного мозга характерна длительно продолжающаяся массивная продукция антител на антигены, которые повторно поступают в организм. Следовательно, как антителопродуцент костный мозг может рассматриваться, отчасти, в качестве периферического лимфоидного органа.

В популяции лимфоцитов костного мозга присутствуют зрелые Т-клетки: CD3 - 19,8 +/- 4,4% [31]. Отмечается селективный хоуминг зрелых CD8+ лимфоцитов в костный мозг (CD4/CD8 < 1,0) [19]. Популяция CD8 клеток костного мозга отличается по иммунофенотипу от CD8 лимфоцитов крови. Наибольшие различия касаются маркеров CD11b, которые отсутствуют на CD8 клетках костного мозга и обнаруживаются на 18% CD8+ лимфоцитов крови. Молекула HLA-DR, напротив, почти не экспрессирована на CD8 клетках крови (4%), однако более выражена на данной популяции лимфоцитов костного мозга (15,4%). Практически на всех CD8 лимфоцитах (80-90%) крови и костного мозга присутствуют CD2 и CD3. Фенотип CD4 лимфоцитов крови и костного мозга не различается [18]. Зрелые Т-лимфоциты костного мозга осуществляют контроль над процессами пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток и клеток костной ткани как путем контактных взаимодействий, так и опосредованно через продукцию цитокинов.

Лимфоидная ткань слизистых (MALT) и кожи

Т- и В-клеточные зоны легко идентифицируются в пейеровых бляшках тонкого кишечника, причем Т-клеточная зона расположена непосредственно под эпителием. ВЭВ, через которые лимфоциты с током крови проникают в MALT, расположены в Т-клеточной зоне (так же, как и в лимфатических узлах). На эндотелиальных клетках присутствует молекула адгезии MadCAM-1 (адрессин), которая способствует селективному взаимодействию с лимфоцитами пейеровых бляшек, экспрессирующими LPAМ-1. Практически все Т-клетки в тканях (кожа, собственный слой слизистой желудочно-кишечного тракта, на бронхиальных поверхностях) имеют иммунофенотип Т-клеток памяти ($CD45RO^{high}$). Основная популяция интраэпителиальных Т-клеток кишечника имеет маркеры CD8, CD3, $TCR\alpha\beta+$ и не экспрессирует CD45RO. Интраэпителиальные лимфоциты экспрессируют специфический антиген HML-1 (CD103), который может быть использован для диагностики лимфом, возникающих из этих клеток.

В-клеточные лимфоидные образования кишечника представлены, в основном, разрозненными солитарными фолликулами и пейеровыми бляшками. Эти структуры напоминают фолликулы лимфатических узлов. Отличием является значительно более выраженная маргинальная зона, аналогичная таковой в селезенке. Иммунологический фенотип клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани кишечника сходен с иммунофенотипом клеток маргинальной зоны селезенки. Особая популяция клеток маргинальной зоны, способная пролиферировать под влиянием антигенов, проникающих из кишечника, привлекает в последние годы достаточно пристальное внимание. Именно эти клетки наиболее часто подвергаются опухолевой трансформации при развитии так называемых "мальтом", то есть лимфом (главным образом, лимфом желудка) из клеток маргинальной зоны. (Некоторые авторы используют термин "мальтомы" для обозначения любых лимфом, происходящих из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми).

У человека $TCR\gamma\delta$ -клетки составляют примерно 5% от CD3+ клеток в лимфоидных органах и в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником и кожей [29]. Лимфоциты человека, экспрессирующие $TCR\gamma\delta$, представляют малую субпопуляцию CD3+ Т-клеток желудочно-кишечного тракта и равномерно распределены в эпителии и собственном слое слизистой [39]. Имеет место несколько более предпочтительный хоминг $\gamma\delta$ Т-клеток в эпидермис, и содержа-

ние $\gamma\delta$ Т-клеток в эпидермисе выше, чем в сосочковом слое дермы.

Т-лимфоциты кожи экспрессируют углевод CLA (кожный лимфоцитарно-ассоциированный антиген), который способен связываться с Е-селектином. Гиперчувствительность замедленного типа и хронические воспалительные процессы в коже ведут к появлению селектинов на эндотелиальных клетках дермы. Взаимодействие между селектинами и CLA может играть роль в дермотропизме субпопуляций Т-клеток.

В слизистых и главным образом в коже наиболее часто происходит контакт сенсibilизированных Т-лимфоцитов (хелперные Т-лимфоциты памяти) с чужеродными веществами (презентируются АПК). Одним из проявлений иммунологической реактивности является ГЗТ, известная каждому по реакции Манту. ГЗТ может быть вызвана бактериями, вирусами, грибами или изолированными из этих патогенов антигенными препаратами, а также простыми химическими веществами (контактная чувствительность). Эта местная реакция развивается в сенсibilизированном организме и достигает максимума через 24-48 ч после контакта с антигеном. Морфологически представляет собой лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат. В механизме развития реакции главную роль играют Т-хелперные клетки памяти. С точки зрения многокомпонентности процесса, ГЗТ является одной из наиболее сложных иммунологических реакций. На ее начальных этапах Т-хелперные клетки распознают антиген в комплексе с собственными молекулами HLA-II на антиген-презентирующих клетках. Активированные Т-хелперные (CD4) клетки продуцируют серию цитокинов и других растворимых факторов (в частности, $INF\gamma$ и фактор ингибции миграции), которые способствуют накоплению в ткани макрофагов и их активации, а также стимулируют дифференцировку предшественников Т-цитотоксических клеток в Т-киллеры. Для элиминации инфицированных вирусами клеток необходимо распознавание цитотоксическими лимфоцитами (CD8) антигенных детерминант в комплексе с собственными молекулами HLA-I. Длительное высвобождение цитокинов CD4-лимфоцитами в случаях персистенции антигена ведет к формированию гранулем с накоплением большого количества макрофагов, которые приобретают вид эпителиоидных клеток или сливаются в гигантские и многоядерные клетки.

Учитывая селективный хоминг $\gamma\delta$ Т-клеток в эпидермис и эпителий слизистых, можно предполагать важную роль этой субпопуляции в развитии Т-клеточных ответов в этих органах. Практически все $\gamma\delta$ Т-клетки не экспрессируют CD4 и большинство не имеет CD8 или экспрессирует

этот маркер на относительно слабом уровне. В противоположность $\alpha\beta$ Т-клеткам для $\gamma\delta$ Т-клеток не известно рестрикционных механизмов, таких, как HLA. TCR $\gamma\delta$ потенциально может взаимодействовать с молекулами HLA, но это скорее исключение, нежели правило. Для активации $\gamma\delta$ Т-клеток не требуется участия молекул главного комплекса гистосовместимости I или II класса. Эти Т-лимфоциты могут быть более подвижными, чем $\alpha\beta$ Т-клетки в своих иммунных ответах, так как они могут распознавать антигены непосредственно, без участия антигенпрезентирующих клеток. Вероятными кандидатами на антигенпрезентирующие молекулы для $\gamma\delta$ Т-клеток являются продукты так называемых неклассических генов HLA-I. У человека наиболее охарактеризованы молекулы CD1. Гены для CD1 молекул имеют доменную организацию, сходную с таковой у генов HLA-I. Другое заметное сходство между CD1 и молекулами HLA-I заключается в ассоциации тяжелых цепей с β_2 -микроглобулином. При стимуляции $\gamma\delta$ Т-клетки секретируют лимфокины, вызывающие макрофагальную адгезию, агрегацию и пролиферацию. Сравнение профилей секреции цитокинов для серии $\gamma\delta$ Т-клеточных клонов с таковыми от $\alpha\beta$ Т-клеточных клонов выявило количественные различия: многие $\gamma\delta$ Т-клеточные клоны секретируют низкие или необнаруживаемые количества IL-2 и IL-4.

CD4-CD8- $\alpha\beta$ Т-клетки составляют примерно 0,5% от периферических Т-клеток и могут использовать антигенпрезентирующие клетки, рестрикционные молекулы и пути селекции, отличные от таковых, используемых антигенспецифичными CD4+ Т-клетками. Они могут распознавать бактериальные антигены, часто являются олигоклональными, а клоны из этих клеток, подвергнутые экспансии, могут персистировать в течение нескольких лет [21].

Лимфоциты и иммунный ответ

Этапы развития иммунологии. Наши современные научные представления об иммунной системе человека базируются на ряде ключевых открытий, практически все авторы которых были удостоены Нобелевской премии. Приятно отметить, что список нобелевских лауреатов в области иммунологии открывает русский ученый И.И. Мечников, подаривший миру описание явления и теорию фагоцитоза (в тот период времени это отождествлялось с клеточной иммунологией), а также открывший возможность реакции организма на аутологичные антигены. Открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым датируется 1884 г., а Нобелевская премия за работы по иммунитету - 1908 г.

Ключевыми моментами в формировании иммунологии как науки можно считать следующие:

- Клеточная и гуморальная реакции на патогены. Формирование этого понятия не отделено от инфекционной патологии и связано с работами Л. Пастера и его учеников. Основу иммунологии заложили работы 80-90-х годов XIX века по микробиологии и вакцинации ослабленными штаммами бактерий. Это работы Луи Пастера, Роберта Коха, Пауля Эрлиха (удостоен Нобелевской премии одновременно с И.И. Мечниковым, горячо и талантливо в споре с И.И. Мечниковым отстаивал главенствующую роль гуморального иммунитета), Эмиля Ру, Александра Йерсена и других. Именно тогда появились термины антитоксины, антитела, антиген.
- Специфичность иммунологических реакций (конец XIX в). Подтверждена в опытах с вакцинами и антитоксинами, а позднее - и с веществами неинфекционной природы (различные типы клеток, белков, синтетических веществ). Открытие методов количественной и качественной оценки специфического гуморального иммунитета (агглютинация бактерий и эритроцитов, реакция преципитации между антигеном и антителом, реакция связывания комплемента).
- Теоретическое осмысление иммунологических реакций. На заре иммунологии весь спектр иммунологических реакций сводился к немногочисленным антитоксинам и антителам к бактериальным антигенам. Согласно теории П. Эрлиха, антитела - это естественный компонент (рецептор) мембраны клеток. При связывании с антигеном они отрываются от мембраны и в результате компенсаторного синтеза накапливаются в крови. Первоначально было очень трудно представить, что организм способен синтезировать специфические антитела на неисчислимое множество антигенов. Появились инструктивные теории: антиген служит шаблоном для формирования специфической третичной конфигурации молекулы антител [Гауровитц, Полинг]. Селекционная [Ерне Н., 1955] и через 3 года клонально-селекционная теория [Бернет М., Толмедж Д., Ледерберг Д.] образования антител во многом объяснили возрастание иммунореактивности при вторичной иммунизации (клетки пролиферируют под действием антигена с образованием эффекторных клеток и клеток памяти), а также феномен иммунологической толерантности (элиминация клонов, в частности, аутореактивных). Лишь спустя примерно 2 десятилетия, стало понятно, что практически весь набор антительных специфичностей наследуется организмом (сборка

активного центра Ig в онтогенезе В-клеток), а роль соматических мутаций сводится, в основном, к возрастанию аффинитета специфических рецепторов В-лимфоцитов (иммуноглобулинов) в ходе первичного иммунологического ответа.

- Неинфекционная (клеточная) иммунология. Связана с открытиями в области трансплантационного иммунитета (Нобелевская премия П. Медавара, 1960 г.) и "генетически детерминированным структурам", определяющим его выраженность (Нобелевская премия Б. Бенацерафу, Ж. Доссе, Д. Снеллу, 1980 г.). Т- и В-лимфоциты. Т-лимфоцит - центральная фигура клеточного иммунитета.
- Иммунологическое распознавание Т-лимфоцитами. Т-клеточный рецептор. Межклеточные взаимодействия в ходе иммунного ответа. Молекулярно-генетические исследования генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов. Моноклональные антитела в исследовании лимфоцитов.

Иммунный ответ. Неотъемлемым компонентом иммунной системы являются аксессуарные клетки: макрофаги и дендритные клетки. Они участвуют в обезвреживании патогенов либо путем их непосредственного поглощения и уничтожения фагоцитозом, либо путем их превращения в удобоваримую для Т- и В-лимфоцитов форму (этот процесс носит название презентации или представления антигена). Лимфоидные и аксессуарные клетки имеют сложную организацию в органах иммунитета. Кооперативные процессы между этими клетками, носящие название адаптивного иммунитета, играют определяющую роль в распознавании чужеродных антигенов и в обеспечении специфичности иммунной реакции в целом.

Естественный иммунитет состоит из «неспецифического» внутриклеточного и внеклеточного обезвреживания инфекционных агентов. Внутриклеточное обезвреживание микробов осуществляется профессиональными фагоцитами, к числу которых относятся макрофаги и полиморфноядерные нейтрофилы (микрофаги). Нейтрофилы осуществляют основную защиту против пиогенных бактерий, а макрофаги, говоря обобщенно, наиболее эффективны в отношении бактерий, вирусов и простейших, способных жить в клетках организма-хозяина. В процессе фагоцитоза микроб прикрепляется к поверхности макрофага или нейтрофила, окружается цитоплазматической мембраной и попадает в цитоплазму внутри фагосомы. В течение одной минуты цитоплазматические гранулы нейтрофила или макрофага сливаются с фагосомой и высвобождают свое содержимое (миелопероксидаза, лизоцим, кислые гидролазы) вокруг микроорганиз-

ма, разрушая его. Важную роль в обеспечении антимикробного действия фагоцитов играют "кислородный взрыв" (образование супероксидного аниона, активированного кислорода т.п.) и снижение pH в клетке. Убитые микробы перевариваются протеолитическими ферментами, а продукты распада высвобождаются клеткой в окружающую среду. Опсонизация бактерий антителами или C3b-компонентом комплемента способствует их более эффективному связыванию фагоцитами посредством рецепторов для C3b и Fc-фрагмента Ig.

Внеклеточное разрушение микробов (неспецифическое) осуществляется, главным образом, NK-клетками и эозинофилами. NK-клетки являются большими гранулярными лимфоцитами. Они имеют два типа рецепторов: лектиноподобные рецепторы, распознающие углеводные структуры и активирующие литический потенциал NK-клетки, и рецепторы, ингибирующие киллинг. Последний тип рецепторов блокирует литическое действие NK-клеток в том случае, если оно направлено против клеток, имеющих нормальную структуру молекул HLA-I. Повреждение или делеция молекул HLA-I на клетках-мишенях, распознаваемые рецепторами NK-клеток, способствуют реализации литического действия последних. NK-клетки тесно сближаются с клеткой-мишенью и высвобождают содержимое гранул (гранзимы), что запускает процессы апоптоза в клетках-мишенях. Определенную роль играет также выделяемый перфорин, который делает отверстия (поры) в мембране клетки-мишени, что ведет к ее гибели.

Крупные паразиты, такие, как гельминты, не могут быть фагоцитированы. Они убиваются эозинофилами. В гранулах эозинофилов присутствует главный основной белок, эозинофильный катионный белок, пероксидаза, а также арилсульфатаза В, фосфолипаза D и гистаминаза. На эозинофилах присутствуют рецепторы для C3b. Активация эозинофилов ведет к мощному респираторному взрыву с образованием активных метаболитов кислорода. Вдобавок один из белков гранул эозинофилов может, так же, как перфорин NK-клеток и C9, разрушать мембрану клетки-мишени. Большинство гельминтов могут альтернативно активировать комплемент, но резистентны к действию C9. Связывание гельминтов с C3b ведет к последующему прикреплению к ним эозинофилов посредством C3b-рецепторов. В ходе этой активации эозинофилы запускают механизмы внеклеточной атаки, которые включают высвобождение главного основного белка и особенно катионного белка, повреждающих мембрану паразита.

Реакция отторжения трансплантата опосредована Т-клетками. Основную эффекторную роль играют CD8⁺ цитотоксические клетки. Вме-

сте с тем, установлено, что отторжение кожных трансплантатов опосредуется CD4 клетками, а сам феномен связан с активностью клеток, сходных с клетками, участвующими в Т-ГЗТ. CD4 клетки распознают различия по HLA-II, а CD8 Т-клетки распознают HLA-I. Процесс распознавания в цитотоксической реакции против чужеродных HLA-антигенов отличается от сочетанного обнаружения собственных молекул HLA-I и эндогенного антигена в вирус-инфицированных клетках. Т-клетки, несущие $TCR\alpha\beta$, дают высокую частоту реакций на аллельные варианты молекул HLA-I и II классов; это явление называется аллореактивностью. CD4+ Т-клетки являются более необходимыми и достаточными для начала отторжения аллотрансплантата, даже без CD8 лимфоцитов. Т-клетки хозяина, вероятно, распознают в качестве множественных новых антигенов структуры молекулы HLA, различающиеся по форме и заряду, а также различную белковую структуру минорных антигенов гистосовместимости.

Реакция "трансплантат против хозяина" у человека может наблюдаться после трансплантации аллогенного костного мозга (крови) или трансплантации различных органов на фоне иммуносупрессивной терапии. Т-хелперные клетки трансплантата распознают различия по HLA-II, активируются и пролиферируют, осуществляют помощь предшественникам цитотоксических Т-клеток. Данный вид предшественников распознает различия трансплантата и хозяина по HLA-I и дифференцируется в цитотоксические CD8 Т-клетки. Именно этот тип клеток уча-

ствует в разрушении клеток хозяина, отличающихся от трансплантата по антигенам главного комплекса гистосовместимости.

Одной из важнейших Т-клеточных функций является осуществление цитотоксического действия в отношении аутологичных инфицированных клеток. При вирусных инфекциях это касается, в основном, нецитопатических вирусов. CD8 Т-клетки распознают пептиды, происходящие из внутриклеточно синтезированных антигенов, в комплексе с молекулами HLA-I. Основную роль Т-клетки играют в элиминации персистирующих клеток, высвобождающих вирусы, но не гибнущих из-за отсутствия цитопатогенного действия вируса. Основным механизмом цитотоксического действия Т-клеток являются так называемые перфориновая и гранзимная цитотоксичности (последняя индуцирует апоптоз) [35].

Важно подчеркнуть две характерных черты Т-клеточного распознавания чужеродных антигенов. Т-хелперные клетки распознают на молекулах HLA-II антигенные пептиды, происходящие из внеклеточных источников. Молекулы HLA-I, которые презентуют антигены CD8 Т-клеткам и экспрессированы почти на всех ядросодержащих клетках, получают пептиды (чаще - вирусные), синтезированные внутриклеточно. Поэтому цитолитическому действию подвергаются только клетки, в которых персистируют живые вирусы, но не клетки, эндоцитировавшие чужеродные белки. В последнем случае Т-хелперный ответ индуцирует гуморальный ответ на внеклеточные антигены (T_H2) или активирует макрофаги.

ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ СИСТЕМЫ

В последние годы традиционные методы изучения иммунной системы (функциональные тесты, розеткообразование, мембранные иммуноглобулины) обогатились целым рядом новых подходов. Появилась возможность иммуноморфологического определения стадий зрелости, субпопуляционного состава и тканевой организации иммунокомпетентных клеток.

Современный уровень исследования состояния иммунной системы и проведения иммунодиагностики гемобластозов стали возможны благодаря разработке методов обнаружения маркеров степени зрелости и функциональной активности клеток. Для этого потребовалось создание огромного банка МКА, способных обнаруживать тонкие антигенные различия, связанные с линейной принадлежностью, уровнем дифференцировки и функциональной активности гемопоэтических клеток. Параллельно совершенство-

вались методы визуализации МКА, связавшихся с антигенами клеток. Эти методы несколько различаются в зависимости от целей исследования и характера анализируемого материала. При микроскопическом изучении материала (мазки крови, костного мозга, гистологические срезы или мазки/отпечатки биопсированных органов) наиболее приемлемы иммуноморфологические (чаще - ИФА, реже - иммунофлюоресцентный) методы исследования.

ИФА позволяет хорошо охарактеризовать морфологию клеток, несущих интересующий антиген, причем какое-либо специальное оборудование для этого не требуется (достаточно обычного светового микроскопа). Принцип метода состоит в том, что специфические МКА, связавшиеся с антигенами клеток, визуализируются на основании реакции того или иного фермента с соответствующим субстратом. Это достигается с

помощью нескольких методических подходов. Наиболее распространенным из них является применение вторых антител (имеют видовую специфичность против использованных МКА), меченных энзимами. В иммуногистохимических реакциях применяются наиболее часто пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза.

Для выявления связавшейся с клетками в ходе иммуногистохимического окрашивания пероксидазы хрена используют так называемые хромогены, то есть вещества, которые при расщеплении ферментом перекиси водорода образуют нерастворимый окрашенный продукт. Использование в качестве хромогена диаминобензидина ведет к окрашиванию антигенположительных структур в коричневый цвет, использование аминотилкарбазола дает окрашивание красного цвета и т.д. Выявление активности щелочной фосфатазы основано на образовании нерастворимых азокрасителей из солей диазония в процессе расщепления ферментом искусственных субстратов (фосфаты нафтолов). После завершения иммуногистохимической реакции ядра клеток обычно окрашивают гематоксилином и учитывают результат (наличие мембранного, цитоплазматического, ядерного окрашивания клеток или неклеточных структур) под обычным световым микроскопом.

Существует огромное множество модификаций иммуноферментных реакций, способов достижения более сильного специфического окрашивания, а также методов ингибирования эндогенной активности ферментов, позволяющих избежать артефактов. Большинство используемых в настоящее время методик позволяет длительное время хранить препараты, что является очень удобным для проведения ретроспективного анализа.

Выявление экспрессии антигенов клеток на цитологических и гистологических препаратах может проводиться и в иммунофлуоресцентном методе. Принцип этого метода такой же, как и в иммуноферментных реакциях: выявление антигенположительных структур в препарате на основании связавшихся с ними моноклональных антител. Однако в качестве метки в данном случае используется не фермент, а флюорохром (наиболее часто - флюоресцеин изотиоцианат). Иммунофлуоресцентный метод не нашел столь широкого распространения в окрашивании гистологических и цитологических препаратов, как иммуноферментный метод, по ряду причин. Во-первых, необходимо наличие люминесцентных микроскопов с хорошей оптикой, так как свечение флюорохрома в ряде случаев бывает весьма слабым из-за низкой плотности антигена на клетках. Во-вторых, использование флюоресцентного метода не позволяет оценить морфологию интересующих клеточных типов, что, ко-

нечно же, является лимитирующим фактором. В то же время при некоторых формах лейкозов и лимфом с достаточно однородной популяцией клеток этот метод вполне пригоден. В числе преимуществ иммунофлуоресцентного окрашивания - отсутствие неспецифических реакций и отсюда отсутствие необходимости ингибировать эндогенные энзимы.

При исследовании суспензии клеток (кровь, костный мозг т.д.) применим иммуноцитофлуориметрический метод. Он позволяет очень точно количественно охарактеризовать огромные массивы клеток (тысячи, миллионы), причем установить одновременную экспрессию на мембране нескольких антигенов. Этот метод, к сожалению, трудно рекомендовать для широкой практики, так как он требует применения очень дорогостоящего оборудования.

Для иммуноцитофлуориметрического анализа клетки обрабатывают антителами не на стеклах, а в суспензии. Для учета реакции используют проточные цитометры. Это лазерные приборы (в основном в них используются аргонные или гелий-неоновые лазеры), принцип действия которых достаточно прост. Лазерный луч проходит через кварцевую кювету. В эту кювету по одной, но с очень высокой скоростью поступают клетки (внутренний диаметр кюветы очень мал, соизмерим с диаметром клетки). В момент, когда клетка пересекает лазерный луч, пучок света от нее отражается, что обнаруживается детекторами прямого светорассеяния (FSC - forward scatter) и бокового светорассеяния (SSC - side scatter). Эти параметры отражают размер клетки и наличие в цитоплазме клетки гранулярности. Таким образом, на основании характеристик светорассеяния лазерного луча можно выделить клетки, различающиеся по размеру и цитоплазматической зернистости. На практике выделяют как минимум три типа клеток:

- лимфоциты (клетки мелкого размера без зернистости),
- моноциты (клетки с промежуточными характеристиками),
- гранулоциты (клетки более крупного размера с зернистостью).

Каждый из этих типов клеток прибор позволяет анализировать отдельно. Когда луч лазера пересекает клетку, окрашенную МКА, то есть имеющую на мембране интересующий антиген, то связанный с мембраной флюорохром возбуждается и испускает монохроматическое излучение определенной длины волны. Соответствующие детекторы обнаруживают излучение данной длины волны и позволяют расценить клетку как антигенположительную. Применение различных флюорохромов позволяет обнаруживать одновременно две и три антигенные детерминанты на клетках интересующего типа (на-

пример, на лимфоцитах). Следует отметить высокую скорость и высокую точность анализа. По этим причинам проточно-цитофлуориметрический анализ завоевывает все более широкое распространение в гематологии и иммунологии.

Основную проблему при изучении иммунной системы указанными методами представляет

формирование панели МКА. Набор используемых антител может различаться в зависимости от целей исследования. Определены некоторые стандарты для проведения иммунодиагностики лейкозов и лимфом методами проточной цитофлуориметрии (табл. 8).

Таблица 8

Набор моноклональных антител для иммунодиагностики [46]

Название	Клеточный тип	Антиген
1	2	3
CD1a	Кортикальные тимоциты, субпопуляция В-клеток, дендритические клетки	HLA-подобный белок, может связываться с β_2 -микроглобулином
CD2	Т-клетки, большинство NK-клеток	Рецептор Е-розеткообразования, лиганд LFA-3
CD3	Мембранная экспрессия на зрелых Т-клетках, цитоплазматическая экспрессия на незрелых Т-клетках	Ассоциирован с Т-клеточным рецептором, опосредует передачу сигнала
CD4	Хелперные/индукторные Т-лимфоциты, моноциты, незрелые миелоидные клетки	Рецептор для молекул HLA-II и ВИЧ
CD5	Тимоциты, зрелые Т-клетки, субпопуляция В-клеток	Сцеплен с Т-клеточной пролиферацией
CD7	Т-клетки, NK-клетки, субпопуляция незрелых миелоидных клеток	Белок с м.м. 40 кДа
CD8	Цитотоксические/супрессорные Т-клетки, субпопуляция NK-клеток	Рецептор для молекул HLA-I
CD10	с-ОЛЛ, лимфоидные клетки-предшественницы, нейтрофилы, подкласс зрелых В-клеток	Общий антиген ОЛЛ (CALLA), нейтральная эндопептидаза (энкефалиназа)
CD11b	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы, NK-клетки	Молекула адгезии, C3bi-рецептор
CD11c	Моноциты, нейтрофилы, NK-клетки, субпопуляция В-клеток	Молекула адгезии, gp150/95
CD13	Миелоидные клетки	Аминопептидаза N
CD14	Моноциты, слабая экспрессия на нейтрофилах	Рецептор для LPS
CD15	Нейтрофилы, слабая экспрессия на моноцитах	Х-гаптен, 3-фукозил-N-ацетил-лактозамин
CD16	NK-клетки, нейтрофилы, субпопуляция моноцитов	Низкоаффинный рецептор для IgG
CD19	Предшественники В-клеток и зрелые В-клетки	Мост для сигнала через мембранные Ig
CD20	Субпопуляция В-клеточных предшественников, В-клетки	Ионный канал, субстрат протеинкиназы C
CD22	Мембранная экспрессия на В-клетках, цитоплазматическая экспрессия на В-клеточных предшественниках	Родственен NCAM, мост для сигнала через мембранные Ig
CD23	Субпопуляция В-клеток	Низкоаффинный Fc-рецептор для IgE
CD24	В-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты, нейтрофилы	Сцепленный с GPI (гликозил фосфатидил инозитолом) гликопротеин с м.м. 35-45 кДа
CD25	Активированные Т- и В-лимфоциты	α -цепь рецептора для интерлейкина-2 (IL-2R)
CD30*	Активированные Т- и В-лимфоциты, клетки Березовского-Штернберга	Гликопротеин с м.м. 105 кДа; антиген Ki-1
CD33	Моноциты, миелоидные предшественники, слабая экспрессия на нейтрофилах	Гликопротеин с м.м. 67 кДа
CD34	Миелоидные и лимфоидные клетки-предшественницы	Гликопротеин с м.м. 105-120 кДа
CD38	Активированные лимфоциты, субпопуляция В-клеток, плазматические клетки	Гликопротеин с м.м. 45 кДа
CD41a	Тромбоциты, мегакариоциты	Гликопротеин IIb/IIIa, рецептор фибронектина
CD42b	Тромбоциты, мегакариоциты	Гликопротеин Ib, часть рецептора для фактора Виллебранда
CD45	Все лейкоциты	Антиген T200, тирозин фосфатаза

Продолжение таблицы 8

1	2	3
CD61	Тромбоциты, мегакарициты	Гликопротеин IIIa, β-цепь витронектинового рецептора
CD64	Моноциты, макрофаги	Высокоаффинный рецептор для IgG
CDw65	Нейтрофилы, слабая экспрессия на моноцитах	Церамид додекасахарид 40
CD71	Эритроидные клетки, активированные Т- и В-лимфоциты, макрофаги	Рецептор трансферрина
CD79a	В-лимфоциты, включая незрелые В-клетки	Igα/mb-1, часть В-клеточного рецептора для антигена
CD103	Интраэпителиальные лимфоциты	HML-1
CD117	Миелоидные клетки-предшественницы	C-kit, рецептор для фактора стволовых клеток
FMC7	Дифференцированные В-лимфоциты	Гликопротеин с м.м. 105 кДа
Гликофорин А	Эритроциты, эритробласты и эритроидные клетки-предшественницы	Сиалированный гликопротеин
HLA-DR	В-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты, моноциты, клетки-предшественницы	Часть HLA-II комплекса
MPO	Лизосомальная экспрессия в нейтрофилах и моноцитах, включая незрелые миелоидные клетки	Миелопероксидаза
TdT	Ядерная экспрессия в лимфоидных клетках-предшественницах	Терминальная дезоксинуклеотидил трансфераза
TCR α/β	Большинство Т-лимфоцитов	α/β цепи Т-клеточного рецептора
TCR γ/δ	Подкласс Т-лимфоцитов	γ/δ цепи Т-клеточного рецептора
κ	Мембранная экспрессия на В-лимфоцитах	Легкая цепь Ig-типа каппа
λ	Мембранная экспрессия на В-лимфоцитах	Легкая цепь Ig-типа лямбда
μ	В-лимфоциты	Тяжелая цепь Ig-класса мю

Примечание. * Отмечены МКА, не перечисленные в работе [46]; м.м. - молекулярная масса.

Панели МКА для диагностики лимфом на срезах опухоли не являются стандартизованными. Это обусловлено тем, что патологи разных

набор антител, так как большинство антигенов разрушаются при фиксации в формалине и парафиновой заливке).

Таблица 9

Нормальные показатели содержания субпопуляций лимфоцитов в крови и костномозговом пунктате здоровых взрослых людей [18]

Тип клеток, CD	Кровь	Костный мозг
CD3	55-70*	46,4
CD4	37-45*	23,8
CD8	27-30*	23,5
CD1a	1,1	1,2
CD5	60-70*	49,4
CD4/CD8	1,6	1
HLA-DR	11-14*	20,6
CD16	10-15*	6,3
CD19	7,1	11,7
CD10	2,5	7,2
CD14	1,9	1,4
CD15	1,7	3,0

Примечание. Указано среднее содержание антиген-положительных клеток в гейте лимфоцитов. * - Данные лаборатории клинической иммунологии РОНЦ РАМН (рук. - профессор З.Г. Кадагидзе) с использованием отечественных МКА серии ИКО.

стран отдают предпочтение работе на криостатных либо парафиновых срезах (в последнем случае может быть применен весьма ограничен-

Таблица 10

Нормальное содержание субпопуляций лимфоцитов в трепанобиоптатах костного мозга

Маркеры	Среднее (разброс)*
CD3	34,8 (22,6-50,6)
CD4	11,7 (8-13,9)
CD8	24,1 (20,3-37,2)
CD4/CD8	0,4 (0,3-0,5)
CD7	24 (20,6-39,9)
CD2	34,1 (26,1-51,5)
CD19	33,6 (16,5-40,3)
CD19+CD10+	13 (6-19,1)
CD19+CD20+	16,2 (12,3-22,7)
CD3-(CD16,56)+	4,4 (3,2-7,1)
CD33+CD34-	6 (5,4-6,8)
CD14+	4,9 (1-7)
CD33-CD34+	7,8 (5,3-9,5)
Сумма субпопуляций ^А	91,9 (80,2-98,7)

Примечание. * - Процент клеток в лимфоидном гейте, исключая ядерные эритроидные клетки. Медиана (25 - 75%). ^А - Сумма процентов CD19⁺, CD3⁺, NK, CD33⁺/CD34⁻, CD33⁺/CD34⁺ и CD14⁺ клеток.

В результате проточно-цитометрических исследований с применением комплекса МКА были определены некоторые нормы содержания Т-

и В- лимфоцитов, их субпопуляций и NK-клеток в периферической крови и костномозговом пунктате взрослых людей (табл. 9). Эти показатели могут несколько различаться в зависимости от типа использованных МКА, но в целом являются достаточно стабильными.

Относительно показателей содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови у различных авторов практически нет расхождений. Следует лишь учитывать при интерпретации данных диапазон колебаний, составляющий примерно $\pm 10-15\%$.

В случае оценки субпопуляций лимфоцитов костного мозга ситуация иная. Данные здесь различны в зависимости от метода получения материала для исследования и способа оценки субпопуляций лимфоцитов: трепанобиопсия и подсчет антигенположительных клеток на гистологических срезах, трепанобиопсия и иммуноци-

тофлуориметрическая оценка полученных клеток, иммуноцитофлуориметрическая оценка клеток, полученных при пункции костного мозга. В случаях изучения костномозговых пунктатов получают, как правило, завышенные данные содержания Т-клеток за счет разбавления костного мозга кровью. Поэтому в качестве наиболее приемлемых показателей можно привести данные [47], полученные при иммуноцитофлуориметрическом исследовании клеток, выделенных из трепанобиоптата костного мозга (табл. 10).

В целях унификации данных по оценке субпопуляционного состава лимфоцитов костномозговых пунктатов можно рекомендовать забор небольшого количества материала (0,2 мл). В этих случаях разбавления материала клетками крови не происходит, и данные являются сопоставимыми с таковыми, полученными при исследовании трепанобиоптатов.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ

К иммунохимическим относятся методы, основанные на специфическом взаимодействии растворимого или дисперсного антигена и антител. Как сами методы, так и точки их приложения в клинической лабораторной практике чрезвычайно разнообразны. В гематологии иммунохимические методы исследования используются для выявления и анализа иммуноглобулинопатий (ИГП) - состояний, связанных с количественными и качественными изменениями иммуноглобулинов (Ig).

Обнаружение и характеристика ИГП необходимы для диагностики и дифференциальной диагностики при распознавании заболеваний с разной этиологией, но сходным клинико-лабораторным симптомокомплексом. Это, прежде всего, парапротеинемические гемобластозы и другие заболевания, протекающие с остеодеструкциями, гиперпротеинемией, стойким повышением РОЭ, почечной патологией, плазмоцитозом костного мозга (от незначительного до выраженного), криоглобулинемией, увеличением лимфоидных органов и т.д.

Современная иммунохимия и химия белков предлагают широкий ассортимент качественных и количественных методов анализа Ig, отличающихся по чувствительности и степени сложности [3, 7, 8, 23, 27]. В данном разделе изложены принципы методов, составляющих минимальный арсенал клинической иммунохимической лаборатории и, в первую очередь, необходимых для диагностики ИГП.

В основе современного иммунохимического исследования лежат, прежде всего, разнообраз-

ные модификации электрофоретических и иммунопреципитационных методов [3, 13, 20].

Под иммунопреципитацией понимается реакция антигена и соответствующих ему антител, в результате которой происходит образование нерастворимых иммунных комплексов. Реакция протекает, в зависимости от метода, в жидкой фазе или в гелях, а образовавшийся осадок (иммунный преципитат) регистрируется визуально или приборами. При анализе ИГП антигеном выступают Ig или их фрагменты, а источником специфических антител служат сыворотки животных, проиммунизированных разными структурными формами иммуноглобулинов человека. Минимальный необходимый для диагностики ИГП набор этих реагентов должен включать в себя антисыворотки к пяти классам тяжелых цепей и двум типам легких цепей Ig, а также антисыворотку ко всем белкам сыворотки человека.

Электрофоретические методы исследования

Процесс перемещения заряженных частиц под воздействием электрического поля называется электрофорезом (ЭФ). Молекулы белков в растворе несут определенный электрический заряд благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Поэтому их можно подвергнуть электрофоретическому исследованию. ЭФ белков сыворотки и других биологических жидкостей проводят как в жидкой фазе, так и на различных носителях. В настоящее время для рутинных клинических исследований используются ацетат-целлюлозная мем-

брана и гель агарозы. Размер пор этих материалов значительно превышает размер исследуемых белков, даже высокомолекулярных. Поэтому помещенные в них белки под действием электрического поля мигрируют, во-первых, к аноду, поскольку в щелочном буфере стандартной электрофоретической системы заряжены отрицательно; и во-вторых, со скоростью, зависящей, главным образом, от величины их заряда. Однако разрешающая способность крупнопористых носителей, определяющая четкость разделения и количество выявляемых фракций, неодинакова. Лучшими характеристиками обладает агароза, которая поэтому является предпочтительной средой для ЭФ при диагностике ИГП. Ацетат-целлюлозная мембрана используется для проведения скрининговых исследований.

В сыворотке крови человека растворено более 120 белков. В образовании электрофоретических фракций участвуют только некоторые из них, присутствующие в достаточной концентрации (рис. 47). Это альбумин и часть глобулинов: α_1 -антитрипсин, α_1 -липопротеин (α_1 -зона), α_2 -макроглобулин, гаптоглобин (α_2 -зона), трансферрин, β -липопротеиды, С3-компонент комплемента (β -зона), фибриноген (γ_1 -зона) - в случае исследования плазмы, IgG (γ -зона). При определенных патологических процессах, связанных с усилением синтеза или повышением катаболизма тех или иных сывороточных белков, происходит соответствующее изменение фракций, формируемых этими белками на ЭФГ. Кроме того, при усилении синтеза белков, не участвующих в образовании ЭФ-фракций в норме, они также начинают выявляться на ЭФГ в виде отдельных полос или через усиление уже существующих фракций. К таким белкам относятся, прежде всего, орозомукоид и α -липопротеиды (α_1 -зона), антихимотрипсин и церулоплазмин (α_2 -зона), фибронектин (граница α_2 и β -зон), четвертый компонент комплемента С4 (β -зона), С-реактивный белок и лизоцим (γ_2 - и γ_3 -зона соответственно), а также поликлональные IgA (β_2 - и γ_1 -зона) и IgM (γ_1 -зона) [25].

ЭФ белков плазмы или сыворотки дает возможность оценить наличие и выраженность обычных ЭФ-фракций (и косвенно сделать вывод о содержании образующих их белков), а кроме того, выявить необычные дополнительные фракции, не свойственные нормальным образцам (в том числе М-градиенты), природа которых должна быть подтверждена дальнейшими иммунохимическими исследованиями.

Для того чтобы полностью использовать возможности метода, электрофореграмму необходимо оценивать как визуально, так и инструментально, используя денситометрию (см. рис. 47).

Опытный глаз видит гораздо больше нюансов, чем прибор, а, зачастую, именно эти нюансы указывают на необходимость более углубленного анализа. С другой стороны, количественно выразить содержание белка в электрофоретических фракциях может только прибор, а для оценки активности, стадии заболевания и контроля эффективности проводимой терапии количественная оценка ЭФГ имеет неоспоримое значение.

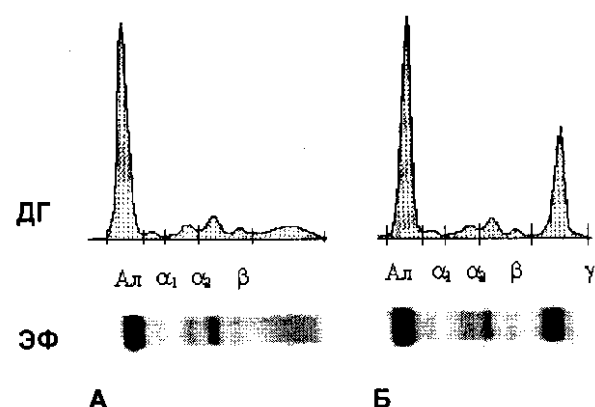


Рис. 47. Электрофореграмма (ЭФ) и денситограмма (ДГ) белков сыворотки. А - норма; Б - М-градиент в зоне γ -глобулинов. Анод слева.

Нормальные значения электрофоретических белковых фракций подвержены некоторым колебаниям, связанным как с популяционными колебаниями уровня сывороточных белков, так и с особенностями примененного метода [10].

В качестве примера приводим нормальные значения, полученные при исследовании здоровых доноров Москвы при использовании системы Paragon фирмы Beckman, США [2]:

Таблица 11
Соотношение фракций белка в крови доноров при электрофорезе, %

Фракция	Процент
Альбумин	52,4-69,4
α_1 -глобулины	1,3-3,9
α_2 -глобулины	5,4-11,6
β -глобулины	9,0-17,4
γ -глобулины	9,3-20,3

Качественно выполненный электрофорез является высокоинформативным методом, который позволяет без больших затрат времени, сил и средств получить предварительную характеристику белков сыворотки и других биологических жидкостей.

Один из основных недостатков метода - невозможность во многих случаях сделать вывод о природе белковой полосы, выявленной на электрофореграмме. Особенно это относится к необычным зонам и фракциям, отсутствующим в

нормальной сыворотке. В то же время, если электрофоретическая подвижность двух разных белков (например, нормального и патологического) совпадает, они будут видны в виде одной полосы на электрофореграмме, и нормальный белок, таким образом, маскирует присутствие патологического. Поэтому в целом ряде случаев изолированное электрофоретическое исследование недостаточно для правильного диагноза и должно дополняться иммунопроявлением ЭФГ.

Помимо ЭФ в геле агарозы, с диагностической целью применяются и другие электрофоретические методы, распространенные не столь широко. Так, например, во второй половине 90-х годов в диагностической практике появился новый вариант электрофореза - капиллярный электрофорез [17, 21]. В этом варианте фракционирование белков проводится в жидкой буферной среде, заключенной в силиконовый капилляр.

Основными преимуществами капиллярного электрофореза являются полная автоматизация, быстрота получения результата, более высокая, чем при использовании агарозы, разрешающая способность и соответственно лучшее разделение фракций [17]. При диагностике ИГП существенного увеличения чувствительности капиллярного ЭФ по сравнению с агарозным не установлено, однако он имеет преимущество при миграции патологических белков в β -зоне, позволяя обнаружить дополнительные пики, образованные этими белками, чаще, чем при использовании агарозы. Кроме того, в капиллярном ЭФ отсутствуют стартовые артефакты, иногда возникающие в агарозном геле, например, при наличии криоглобулинов, и мешающие правильной трактовке результатов [17].

Несмотря на всю привлекательность метода, нужно заметить, что для него необходимо крайне дорогостоящее оборудование, что, по-видимому, скажется на широком распространении капиллярного электрофореза. А поскольку принципиальных преимуществ при исследовании ИГП у капиллярного электрофореза, по сравнению с электрофорезом в агарозе, не выявлено [22], значение последнего в клинической диагностической практике еще долго не будет утрачено.

С целью выявления следовой секреции парпротеинов целесообразно применять электрофоретические методы, отличающиеся более высокой чувствительностью, чем разделение в жидкой фазе или крупнопористых носителях. К таким методам, прежде всего, относятся изоэлектрофокусирование и противоточный изотакхофорез.

Принцип изоэлектрофокусирования заключается в разделении белковых молекул по их изо-

электрическим точкам (pI) при одновременной концентрации (фокусировании) белковых фракций в условиях градиента pH, созданного присутствующими в геле амфолинами.

Привлекательной особенностью метода является его высокая чувствительность [30], однако сложная технология выполнения, трудность интерпретации результатов, а также индивидуальные свойства некоторых белков затрудняют использование изоэлектрофокусирования в повседневной диагностической работе.

Подобного рода затруднения можно преодолеть, используя противоточный изотакхофорез на ацетат-целлюлозной мембране - один из методов ЭФ в неоднородной системе буферов, имеющих общий катион, но разные анионы [1].

При изотакхофорезе ионы разделяемого образца располагаются в порядке уменьшающейся электрофоретической подвижности между двумя соответственно подобранными видами ионов, один из которых ("ведущий") имеет более высокую подвижность, чем другой ("замыкающий"). Так как принцип, лежащий в основе изотакхофореза, действителен как для больших, так и для малых ионов, изотакхофорез при выполнении определенных условий позволяет анализировать белки без особых затруднений.

Изотакхофорез на ацетат-целлюлозной мембране позволяет одновременно концентрировать на один - два порядка и электрофоретически разделять белки, находящиеся в высокоразбавленных растворах [1]. Поэтому метод идеально подходит для выявления и идентификации белка Бенс-Джонса в моче. Поскольку концентрация белковых компонентов происходит автоматически в ходе самого изотакхофореза, устраняется необходимость предварительного концентрирования образцов мочи. Этим же определяется незаменимость метода при исследовании малобелковых биологических жидкостей, доступных в небольшом объеме, ограничивающем предварительное концентрирование (спинномозговая и слезная жидкости, слюна и т.д.).

Ограничения метода определяются, главным образом, белковой нагрузкой исследуемого образца. При большом количестве белка в пробе образуются широкие зоны разделяемых компонентов, снижается четкость их разделения и возникают искажения спектра. Поэтому высокое содержание белка в сыворотке крови препятствует определению следовых количеств парпротеина в ней.

Техническая простота и удобство работы с ацетат-целлюлозной мембраной позволяют рассчитывать на использование изотакхофореза в клинико-диагностических лабораториях.

Иммунофиксированный электрофорез

В конце 60-х годов был предложен метод, названный иммунофиксированным электрофорезом или иммунофиксацией, который позволяет иммунохимически идентифицировать индивидуальные белки на электрофореграмме без потери наглядности и четкости классической электрофоретической картины.

Принцип метода заключается в следующем [5, 8]. Одновременно делается несколько ЭФГ исследуемого образца. После завершения форе-реза одна из полосок окрашивается и служит контролем разделения, а на поверхность других полос наносятся антисыворотки к тяжелым и легким цепям Ig. Через некоторое время (как правило не более 1 ч) в месте расположения белка, прореагировавшего с соответствующей ему антисывороткой, образуется преципитат, который полностью сохраняет форму и положение изучаемой фракции. Антисыворотки другой специфичности образования преципитата не вызывают. Таким образом, иммунофиксация позволяет наглядно сопоставить электрофоретическую подвижность белковой полосы с ее иммунохимической характеристикой благодаря сочетанию специфического иммунного проявления с наличием контрольной электрофореграммы (рис. 48).

В настоящее время с созданием высокоэффективных тест-систем на основе иммунофиксации метод получил исключительно широкое распространение в иммунохимической диагностике для идентификации моноклональных Ig (парапротеинов), практически вытеснив столь популярный в 60-80 годах иммуноэлектрофорез, от которого иммунофиксация отличается целым рядом привлекательных особенностей. К ним относятся, прежде всего, высокая специфичность, чувствительность при исследовании минорных, множественных, а также скрытых M-градиентов, легкая, по сравнению с иммуноэлектрофорезом, трактовка результатов, быстрота выполнения [5, 27, 29].

С помощью иммунофиксации можно выявить следовые градиенты, которые не видны на окрашенной ЭФГ. Это связано с накоплением дополнительного белка (антител) в зоне градиента во время образования специфического преципитата, что повышает чувствительность метода по сравнению с ЭФ.

Иммунофиксация предъявляет повышенные требования к антисывороткам: реагенты должны обеспечивать образование устойчивого специфического преципитата и не давать высокого фонового окрашивания, затрудняющего учет реакции.

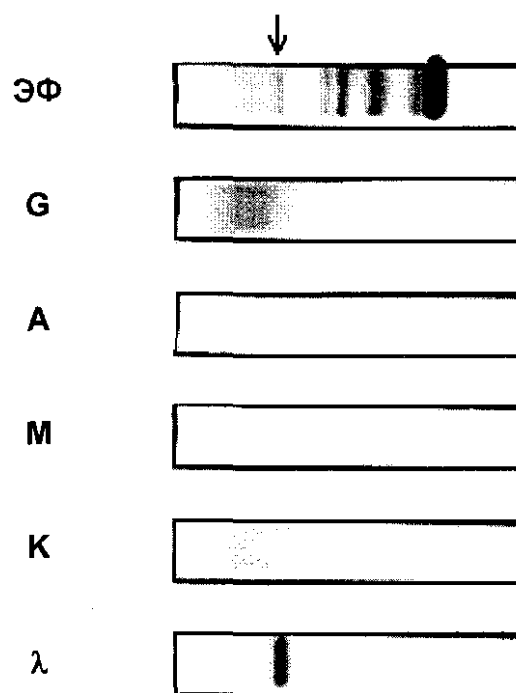


Рис. 48. Иммунофиксация сыворотки: выявление белка Бенс-Джонса λ-типа (указан стрелкой). Анод справа.

Иммуноэлектрофорез

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) в модификации П. Грабар и С. Вильямс, широко применяемый в клинической лабораторной практике, является методом качественного иммунохимического анализа белков, в том числе Ig [3, 8].

До недавнего времени ИЭФ широко применялся для выявления и идентификации парапротеинов, однако сейчас в большинстве ситуаций, как уже упоминалось, он практически замещен методом иммунофиксации, которая значительно превосходит ИЭФ по чувствительности и наглядности получаемых результатов [16]. Относительно низкая чувствительность ИЭФ связана с воздействием на результирующую картину скорости диффузии исследуемых молекул и маскирующим воздействием антигенно родственных белков (например, поликлональных иммуноглобулинов и их фрагментов), присутствующих в образце.

Однако в ряде случаев использование ИЭФ вполне оправдано, учитывая простоту постановки, менее жесткие, чем для иммунофиксации, требования к иммунохимическим реагентам и экономное их расходование. Так, он используется для анализа сывороточных парапротеинов, присутствующих в значительном количестве, при скрининговом исследовании образцов мочи на наличие следовой протеинурии, включая парапротеинурию, и для типирования белка Бенс-Джонса в моче. Кроме того, ИЭФ яв-

ляется методом выбора при диагностике болезней тяжелых цепей, поскольку условия формирования преципитата в ИЭФ таковы, что позволяют выявить структурно дефектные белки БТЦ на фоне антигенно родственных, но полноценных в структурном отношении поликлональных иммуноглобулинов того же класса [3].

Методы количественного определения иммуноглобулинов

Количество Ig в биологических жидкостях можно определить различными иммунохимическими методами. Выбор метода обусловлен рядом обстоятельств, к которым относятся концентрация Ig в исследуемом материале, физико-химические характеристики образца и реагентов, наличие специального оборудования, количество исследований, выполняемых одновременно, срочность получения результата.

Наиболее широко для диагностических целей применяются методы, основанные на количественной регистрации специфического преципитата, образовавшегося в результате реакции антигена (исследуемого белка, в частности, Ig) с антителами, содержащимися в специфичной к нему антисыворотке. Реакция преципитации может протекать как в жидкой фазе (например, при нефелометрическом и турбидиметрическом анализе), так и в агаровом геле (при использовании радиальной иммунодиффузии). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки.

Радиальная иммунодиффузия. Принцип метода радиальной иммунодиффузии (РИД) заключается в следующем [14, 32]. В слое геля, содержащего специфическую антисыворотку, вырезают круглые лунки и в каждую из них вносят исследуемые образцы. При последующей инкубации антиген диффундирует из лунки в гель и при связывании с родственной антисывороткой образует иммунный преципитат, имеющий форму кольца, поскольку при свободной диффузии антиген мигрирует равномерно во всех направлениях. Чем больше концентрация антигена, тем больший диаметр будет у образующегося кольца преципитации, причем эта зависимость носит прямопропорциональный характер [26].

Сравнивая размер колец исследуемых сывороток и стандартной сыворотки, содержащей известное количество данного белка, рассчитывают его концентрацию в исследуемых образцах по калибровочному графику.

Для РИД общей закономерностью является зависимость конечного результата от размеров молекулы белка, которые определяют коэффициент диффузии. Затруднения возникают в случаях, когда в исследуемой сыворотке и стандар-

те антигенно родственные молекулы иммуноглобулинов различаются по степени полимеризации, или одна из сывороток содержит фрагменты иммуноглобулинов. Например, при определении количества IgM в сыворотке больных макроглобулинемией Вальденстрема, системной красной волчанкой, некоторыми формами первичных гуморальных иммунодефицитов нередко искажение результатов (завышение) бывает связано с наличием в таких сыворотках низкомолекулярного (7S) макроглобулина, диффундирующего быстрее нормального (19S) IgM, присутствующего в стандартной сыворотке. В то же время, в образцах с высоким уровнем высокомолекулярного IgM (26S) его количество будет недооценено.

Наличие в исследуемом материале фрагментов иммуноглобулинов приводит к резкому завышению фактических данных. Это связано, во-первых, с высокой скоростью диффузии низкомолекулярных фрагментов, а во-вторых, с их антигенной неполноценностью (за счет отсутствия части белковой цепочки) по сравнению с нормальными иммуноглобулинами стандарта, в результате чего они хуже реагируют с присутствующей в геле антисывороткой и образуют более рыхлый преципитат. Наличие фрагментов может быть обусловлено нарушением синтеза Ig, а также являться результатом длительного или неправильного хранения образцов.

При постановке стандартной РИД антисыворотка, включенная в агар, должна быть моноспецифической (то есть не содержать примесных антител к другим белкам). Но в определенных случаях в гель целенаправленно вносятся не моно-, а биспецифическая антисыворотка (то есть антисыворотка, содержащая два разных вида антител). Модификация метода РИД, получившая название "метод двойных колец" и основанная на использовании биспецифических антисывороток, была разработана Е.В. Чернохвостовой с соавт. [12] и применена ими для выявления и дифференциальной диагностики иммуноглобулинопатий, в том числе парпротеинемий [3, 6, 13]. Метод двойных колец с использованием антисывороток-систем ($\gamma + \kappa$) и ($\gamma + \lambda$) чрезвычайно удобен для выявления и титрования G-парапротеинов, а также парпротеинов других классов, определения соотношения κ / λ , выявления белка Бенс-Джонса в сыворотке и моче, определения количества нормального IgG при G-парапротеинемиях.

Инструментальные требования метода РИД невелики, дорогостоящего оборудования не требуется, однако для внесения образцов необходимо использовать инструменты, позволяющие точно отмерять объемы в несколько микролитров, а диаметр колец должен быть измерен с

точностью не менее 0,1 мм [14]. Метод нетрудоемкий (особенно при использовании готовых наборов), однако довольно длительный (до суток) из-за продолжительной инкубации. Если же иметь в виду возникающую иногда необходимость повторного исследования (неудачная постановка, необходимость разведения образца и т.д.), то получение результата задержится как минимум на 2 суток, что является существенным недостатком метода.

Как и большинство биологических параметров, уровень Ig в популяции подвержен значительным колебаниям, обусловленным рядом факторов. К таким факторам относятся, прежде всего, возраст, некоторые факторы внешней среды, генетические особенности, половые различия. Имеются и физиологические колебания уровня Ig у каждого человека. И, наконец, главной причиной наблюдаемого разнообразия является индивидуальная вариабельность уровня Ig [13, 14, 28].

Поэтому для каждого региона и возраста должны быть установлены нормальные значения уровня сывороточных иммуноглобулинов разных изотипов. Для взрослого населения европейской части России они составляют при определении с помощью РИД: IgG 95-225 МЕ/мл, IgA 55-250 МЕ/мл, IgM 60-405 МЕ/мл [13, 14].

Нефелометрия и турбидиметрия. В этих методах реакция антиген - антитело протекает в жидкой фазе, а для повышения ее эффективности реагенты помещают в раствор коллоида, обычно полиэтиленгликоля (ПЭГ). Молекулы ПЭГ, занимая значительный объем раствора, вытесняют оттуда молекулы белков, относительная концентрация которых в свободном пространстве повышается, а взаимодействие ускоряется. Поэтому количественное определение иммунного преципитата можно проводить уже через несколько минут после внесения в образец антител, измеряя с помощью приборов мутность пробы [8, 32].

Судить о мутности раствора можно двумя способами: по количеству рассеянного света и по количеству прошедшего; первый способ называется «нефелометрией», второй - «турбидиметрией». Нефелометрия точнее и надежнее, так как фоновые значения прибора очень малы, и даже небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию сигнала, который в широких пределах пропорционален размеру осадка. При турбидиметрии количество преципитата должно быть таким, чтобы рассеялось не менее 10-20% света, иначе измерение будет недостоверным. Кроме того, неизвестен физический закон, связывающий количество света, прошедшего через мутный раствор, и число частиц, поэтому калибровочные графики

эмпиричны, что сказывается на воспроизводимости [10].

Для проведения нефелометрии и турбидиметрии в клинической практике удобно использовать автоматизированные системы, адаптированные для проведения серийных диагностических исследований, отвечающих критериям контроля качества. Анализаторы отличаются природой источника излучения (ртутная лампа, лазерный элемент, вольфрамовый источник), характером учета реакции (в конечной точке или по кинетике реакции) и другими техническими характеристиками, сказывающимися в конечном счете на чувствительности и точности измерений, а также на удобстве работы с прибором.

Методы, основанные на регистрации изменения оптических свойств среды, предъявляют особые требования к образцу и реагентам, которые должны быть оптически прозрачны и не содержать веществ, образующих нерастворимые соединения с ПЭГ (например, гепарин).

Антисыворотки должны обеспечивать образование устойчивого осадка (за счет высокого титра специфических антител, обладающих высоким сродством к антигену), иначе уменьшается количество преципитата из-за формирования небольших легко диссоциирующих комплексов, и результат исследования будет ошибочно занижен.

Таким образом, привлекательными сторонами рассматриваемых методов являются быстрота и точность измерения, большая пропускная способность автоматизированных систем, однако они нуждаются в специальном оборудовании и реагентах.

Иммуноферментный анализ. Отличительной особенностью этой обширной и разнообразной группы методов [7], которая обусловила их общее название, является использование индикаторных антител (реже антигенов), соединенных с ферментативной меткой. После того, как исследуемый антиген и иммунохимический реагент прореагировали между собой, зона реакции обрабатывается раствором, содержащим субстрат использованного фермента и хромоген - вещество, которое при появлении продуктов реакции между ферментом и субстратом переходит в окрашенную форму. По появлению и интенсивности окраски судят о наличии исследуемого антигена и его количестве.

Характерной чертой иммуноферментного анализа (ИФА) является сочетание специфичности, свойственной реакциям антиген-антитело, с высокой чувствительностью определения, позволяющей выявлять нанограммовые количества веществ [32].

Кроме того, поскольку ИФА не требует образования видимого преципитата (как все иммунодиффузионные и преципитационные методы,

рассмотренные выше), здесь широко применяются моноклональные антитела, характеризующиеся чрезвычайно высокой степенью специфичности, вплоть до одной антигенной детерминанты.

В лабораторной диагностике иммуноглобулинопатий ИФА применяется, прежде всего, для определения уровня изотипов Ig, синтезируемых в небольших количествах (например, IgE), а также имеющих незначительные антигенные различия (например, субклассы IgG и IgA, свободные и связанные легкие цепи), и, кроме того, для анализа малобелковых биологических жидкостей (спинномозговая жидкость, слюна, секреты, неконцентрированная моча).

Выявление циркулирующих иммунных комплексов и криоглобулинов. Циркулирующий иммунный комплекс - сложное молекулярное образование, состоящее из антитела (Ig), специфически, то есть через активный центр, связанного с родственным антигеном, а также, как правило, некоторых компонентов системы комплемента. Свойства Ig, входящих в состав иммунного комплекса, отличаются по многим характеристикам от свойств свободных Ig, что дает возможность определять их дифференцированно.

Большое количество предложенных методов определения ЦИК можно разделить, прежде всего, на антигенспецифические и антигеннеспецифические. Первые основаны, как следует из названия группы, на выявлении ЦИК через присутствующий в них антиген.

Однако в большинстве случаев антиген неизвестен, кроме того, ЦИК одного и того же пациента могут содержать разные антигены. Поэтому с диагностическими целями применяют, как правило, антигеннеспецифические методы, позволяющие оценить суммарный уровень ЦИК в исследуемом образце [7, 9].

По классификации Aikawa с соавт. все разнообразие этих методов можно свести по принципу, положенному в основу выявления ЦИК, к нескольким группам:

- взаимодействие с комплементом,
- взаимодействие с антителами,
- взаимодействие с клеточными рецепторами,
- физико-химические взаимодействия.

Результаты обширных международных исследований по сравнению разных методов выявления ЦИК неоднократно обсуждались экспертами ВОЗ [24]. Считается, что не существует какого-либо одного идеального метода выявления ЦИК, поскольку сам объект исследования по целому ряду структурных и функциональных параметров крайне разнообразен. Например, ЦИК различаются по молекулярной массе, заряду, константе диссоциации, изотипу Ig, формирую-

щего ЦИК, наличию или отсутствию разных белков системы комплемента, наконец, по свойствам входящих в них антигенов, в большинстве случаев неизвестных. Поэтому рекомендуется использовать одновременно два или более методов, входящих в разные классификационные группы, если необходимо получить наиболее точную информацию о содержании ЦИК в образце. Во всяком случае, все изложенное необходимо учитывать при оценке результатов лабораторного исследования ЦИК: отрицательная реакция говорит только о том, что в исследуемом образце нет ЦИК того типа, которые она выявляет, а не о том, что ЦИК нет вообще. В ряде случаев это объясняет расхождение между клинической картиной и лабораторными данными.

Необходимо отдельно упомянуть метод, вероятно, наиболее широко распространенный сейчас в практической медицине для выявления ЦИК на основе их физико-химических свойств - метод ПЭГ-преципитации [11, 18]. Он основан на способности ПЭГ (молекулярная масса 6000 Д) - вещества, представляющего собой линейный полимер, осаждать белки из раствора. Степень осаждения прямо пропорциональна концентрации ПЭГ. При низких (до 5%) концентрациях ПЭГ осаждаются преимущественно ЦИК. Для измерения концентрации преципитатов ЦИК применяют различные варианты инструментальных методов, например, спектрофотометрию, турбидиметрию, иммунохимический анализ осадка и т.д. Известно, что преципитация ЦИК под действием ПЭГ зависит не только от молекулярной массы ЦИК, но и от пространственной структуры его молекулы, а также от заряда. Подтверждением этого является тот факт, что такие высокомолекулярные белки, как α_2 -макроглобулин и β -липопротеиды, не осаждаются при этих концентрациях ПЭГ. Однако наличие в сыворотке нестабильных белков, склонных к агрегации (например, некоторых парапротеинов, IgG3 в высоких концентрациях), служит источником ложноположительных результатов [9].

Другими источниками ложноположительных результатов может явиться присутствие фибриногена и фибронектина, активно преципитирующих в ПЭГ, микробная контаминация сывороток при их длительном хранении, наличие больших количеств липопротеинов, использование старых растворов ПЭГ [11].

Часть ЦИК, как и некоторые парапротеины, обладают криосвойствами, то есть образуют при температуре ниже $37,5^{\circ}\text{C}$ нерасстворимый осадок, который полностью растворяется вновь при нагревании образца. Это свойство используют в лабораторной диагностике для выявления ЦИК методом криопреципитации [13, 23].

Для определения количества криоглобулинов образец предварительно помещают в капилляр для измерения гематокрита, охлаждают, а затем, после образования преципитата, капилляр центрифугируют, определяя криокрит [23]. Количественное определение полезно для мониторинга терапии. При значимом количестве криоглобулинов их можно выделить, а затем проанализировать их состав, используя различные иммунохимические методы.

Особенности технологий иммунохимического анализа

Сбор и хранение материала для исследования. Чаще всего материалом для иммунохимического исследования являются сыворотка крови и моча.

Сыворотку получают стандартно, из венозной крови, взятой натощак в сухую пробирку. После свертывания крови пробирку центрифугируют и сгусток отбрасывают. Свертывание крови лучше проводить в термостате при температуре 37,0° С, особенно при клинических проявлениях криоглобулинемии, иначе криоглобулины, присутствующие в части образцов, могут быть утеряны со сгустком.

Исследованию мешают гемолиз, хилез и особенно бактериальная контаминация образца. Поэтому в сыворотку, если исследование продолжается более суток, добавляют консервант (например, азид натрия).

При наличии протеинурии или при подозрении на следовую секрецию белка Бенс-Джонса исследуют суточную мочу. При сборе мочи емкость следует держать на холоде. Перед исследованием моча концентрируется в среднем в 5-100 раз в зависимости от величины исходной протеинурии.

При необходимости длительного хранения сыворотку и мочу замораживают при температуре не выше -20° С. Повторное замораживание и оттаивание нежелательно, а для определения некоторых параметров недопустимо.

Современная схема иммунохимического анализа

Набор иммунохимических методов для диагностики ИГП, последовательность их использования и показания к применению были в основном определены в огромном количестве работ 60-80-х годов. В нашей стране основы иммунохимической диагностики ИГП заложили в первую очередь исследования Е.В. Чернохвостовой с сотрудниками, Г.И. Абелева с сотрудниками, работавшими в тесном контакте с клиницистами-гематологами. И хотя в литературе постоянно появляются сообщения о новых методах, об усовершенствовании уже имеющихся методов,

оптимизации некоторых этапов исследования, появлении нового оборудования и реагентов, стратегия иммунохимического анализа остается неизменной.

Принципиально важным положением является то, что на основании данных какого-либо одного метода невозможно выявить, а тем более охарактеризовать ИГП. Уже на первом этапе исследования одновременно проводится анализ белков сыворотки и, при необходимости, концентрированной мочи с помощью электрофореза и количественное исследование Ig трех основных классов (G, A, M), а также определяется соотношение Ig к и λ типа. Целесообразно также определить, имеются ли в сыворотке криоглобулины и иммунные комплексы. Полученные всеми этими методами совокупные данные позволяют выявить ИГП, в части случаев полностью ее охарактеризовать, а также отобрать образцы, нуждающиеся в более глубоком исследовании.

На втором этапе уточняется природа градиентов, похожих на моноклональные; выявляются скрытые и характеризуются множественные M-градиенты; уточняется природа аномальных парапротеинов, например, белков БТЦ; определяются или уточняются класс и тип сывороточных парапротеинов при их низкой секреции и тип белка Бенс-Джонса в моче. При наличии M-градиентов неясной природы необходимо исключить D- или E-парапротеинемию. При необходимости производятся выделение и анализ криоглобулинов и иммунных комплексов. Иногда требуется определение уровня IgG разных субклассов, сывороточного IgE, секреторного IgA. Если необходимо более точно охарактеризовать тип и степень протеинурии, определяют количество маркерных мочевых белков. При выявлении парапротеинемии необходимо определить уровень C-реактивного белка и β₂-микроглобулина.

Для проведения этих исследований используются ИФ, ИЭФ, разнообразные варианты электрофоретических методов, нефелометрия или РИД, ИФА, двойная иммунодиффузия по Охтерлони, иммуноселекция и т.д.

Выполнение иммунохимической диагностики должно отвечать нескольким принципиальным требованиям. Все этапы исследования необходимо проводить и оценивать в одной лаборатории. Недопустимо, когда ЭФ проводится в биохимической лаборатории, а определение уровня Ig - в иммунологической, и результаты в виде фрагментарных данных поступают лечащему врачу. В этом случае отсутствует формулирование иммунохимического заключения, основанного на комплексной оценке результатов всех проведенных исследований.

Нужно также заметить, что планирование и глубина диагностического поиска в немалой мере определяются клинико-лабораторным комплексом, имеющимся у больного. Так, например, нормальные результаты скрининговых методов исследования, полученные у пациента с остеодеструктивным процессом или стойким повышением РОЭ, непременно заставят специалиста по иммунохимии применить более чувствительные и специфические методы для выявления скрытого градиента или несомненного исключения парапротеинемии; наличие синдрома мальабсорбции у молодого пациента заставит целенаправленно искать белок БТЦ α ; выявление эозинофилии в периферической крови делает актуальным определение уровня IgE. Поэтому в бланке направления на иммунохимическое исследование обязательно должны быть

указаны предполагаемый диагноз (но лучше симптомокомплекс) и возраст пациента.

Не всегда диагностический поиск при анализе ИГП приводит к однозначному заключению. Как и любой другой вид лабораторного и инструментального исследования, иммунохимическое исследование имеет свою "серую зону".

Для прояснения таких ситуаций бывает необходимо динамическое наблюдение за пациентом или подключение других методов исследования. Самое главное, чтобы слишком решительно сформулированное иммунохимическое заключение не подтолкнуло лечащего врача к неоправданному терапевтическому воздействию. С этой точки зрения, желательно, чтобы иммунохимик обладал определенными клиническими знаниями и работал в тесном контакте с лечащими врачами.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА В НОРМЕ

Современные гистохимические методы исследования, широко используемые в гематологии наряду с морфологическими методами, позволяют установить принадлежность клеточных элементов крови и костного мозга к тому или иному кроветворному ряду и определить степень их зрелости. Основой для гистохимической идентификации клеток крови и кроветворных органов служат особенности метаболических процессов, специфичные для каждого типа клеток. С помощью гистохимических реакций в клетках крови можно определить содержание, локализацию и распределение белков, углеводов, жиров, металлов, витаминов, а также выявить активность ферментов - биологически активных белков, высокоспецифичных катализаторов синтеза, обмена и распада самых разнообразных соединений [Пирс Э., 1961; Берстон М., 1965; Нарцисов Р. П., 1968; Найное Quaglino, 1980].

Особое значение для идентификации клеток крови и костного мозга имеет выявление активности оксидаз и гидролаз.

Оксидазы - ферменты, катализирующие перенос электронов от субстрата к кислороду, который является последним акцептором электронов в процессах биологического окисления. Представителем оксидаз является **пероксидаза**. Различные пероксидазы образуют ферментную систему, расщепляющую H_2O_2 в клетке. Пероксидаза служит своего рода маркером клеток нейтрофильного ряда. Она локализуется в цитоплазматических гранулах нейтрофильных лейкоцитов [Nakatsui et al., 1972, и др.]. По данным

одних авторов, активность пероксидазы обнаруживается уже в миелобластах [Schmalz, Braunsteiner, 1971, и др.], а другие исследователи не находят ее в этих клетках [Forteza, Bover, 1964].

Активность фермента в клетках на мазках крови и костного мозга сохраняется в нефиксированных препаратах около двух недель.

В костном мозге пероксидаза постоянно обнаруживается в клетках миелоидного ряда, начиная с промиелоцита [Bainton et al., 1971]. По мере созревания клеток этого ряда активность пероксидазы в них повышается. У здоровых людей наиболее высокая ферментативная активность свойственна сегментоядерным лейкоцитам периферической крови. Слабая активность выявляется в эозинофилах, причем она весьма устойчива к действию цианида натрия в отличие от пероксидазы других гранулоцитов, активность которой легко подавляется при введении в среду этого препарата [Yam et al., 1971].

Пероксидаза мегакариоцитов и тромбоцитов не выявляется обычными цитохимическими реакциями и ингибируется формалином. Фермент локализуется в плотных тельцах тромбоцитов и не определяется в α -гранулах, содержащих гидролитические ферменты.

Активность пероксидазы никогда не определяется ни в базофилах, ни в лимфоцитах, тогда как часть моноцитов костного мозга и периферической крови обычно дает реакцию на пероксидазу [Braunsteiner, Schmalz, 1968]. По данным Syren, Reaste (1971), около 83-88% моноцитов периферической крови обладают пероксидазной

активностью, но она гораздо ниже, чем в клетках нейтрофильного ряда. Однако ее можно сопоставить с активностью пероксидазы в миелобластах здоровых людей. Более того, в клетках обоих типов пероксидаза ведет себя одинаково по отношению к некоторым ингибиторам: азиду натрия, солям двухвалентных металлов и т. д. Методами электронно-микроскопической цитохимии было показано, что пероксидаза в моноцитах, как и в клетках нейтрофильного ряда, локализуется в азурофильных гранулах, представляющих собой лизосомы [Rychols, 1971].

Дефицит пероксидазы в нейтрофилах может быть врожденным или определяться при различных лейкоемических изменениях миелопоэза (при миелопролиферативных заболеваниях, миелодиспластических синдромах и острых миелобластных лейкозах) [Bendix-Hansen K., 1985]. Дефицит пероксидазы четко констатируется современными автоматическими гематологическими анализаторами крови при подсчете гемограммы.

Эритрокарициты и эритроциты демонстрируют слабое окрашивание в реакции на пероксидазу при фиксации метанолом. Но исследование выявляет не истинный фермент, а взаимодействие реагентов с гемоглобином, так называемая псевдопероксидаза. Эта реакция может быть использована для определения гемоглобинизации клеток красного ряда [Koike T., 1986].

Изофермент пероксидазы, сходный по своим функциональным свойствам с ферментом тромбоцитов, обнаружен в лейкоемических клетках при волосатоклеточном лейкозе, он имеет характерное расположение в образованиях эндоплазматической сети, но не в гранулах цитоплазмы [Reyes F., 1978].

Ультраструктурное исследование пероксидазы позволило установить локализацию фермента в первичных гранулах нейтрофилов, эозинофилов, обнаружить включения в ранних миелоидных предшественниках, выявить изоэнзим в тромбоцитах [Marie J.P., 1982, 1980; Cawley J.C., 1973; Behnke O., 1969; Matutes E., 1988].

Цитохимическая реакция на пероксидазу имеет широкое практическое значение для обнаружения миелоидной принадлежности бластов при различных гемобластозах. Кроме того, выявление дефицита фермента в нейтрофилах позволяет уточнить диагноз при других миелопролиферативных заболеваниях.

Гидролазы объединяют фосфатазы (щелочная и кислая), аденозинтрифосфатазы, разнообразные эстеразы и другие ферменты.

Фосфатазы (фосфоэстеразы) катализируют реакцию отщепления фосфатных групп, а иногда и обратные процессы - синтез фосфатов. Они широко распространены в животном организме;

их биологическое значение связано с обменом нуклеопротеидов, жиров и гликогена, с процессами гликогеногенеза и регенерации. Имеются данные о том, что генетические нарушения биосинтеза фосфатов приводят к тяжелым заболеваниям, связанным с нарушением обмена гликогена. Различают щелочные фосфатазы с оптимумом действия в щелочной среде и кислые с оптимумом действия при низких значениях pH.

Неспецифические кислые фосфатазы. При этом исследовании изучаются группы ферментов, освобождающих фосфат из монофосфиров в кислой среде. Они расположены в лизосомах клеток, присутствуют в большинстве кроветворных элементов. Эти ферменты могут быть разделены на два типа: эритроцитарный и незритроцитарный. Первый - генетически детерминирован, имеет узкую тканевую специфичность. КФ эритроидных клеток расположена в первичных лизосомах, состоит из группы пяти изоферментов, резистентна к ингибированию тартратом. Второй тип - не детерминирован, встречается во многих клетках с разной гистогенетической принадлежностью. Его электрофоретические фракции различаются по своим функциональным свойствам. Так фракции 1, 2 и 4 локализованы в первичных гранулах гранулоцитов, а 0, 3, 3b и 5 в области пластинчатого комплекса В- и Т-лимфоцитов и плазматических клеток. Фракции 0 и 5 не ингибируются тартратом в противоположность фракциям 3 и 3b. В норме КФ определяется в клетках гранулоцитарного и моноцитарного рядов, начиная с бластов. Максимальное количество определяется в промиелоцитах, и затем активность фермента постепенно снижается. В среднем показатель активности КФ гранулоцитов составляет 23,4 ед. Kaplow. Активность фермента усиливается при воспалительном процессе, туберкулезе, астме, коллагенозах, пиелонефрите. Высокая активность КФ свойственна плазматическим клеткам и мегакарицитам [Egashira Y., 1968; Kaplow L., 1964; Li C., 1970; Loffler H., 1961; Rozenzain L., 1963].

Диагностически важно использование этой цитохимической реакции для идентификации клеток волосатоклеточного лейкоза, содержащих изоэнзим КФ, не чувствительный к тартрату натрия, что отличает их от остальных лимфоидных клеток.

Наиболее высокая активность кислой фосфатазы обнаруживается в молодых дифференцирующихся клетках и в макрофагах. Кислая фосфатаза, выявляемая при использовании в качестве субстрата фосфата нафтолов AS (3-окси-2-нафтанилид), представлена во многих клетках кроветворной природы, причем в клетках костного мозга ее активность выше, чем в клетках периферической крови [Руденс Ю. Ф., Буйкис И. М., 1969, и др.]. Она выявляется в мегакариocyтах и

тромбоцитах, в моноцитах и ретикулярных клетках, в клетках нейтрофильного и эозинофильного рядов, начиная с промиелоцита, и в гранулах базофилов [Parmley, 1979].

По мере созревания клеток нейтрофильного и эозинофильного рядов активность кислой фосфатазы в них снижается. Зрелые нейтрофилы и эозинофилы либо обладают низкой ферментативной активностью, либо лишены ее.

Разнообразная активность присуща небольшому числу лимфобластов и лимфоцитов [Friess, Liebich, 1971, и др.]. Chichocki с соавт. (1972) по интенсивности и локализации лизосомальных ферментов, в том числе и кислой фосфатазы, различают три типа малых лимфоцитов. В клетках I типа отсутствуют и кислая фосфатаза, и β -глюкуронидаза, в клетках II типа ферментативная активность обнаруживается в пределах лишь лизосом, а в клетках III типа гистохимическая реакция на лизосомальные ферменты диффузная. Высокую активность лизосомальных ферментов Chichocki (1972) считает характерной для Т-лимфоцитов. Продукт реакции на кислую фосфатазу выпадает в клетке в виде глобул; в Т-лимфоцитах кислая фосфатаза устойчива к действию тартрата калия-натрия. Плазматические клетки дают интенсивную реакцию на кислую фосфатазу в области аппарата Гольджи и в перинуклеарной зоне.

Неспецифические щелочные фосфатазы (ЩФ). Реакцию на щелочную фосфатазу дают лишь зрелые нейтрофилы (по данным Forteza, Bover, 1964, около 25% клеток), а также ретикулярные клетки и метамиелоциты костного мозга. Около 1% лимфоцитов дают положительную реакцию на щелочную фосфатазу [Hayhoe, Quaglini, 1980]. ЩФ представляет группу изоферментов, которые освобождают в клетках фосфат из фосфомоноэфиров в щелочной среде. При цитохимическом исследовании один из этих изоферментов определяется в нейтрофилах костного мозга и крови, остеобластах, а другой - в клетках эндотелия сосудов. Фермент локализуется во вторичных гранулах и пластинчатом комплексе нейтрофилов. Наибольшая его активность определяется в циркулирующих клетках крови, в норме колеблется от 44 до 76 ед. по Karlow. На содержание фермента влияет гормональный статус: у женщин содержание ЩФ выше, чем у мужчин, активность фермента повышается у беременных, в период родов и после родов [Шубич М.Г., 1980; Merker H., 1959]. Стрессовые состояния, как и бактериальные инфекции, сопровождаются повышением активности ЩФ нейтрофилов.

Увеличение содержания ЩФ в нейтрофилах обычно наблюдается при лейкоцитозе в связи с бактериальной инфекцией, при полицитемии,

вторичных эритроцитозах. Некоторое снижение содержания ЩФ определяется при вирусных инфекциях. Значительное уменьшение ферментной активности констатировано в развернутой фазе хронического миелолейкоза, при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, серповидноклеточной анемии, миелодиспластических синдромах. Полное отсутствие ЩФ наблюдается у детей с врожденной энзимопатией - афосфатаземией, клинически протекающей подобно тяжелому рахиту [Bendix-Hansen K., 1985; Bennet J.M., 1966].

Изофермент N-щелочная фосфатаза может быть выявленным при цитохимическом исследовании у больных лимфопролиферативными заболеваниями, в частности, в В-лимфоцитах при лимфомах мантийной зоны [Nanba K., 1977]. В редких случаях при гемолитической и пернициозной анемиях, эритромиелозе щелочная фосфатаза обнаруживается в эритроидных клетках [Hayhoe F., 1953].

Щелочная фосфатаза, полученная из клеток тонкого кишечника, используется для проведения иммуноцитохимических исследований фосфатазо-антифосфатазным методом. Эндогенный фермент в нейтрофилах ингибируется левамизолом.

Аденозинтрифосфатазы (АТФазы) играют центральную роль в обмене веществ в клетке. Они катализируют отщепление концевой фосфатной группы от АТФ; при этом образуется АДФ. Высвобождающаяся в ходе этой реакции химическая энергия используется в различных процессах в клетке. При участии АТФазы осуществляется также обратный синтез АТФ из АДФ в процессе окислительного фосфорилирования. Одна из разновидностей АТФаз - активируемая магнием АТФаза - является маркером В-лимфоцитов и плазматических клеток. Она локализуется на цитоплазматической мембране [Harigaya et al., 1979, и др.].

β -Глюкуронидаза относится к гидролазам, расщепляющим гликозидные связи, локализуется, как и кислая фосфатаза, в лизосомах [De Duve et al., 1955]. Однако электронно-микроскопически не всегда удается обнаружить параллелизм между содержанием фермента и числом лизосом. Очевидно, не все лизосомы содержат β -глюкуронидазу. В некоторых клетках - лимфоцитах, плазмócитах - она располагается и вне этих органелл [Lorbacher et al., 1967], например, в эндоплазматическом ретикулуме.

Гистохимически резко положительную реакцию на β -глюкуронидазу обнаруживают макрофаги, моноциты, плазматические клетки и значительная часть лимфоцитов. Умеренная ферментативная активность свойственна гранулоцитам и тромбоцитам.

Неспецифические эстеразы - неоднородная группа ферментов, отличающихся друг от друга по субстратной специфичности и действию активаторов и ингибиторов. Расщепляют глицериновые и другие эфиры жирных кислот с короткой цепью. Неспецифические эстеразы широко распространены в животном организме. Обнаруживаются и в клетках костного мозга и периферической крови [Li et al., 1973, и др.].

В гематологии определяют хлорацетат-эстеразу, α -нафтилацетат-эстеразу, или нафтол-AS-ацетат-эстеразу, и кислую α -нафтилацетат-эстеразу. Эти ферменты получили название от субстратов, которые они гидролизуют, и от реакции среды, где они проявляют свое действие.

α -Нафтилацетат-эстераза известна и под названием неспецифической эстеразы. Впервые реакцию на неспецифическую эстеразу в гематологии использовали Wachstein, Wolf (1958). Этот фермент обнаруживается почти во всех клетках миелоидного ряда, начиная с миелобласта. В этом ряду наиболее богаты неспецифической эстеразой промиелоциты [Faines, Barker, 1964]. Наибольшая активность выявляется и в эозинофилах, но вне всякой связи с их специфической зернистостью, и в небольшом числе лимфоцитов, а также в ядерных клетках красного ряда, особенно на ранних стадиях созревания, в мегакариocyтах и тромбоцитах. Самую интенсивную реакцию на α -нафтилацетат-эстеразу дают моноциты и их предшественники, а также ретикулярные клетки. Эстераза моноцитов легко подавляется фторидом натрия в концентрации 1,5 мг/мл среды [Fischer, Schmaizi, 1964]. Этот феномен позволяет отличить моноциты, их предшественники и патологически измененные формы от сходных по морфологии клеток, обладающих активностью неспецифической эстеразы.

С помощью электрофореза было выделено 9 фракций НЭ, из них 1 и 2 при цитохимических исследованиях определяются с субстратом α -нафтил-AS ацетатом. Этот изофермент определяется, главным образом, в гранулоцитах, устойчив к воздействию фторида натрия. Другие фракции (3, 4 и 6) специфичны для клеток, реагирующих с α -нафтилбутиратом (БЭ), а 5 - с α -нафтилацетатом (АЭ). Высокая активность двух последних изоферментов наблюдается в моноцитах и тормозится в присутствии фторида натрия. В макрофагах активность НЭ также высокая, но не чувствительна к ингибированию.

Кроме того, АЭ (фракция 5) в значительном количестве содержится в мегакариocyтах и тромбоцитах, в противоположность БЭ. В Т-лимфоцитах выявляются 2 и 6 фракции НЭ, устойчивые к фториду натрия. Продукт реакции располагается в цитоплазме клеток в своеобраз-

разной форме в виде крупных гранул [Braunstein H., 1963; Schmakl F., 1968; Kass L., 1979; Noack S., 1984; Pertel J., 1984; Cahn P., 1987; Дульцина С.М. 1986].

Таким образом, хотя реакция носит название неспецифической, использование α -нафтил-AS-ацетата, α -нафтилацетата и α -нафтилбутирата в качестве субстратов с ингибированием фторидом натрия, выявляет "специфический" маркер, свойственный только клеткам моноцитарного ряда (табл. 12).

Сравнение полуколичественных показателей в единицах Карлов активности АЭ и БЭ в клетках крови и костного мозга свидетельствует об определенных различиях в спектре изоэнзимов клеток в пределах одного гемопозитического роста [Френкель М.А., 1998]. Эта особенность эстераз может быть использована в диагностических целях. В молодых элементах гранулоцитарного ряда содержание обоих ферментов близко. По мере дифференцировки в зрелых гранулоцитах активность БЭ сохраняется, а АЭ достоверно снижается, поэтому выявление в периферической крови нейтрофилов с высоким содержанием АЭ свидетельствует об омоложении состава нейтрофильного пула. Для лимфоидных клеток и элементов красного ряда в норме характерна более высокая активность АЭ, чем БЭ, первый изофермент определяется в 96% лимфоцитов, второй - лишь в 3%. Самое большое содержание АЭ среди всех костномозговых элементов отмечается в мегакариocyтах, хотя показатели БЭ также высокие, но они достоверно ниже АЭ (табл. 13).

Цитохимические особенности нормальных клеток гемопоэза в определенной степени выявляются и в лейкоэмических элементах. Высокая активность НЭ (АЭ к БЭ), ингибируемая фторидом натрия, позволяет установить моноцитарную принадлежность бластных клеток при гемобластозах. Повышение содержания АЭ в клетках эритроидного ряда связано с нарушением в них метаболических процессов, наблюдаемых при пернициозной и железодефицитной анемиях, а также при эритромиелозе. Обнаружение четких гранул АЭ в лейкоэмических элементах при лимфопролиферативных заболеваниях дает основание заподозрить Т-лимфоидную природу опухоли. Патологическая пролиферация одноклеточных мегакариocyтов в костном мозге четко выявляется при окрашивании препаратов на АЭ.

Двойная эстераза. Проведение последовательно на одном мазке исследования на хлорацетат-эстеразу, а затем на АЭ дает возможность выявить клетки с двойной потенцией к дифференцировке по гранулоцитарному и моноцитарному рядам [Хейхоу Ф., 1983; Яворковский

Таблица 12

Активность неспецифических эстераз в нормальных клетках крови и костного мозга

Клетки/ферменты	АС	АС-АЭ +NaF	АЭ	АЭ +NaF	БЭ	БЭ +NaF
Миелобласты	-	-	+	+	-	-
Промиелоциты	+	+	+	+	+	+
Миелоциты	++	++	+	+	+	+
Метамиелоциты	++	++	+	+	+	+
Палочкоядерные нейтрофилы	++	++	+	+	+	+
Сегментоядерные нейтрофилы	++	++	-	+	+	+
Эозинофилы	+	+	+	+	-	-
Базофилы	+	+	+	+	-	-
Т-лимфоциты (хелперы)	-	-	++	++	+	+
Т-лимфоциты (супрессоры)	-	-	-	-	-	-
В-лимфоциты	-	-	-	-	-, +	-, +
Плазмочиты	+, ++	+, ++	+	+	-	-
Моноциты	++	-	+++	-	+++	-
Мегакариоциты	+++	+++	+++	++	-	-
Тромбоциты	++	++	-	-	-	-
Нормобласты	+	+	-	-	-	-

Примечание. АС - α -нафтил-АС-ацетат-эстераза, АС-АЭ +NaF - реакция после ингибирования фторидом натрия, АЭ - α -нафтилацетат-эстераза, АЭ +NaF - реакция после ингибирования фторидом натрия, БЭ - α -нафтилбутират-эстераза, БЭ +NaF - реакция после ингибирования фторидом натрия.

Л.И., 1987]. Подобные наблюдения касаются бластных клеток при миеломонобластном лейкозе, "миеломоноцитов" при миелодиспластических синдромах.

Реакция на *кислую неспецифическую эстеразу* (КНЭ). Это - изофермент АЭ, выявляемый в реакции с субстратом α -нафтилацетатом в кислой среде при Ph 5,8. Он определяется в большинстве Т-хелперов в форме компактной гранулы и отсутствует в Т-супрессорах и В-лимфоцитах. Реакция может быть использована для характеристики бластов при Т-ОЛЛ, лейкомиических лимфоцитов при Т-лимфопролиферативных заболеваниях и клеток волосатоклеточного лейкоза. В последнем случае КНЭ располагается в цитоплазме мелкогранулярно в виде полумесяца вокруг ядра [Kulenkampf J., 1977; Knowless D., 1979; Smith H., 1977; Потапова С.Т., 1981].

Хлорацетат-эстераза, как и миелопероксидаза, является маркером клеток миелоидного ряда. Активность этого фермента может выявляться уже в миелобластах, особенно зернистых. У больных с агранулоцитозом в период выхода из этого состояния появляются клетки - предшественники миелоидного ряда, выделяемые из присутствующих в мазке лимфоидных элементов лишь по положительной активности хлорацетат-эстеразы, отличающей их от иных лимфоидных клеток; продукт реакции мелкозернистый. Активность этой эстеразы в клетках-предшественниках миелоидного ряда на выходе из агранулоцитоза выявляется раньше, чем активность миелопероксидазы.

По данным одних авторов, в физиологических условиях активность хлорацетат-эстеразы в клетках гранулоцитарного ряда возрастает по мере созревания клеток [Rosenszain et al., 1968;

Таблица 13

Сравнение активности АЭ и БЭ в нормальных клетках крови и костного мозга (ед. Karlow $\bar{X} \pm m$)

Клетки	АЭ	АЭ+NaF	БЭ	БЭ+NaF	p*
Молодой нейтрофил	50,5 $\pm$ 7,4	27,8 $\pm$ 3,7	55,3 $\pm$ 8,9	45,6 $\pm$ 10,5	>0,05
Зрелый Нейтрофил	23,4 $\pm$ 4,8	13,8 $\pm$ 4,2	44,7 $\pm$ 6,4	35,6 $\pm$ 9,9	>0,05
Эозинофил	0	0	0	0	
Моноцит	240,0 $\pm$ 14,8	0	192,0 $\pm$ 15,2	0	>0,05
Лимфоцит	60,1 $\pm$ 7,8	29,2 $\pm$ 5,7	27,4 $\pm$ 6,8	22,9 $\pm$ 5,6	<0,02
Нормобласт	106,8 $\pm$ 18,6	89,8 $\pm$ 9,5	3,6 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 0,4	<0,001
Мегакариоцит	285,6 $\pm$ 8,4	285,0 $\pm$ 7,9	187,5 $\pm$ 14,7	123,0 $\pm$ 17	<0,001

Примечание. * - p - достоверность различий при сравнении показателей АЭ и БЭ до ингибирования флюоридом натрия. Обозначения см. в табл. 12.

Schmaizi, Braunsleiner, 1968]. По данным других исследователей [Руденс Ю. Ф., Буйкис И. М., 1971, и др.], в системе миелобласт - промиелоцит активность этого фермента меняется скачкообразно, и в результате промиелоцит оказывается клеткой с наиболее высокой ферментативной активностью в миелоидном ряду. Высокая активность присуща и последующим генерациям клеток этого ряда, хотя она и имеет общую тенденцию к снижению. Основная масса зрелых нейтрофилов богата этой эстеразой, но встречаются клетки с умеренной и низкой активностью фермента.

Moloney с соавт. (1960) обнаружили активность хлорацетат-эстеразы и в ретикулярных клетках, причем ее активность вполне сопоставима с активностью в нейтрофилах. Слабой ферментативной активностью обладают эозинофилы и моноциты. Следы активности могут определяться и в лимфоцитах (при гистохимической реакции в виде единичных крупных, слабо окрашенных гранул).

Лизоцимы, как и β -глюкуронидазы, по механизму действия относятся к **гликозидазам**. Лизоцимы расщепляют гликозидные связи мукополисахаридов оболочек некоторых микробов. На этой особенности основаны методы выявления этих биологически активных веществ в клетке. Лизоцимы обнаружены во всех биологических жидкостях, во многих органах и тканях, в разнообразных клетках, в том числе в лейкоцитах, главным образом в моноцитах [Asamer et al., 1969]. Существует параллелизм между зрелостью моноцита и содержанием в нем мурамидазы [Asamer et al., 1971a]. Лизоцим для моноцитов - своего рода маркер, хотя имеются доказательства присутствия этих ферментов и в клетках нейтрофильного ряда, причем в зрелых нейтрофилах активность мурамидазы может быть на таком же уровне, как и в моноцитах [Briggs et al., 1966; Ohta, Osseman, 1972].

Углеводы. Для обнаружения соединений углеводной природы в клеточных элементах костного мозга и периферической крови используют ШИК-реакцию в сочетании с серией контрольных исследований. Поскольку разнообразные соединения углеводной природы дают положительную реакцию с реактивом Шиффа после окисления йодной кислотой, возникает необходимость идентифицировать эти соединения. Для этого препараты предварительно обрабатывают амилазой, тестикулярной и бактериальной гиалуронидазой по Lillie (1954); параллельные срезы окрашивают основными красителями тиазиновой группы при различных значениях pH для выявления способности обнаруживаемых соединений индуцировать метакромазию; часть препаратов окрашивают альциановым синим по Spicer с со-

авт. (1960), основным коричневым по Шубину (1961); наконец, производят мягкое и жесткое метилирование по Spicer, Lillie (1969) и т. д. С помощью перечисленных реакций в клетках крови и костного мозга удалось идентифицировать гликоген, кислые (сульфатированные и несulfатированные) мукополисахариды, гликолипиды и др.

Гликоген в лейкоцитах человека впервые обнаружил Neukirch (1910) при окраске мазков крови бест-кармином. Наиболее богаты гликогеном клетки гранулоцитарного ряда. Он выявляется уже в миелобластах, хотя далеко не всегда. По мере созревания клеток этого ряда содержание гликогена в них закономерно возрастает. При гистохимическом исследовании он выявляется в виде малиновых гранул, густо заполняющих цитоплазму зрелых нейтрофилов. Нередко такие гранулы определяются на фоне диффузного закрашивания цитоплазмы, исчезающего после обработки мазков амилазой, что свидетельствует о гликогеновой природе диффузно распределяющегося материала. Диффузное окрашивание цитоплазмы при ШИК-реакции (шифф-йодная кислота, PAS-реакция) обычно свойственно наиболее молодым клеткам гранулоцитарного ряда (промиелоцитам, миелоцитам).

Биохимическими методами показано, что ШИК-реакция лейкоцитов обусловлена не только присутствием гликогена [Otsson, Dalquist, 1967]. В специфической зернистости лейкоцитов эти авторы обнаружили соединение, быстро реагирующее с реактивом Шиффа после окисления периодной кислотой и легко удаляющееся при экстракции липидов. Полагают, что это гликолипид.

Агранулоциты костного мозга и периферической крови обычно либо лишены гликогена, либо содержат незначительное количество этого углевода, который выявляется в виде немногочисленных и некрупных, но хорошо контурированных гранул, что особенно свойственно лимфоцитам. Нормальные лимфобласты еще реже, чем зрелые лимфоциты, содержат гранулы гликогена. В моноцитах гликоген чаще всего выявляется в виде мелкой пылевидной зернистости. В этих клетках возможно и не очень интенсивное диффузное окрашивание цитоплазмы при ШИК-реакции. Азурофильные гранулы моноцитов и лимфоцитов, как правило, дают положительную ШИК-реакцию, однако они сохраняют эту способность и после обработки препаратов амилазой, что свидетельствует об их углеводной, но не гликогеновой природе. От 10 до 40% лимфоцитов периферической крови дают положительную ШИК-реакцию с 1-2 рядами перинуклеарных гранул.

Различия в характере локализации в клетках ШИК-положительного продукта в миелоидных и лимфоидных клетках нашли свое объяснение в особенностях углеводного обмена. В миелоидных клетках процессы дыхания идут по типу аэробного гликолиза, в лимфоидных - анаэробного, что и определяет специфичность окрашивания морфологических структур клеток [Сейц И.Ф., 1963].

Эозинофильные лейкоциты содержат небольшие количества гликогена, располагающегося между специфическими гранулами и выявляющегося в виде диффузного окрашивания. О присутствии этого соединения в базофилах ничего определенного сказать нельзя, поскольку ШИК-позитивный материал их гранул легко растворим в воде, в связи с чем реакция с амилазой и оценка ее результатов затруднены, хотя Hayhoe, Quaglini (1980) считают доказанным, что гранулы базофильных лейкоцитов не содержат гликогена. ШИК-реакция их гранул обусловлена присутствием мукополисахаридов и фосфолипидов.

Практическое значение ШИК-реакции заключается в возможности различия бластов миелоидной и лимфоидной природы при гемобластозах. В первых обнаруживается диффузное окрашивание цитоплазмы, а для вторых характерен гранулярный характер реакции. Исключение составляют эритрокарициты при эритромиелозе, в ранних предшественниках ШИК-положительное вещество может располагаться в виде гранул, в более зрелых - диффузно [Quaglini D., 1959, 1960].

Кислые мукополисахариды. В состав цитоплазматических гранул клеток нейтрофильного ряда входят и кислые мукополисахариды. Основным компонентом мукополисахаридов, синтезируемых лейкоцитами периферической крови, является хондроитин-4-сульфат [Olsson, 1968; Olsson, 1968, 1969]. Наибольшие количества кислых мукополисахаридов синтезируют незрелые миелоидные клетки [Olsson, 1968; Lau., 1970]. М.Ф. Харченко (1969) в лейкоцитах здоровых людей обнаружил и несulfатированные мукополисахариды.

Кислые мукополисахариды, обнаруживаемые в азурофильных гранулах молодых гранулоцитов, обуславливают их способность индуцировать β -метахромазию при окраске основными красителями тиразиновой группы при довольно высоких значениях pH (4,5 и 5,0). Однако зернистость этих клеток не окрашивается ни альциановым синим, ни основным коричневым.

Биохимические исследования гранул клеток нейтрофильного ряда показали, что в их состав входят гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат и гепаринмоносульфат [Chocha et al. 1973]. Гепаринмоносульфат составляет около 20%

всех углеводов. Гранулы базофильных лейкоцитов, как и тучных клеток, богаты кислыми сульфатированными мукополисахаридами, главным образом гепаринмоносульфатом [Radden et al. 1962]. Эти соединения обуславливают способность гранул базофилов и тучных клеток индуцировать интенсивную гамма-метахромазию при окраске основными красителями тиразиновой группы, которая утрачивается при мягком метилировании. Эти гранулы обладают и выраженным сродством к альциановому синему и основному коричневому.

Липиды. Изучение клеток периферической крови и костного мозга гистохимическими и биохимическими методами показало, что все лейкоциты, за исключением лимфоцитов и клеток красного ряда, содержат смесь разнообразных липидов. Среди них удается идентифицировать нейтральные жиры, жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин в свободной и связанной форме. Около 50% всех липидов, выявляемых в цитоплазме лейкоцитов, составляют фосфолипиды. Основная масса липидов лейкоцитов связана с клетками гранулоцитарного ряда [Bharagwaj, Soshi et al. 1971]. Они входят в состав специфической зернистости нейтрофильных лейкоцитов и эозинофилов. Существует прямая зависимость между содержанием липидов в цитоплазме и зрелостью клетки. Ощутимые количества липидов определяются уже в промиелоцитах. Только в молодых базофилах специфическая зернистость содержит больше липидов, чем в зрелых клетках. Гистохимически липиды определяются и в моноцитах, и в макрофагах, и в ретикулярных клетках. Однако эти клетки содержат значительно меньше липидов, чем клетки нейтрофильного ряда. Более низкий уровень липидов в этих клетках обусловлен как меньшим числом жировых включений, так и их небольшими размерами. В моноцитах липидные включения выявляются иногда в виде пылевидной зернистости с тенденцией к концентрации в перинуклеарной зоне; распределение липидов в этих клетках совпадает с распределением пероксидазы (табл. 14).

Таким образом, основная масса соединений, определяемых гистохимически в лейкоцитах здоровых людей, обнаруживается, главным образом, в клетках нейтрофильного ряда и моноцитах. Наблюдается определенная закономерность: первые гистохимические признаки ряда появляются на стадии миелобласта, содержащего азурофильную зернистость; качественный и количественный скачок происходит на стадии промиелоцита. Эта клетка в гистохимическом отношении оказывается наиболее яркой. Дальнейшие изменения гистохимической характеристики клетки зависят от ее зрелости. Моноциты обладают практически тем же набором фер-

ментов, углеводов и липидов, что и клетки нейтрофильного ряда. Отличия между ними, не считая морфологических, в основном количественные.

Лимфоциты - самые «бедные» в гистохимическом отношении (только по рассмотренным соединениям) клетки. Небольшая часть этих клеток содержит лишь выявляемые гистохимически гликоген (в небольших количествах), КФ и кислую α -нафтилацетат-эстеразу, а также β -глюкуронидазу. В них никогда не определяется активность пероксидазы, они не содержат липидов; вместе с тем, положительная реакция на КФ и кислую α -нафтилацетат-эстеразу и тип реакции на эти ферменты позволяют разграничить различные виды лимфоцитов.

Основные гистохимические особенности лейкоцитов костного мозга и периферической крови здоровых людей представлены в табл. 14, где показано и изменение этих особенностей в зависимости от зрелости клеток.

Помимо рассмотренных соединений, в гематологии за последние годы довольно широкое распространение получило исследование распределения белков, разнообразных аминокислот, некоторых специфических фосфатаз (5'-нуклеотидазы, ДНКазы, РНКазы и др.) и представителей трансглюкозидаз, протеолитических ферментов, дегидрогеназ и т. д. Однако значение содержания этих соединений для идентификации клеток крови еще нуждается в дальнейшем изучении. Вместе с тем, ряд перечисленных соединений, главным образом специфических фосфатаз, оказались пригодными для разграничения в ряде случаев клеток метастазов низкодифференцированных вариантов рака в костный мозг и лимфатические узлы и опухолево измененных клеток, этих органов, а также сходных по морфологии с раковыми клетками молодых форм, клеток паренхимы, стромы костного мозга и лимфатических узлов.

Накопленные к настоящему времени данные по идентификации опухолево измененных эпителиальных клеток, утративших морфологическую органоспецифичность, немногочисленны. Более того, использованные подходы не выявили строго специфичных для раковых клеток особенностей, хотя необходимо отметить, что, например, характер гистохимических реакций, использованных для разграничения «пришлых» клеток и клеток паренхимы и стромы кроветворного или лимфоидного органа, активность их протекания, отношение к ингибиторам и активаторам, субстратная специфичность для некоторых ферментов, реакция среды для их выявления все же позволяют в ряде случаев идентифицировать раковые клетки среди клеток органов кроветворения [Глузман Д. Ф., 1978].

Опухолевые клетки метастазов различных вариантов рака желудочно-кишечного тракта, бронхов, шейки матки и других локализаций, с одной стороны, дают те же гистохимические реакции, что и паренхиматозные и стромальные клетки кроветворных органов, а именно: реакцию на гликоген, α -нафтилацетат-эстеразу, КФ, ДНКазу нейтральную и кислую, РНКазу кислую и щелочную, 5'-нуклеазу и т. д., с другой стороны, интенсивность всех этих реакций, как правило, гораздо выше в эпителиальных клетках, чем в лимфоидных и ретикулярных. Вместе с тем, активность α -нафтилацетат-эстеразы в эпителиальных клетках не тормозится фторидом натрия. Это делает их сходными с ретикулярными клетками. Тартрат, напротив, тормозит активность КФ в раковых клетках, как и в лимфоидных элементах.

Однако установлено, что содержание одного и того же соединения и активность одного и того же фермента в раковой клетке весьма различны. Это делает картину очень пестрой: одни клетки обладают очень высокой активностью какого-то фермента, другие - только умеренной, но она

Таблица 14

Цитохимические реакции в нормальных клетках крови и костного мозга

Клетки/ферменты	Пероксидаза	Судан черный	ХАЭ	ШИК
Миелобласты	+	+	+	+
Промиелоциты	+++	+++	+++	+
Миелоциты	+++	+++	+++	+
Метамиелоциты	+++	+++	+++	+
Палочкоядерные нейтрофилы	+++	+++	+	+
Сегментоядерные нейтрофилы	+++	+++	+	++
Эозинофилы	+++	+++	+	++
Базофилы	+	+	+	+
Лимфоциты	-	+	-	+, -
Плазмочиты	-	-	-	+
Моноциты	+, -	++	+, -	+, -
Мегакариоциты	-	-	-	++
Тромбоциты	-	-	-	++
Нормобласты	-	-	-	-

Примечание. ХАЭ - реакция на хлорацетат-эстеразу, ШИК - ШИК-реакция.

всегда выше, чем в окружающих клетках органа, куда метастазировали раковые клетки. Такая картина практически никогда не наблюдается в первичных опухолях кроветворных органов. Имеются данные [Глузман Д. Ф., 1978] о том, что щелочная фосфатаза характерна только для метастазов плоскоклеточного рака некоторых локализаций в лимфатические узлы, а конечный продукт реакции на кислую ДНКазу в раковых клетках локализуется не только в ядре, но и в цитоплазме, что отличает раковые клетки от исходных опухолево не измененных вариантов этих клеток и лимфоидных элементов. Специ-

фичным для раковых клеток считают и обнаружение высокой активности кислой РНКазы.

Таким образом, несмотря на отсутствие строго специфичных реакций для раковых клеток, обнаружение высокой активности α -нафтил-ацетат-эстеразы, не тормозимой фторидом натрия, КФ, тормозимой тартратом калия-натрия, высокой активности кислой РНКазы и выраженный полиморфизм этих гистохимических реакций среди морфологически однотипных клеток позволяют заподозрить в лимфатическом узле или костном мозге метастаз недифференцированного рака.

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ГЕМАТОЛОГИИ

С момента возникновения гематология была дисциплиной, изучающей клетки крови. В настоящее время такое определение уже недостаточно, так как существенная часть гематологии занята изучением молекулярных основ кроветворения. Возникшая в середине XX столетия новая дисциплина, молекулярная биология, быстро изменила наши представления о механизмах функционирования биологических систем вообще и кроветворной системы в частности. С открытием структуры ДНК как двойной спирали и ее генетической роли из биохимии быстро выделилась молекулярная биология как наука, изучающая механизмы функционирования молекул жизни - ДНК, РНК и белков.

Молекулярная биология использует исследования с рестриктазами - бактериальными ферментами, способными распознавать строго определенные участки ДНК и разрезать молекулу только по этим последовательностям. Использование рестриктаз дало возможность получать практически любые участки ДНК.

Большие количества ДНК, необходимые для анализа, позволили выделять после разработки методов клонирования ДНК в бактериях. С этой целью выбранный участок ДНК вводят вместе с геном резистентности к антибиотику в бактерии и наращивают их массу в среде с антибиотиком. При этом выживают только те бактерии, в которых включение ДНК (трансдукция) прошло успешно. Из массовой культуры выделяют любые количества интересующего фрагмента ДНК.

Были созданы методы автоматического анализа последовательности азотистых оснований в ДНК - секвенирование. Одновременно научились синтезировать искусственные гены в соответствии с установленным сиквенсом последовательности ДНК. Это дало возможность разработать метод специфического узнавания определенных участков ДНК в геноме путем синтеза

комплементарной последовательности к интересующему участку ДНК (такая последовательность получила название молекулярного зонда). Зонд специфически связывается только с той последовательностью ДНК, которой он комплементарен. Таким образом, если существует измененный ген, его можно обнаружить с помощью зонда. Молекулярные зонды, меченные флюоресцентным красителем или радиоактивным изотопом, очень широко используются для диагностики различных генетических, онкологических и гематологических заболеваний. При этом можно определить даже отдельные клетки, содержащие измененный ген. В этом случае легко можно видеть флюоресцирующий зонд в клетках (метод получил название FISH-гибридизация *in situ* с помощью флюоресцентного зонда). Сочетание молекулярно-биологического и цитологического подходов позволяет прямым образом определить клеточный субстрат того или иного заболевания крови.

Часто важно не только обнаружить измененный участок ДНК, но и определить его положение в хромосоме, т.е. в линейной последовательности ДНК. Это достигается с помощью метода Саузерн-гибридизации. ДНК разрезают соответствующими рестриктазами и разделяют электрофорезом, после чего переносят разделенную ДНК на мембрану. Последняя гибридизуется с зондом, положение которого (т.е. участка ДНК, с которым он гибридизовался) устанавливается экспозицией с высокочувствительной фотопленкой. Такие фотографии (блоты) позволяют точно определить, какие места на ДНК соответствуют использованному зонду. Метод используют для определения клональной природы заболеваний, числа клеток крови, дифференциальной диагностики опухолей и т.д.

Ключом к успешной терапии заболеваний крови является раннее их определение. Методы

молекулярной биологии повысили чувствительность выявления злокачественных клеток в сотни тысяч раз. Это стало возможным с развитием метода ПЦР. Принцип метода заключается в многократном удвоении искомого участка ДНК, характеризующего, например, пораженную клетку, наличие микроорганизмов, вирусов и т.д. При этом методе синтезируются короткие зонды-праймеры (18-30 нуклеотидов), фланкирующие 5 и 3 концы антипараллельных цепей интересующего участка ДНК. Выделенная из клеток данного больного суммарная ДНК инкубируется с праймерами и всеми необходимыми для синтеза ДНК компонентами в специальном приборе, позволяющем провести несколько десятков циклов синтеза ограниченного праймерами участка ДНК. Так как синтез происходит не только на исходной ДНК, но и на образующихся копиях, увеличение числа наработанных копий происходит в геометрической прогрессии и за несколько десятков циклов изучаемый фрагмент ДНК амплифицируется в миллионы раз, таким образом, что при электрофорезе его даже можно видеть без специального маркирования. Метод ПЦР получил широкое распространение для выявления, например, остаточной болезни, при которой содержание патологических клеток всего 1×10^5 . Чувствительность метода настолько высока, что удается определить наличие изменений даже в одной индивидуальной клетке.

Этот комплекс рутинно используется в современных клиниках для диагностики и оценки результатов лечения различных гемопатий. С другой стороны, молекулярно-биологические подходы позволяют выявить, какие конкретные гены и их комбинации поражены и функционируют ненормально при той или иной патологии. Использование таких подходов позволяет гематологам весьма успешно определять все новые и новые механизмы развития опухолей.

Успехи молекулярной биологии не только резко повысили эффективность диагностики в гематологии, не только выявили интимные механизмы развития ряда гематологических заболеваний, последовательность активации генов при том или ином направлении дифференциров-

ки полипотентных кроветворных клеток, но и впервые позволили вплотную приблизиться к реальной генотерапии ряда наследственных заболеваний. Генотерапия включает в себя перенос в геном соматической клетки активного гена, который может быть как функциональным гомологом дефектного гена, так и каким-то не связанным с ним терапевтическим геном. Общая стратегия генотерапии заключается во введении необходимого гена в долгоживущие специфические клетки-мишени, которые могут корректировать дефект в течение всей жизни больного. Наиболее часто используют перенос гена в стволовые кроветворные клетки, в лимфоциты, макрофаги, а также и в некроветворные клетки (мышечные клетки, легочный эпителий, фибробласты, нейроны и др.). Основные заболевания - кандидаты для переноса терапевтических генов в стволовые кроветворные клетки представлены в табл. 15.

Таблица 15

Заболевания, при которых начато изучение генотерапии

1. СКИД: дефицит аденозин дезаминазы, X-связанный дефицит, дефицит ZAP70 киназы
2. Дефицит пуринов нуклеозид фосфорилазы (PNP)
3. X-связанная агаммаглобулинемия
4. Хронический гранулематоз
5. Синдром Вискот-Олдрича
Лизосомальные болезни накопления:
1. Болезнь Гоше, другие липидозы
2. Болезнь Хердера
3. Аденолейкодистрофия
4. Метахроматическая лейкодистрофия
Гемоглобинопатии:
1. Серповидно-клеточная анемия
2. Талассемия
Анемия Фанкони
Синдром приобретенного иммунодефицита

Впервые в истории медицины наука позволила установить окончательно истинную причину заболеваний, патологию на молекулярном уровне. Пожалуй, наиболее яркий пример - расшифровка механизмов развития хронического миелолейкоза.

ЧАСТНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

ГЕМОБЛАСТОЗЫ

Гемобластозами называют группу опухолей, возникших из кроветворных клеток. Опухолью мы называем плохо контролируемую организмом плюс-ткань, которая возникла из одной мутировавшей клетки; она не является следствием воспаления или накопления неметаболизированных продуктов. Гемобластоzy, при которых костный мозг повсеместно заселен опухолевыми клетками, называют лейкозами. В прошлом лейкоз нередко называли лейкемией (белокровие) по одному важному, но не обязательному признаку - появлению в крови опухолевых лейкоцитов. Однако употребление термина «лейкемия» вряд ли целесообразно, так как, во-первых, к лейкозам относятся опухоли, состоящие не только из лейкоцитов, но и из эритрока-

риоцитов и мегакариоцитов; во-вторых, само по себе появление в крови избытка лейкоцитов при лейкозе необязательно.

Кроме лейкозов, в группу гемобластозов входят внекостномозговые разрастания кроветворных клеток, чаще всего - гематосаркомы. Реже встречаются морфологически зрелоклеточные лимфоцитарные опухоли, представленные лимфоцитами и пролимфоцитами, мало или совсем не поражающие костный мозг. Опухолевые клетки этих опухолей могут со временем распространяться по системе кроветворения и вторично поражать костный мозг. На этом этапе часто уже невозможно клинически отличить гематосаркому от острого лейкоза, лимфоцитарную опухоль - от хронического лимфолейкоза.

ОБЩИЙ ПАТОГЕНЕЗ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

Поскольку кровь представляет собой главную транспортную систему организма, а кроветворные клетки даже в нормальных условиях присутствуют не только в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, но и в крови, то и опухолевые клетки, сохраняя эту особенность своих нормальных предшественниц, могут распространяться по системе кроветворения, ее органам в самом начале болезни. Эта специфическая особенность гемобластозов ведет к тому, что их клиническая картина, их анатомическая основа носят черты системного поражения и характеризуются весьма разнообразными признаками. Часть этих признаков непосредственно связана с обязательными проявлениями опухолей из кроветворных клеток, т.е. первична: вытеснение нормального кроветворения, заполнение кровеносного русла лейкозными клетками, их местные разрастания. В свою очередь эти решающие первичные признаки вызывают разнообразные вторичные изменения в организме, связанные с той или иной степенью уменьшения числа нормальных клеток в крови, угнетением их функций. Внешние проявления гемобластозов чаще вызваны своими вторичными проявлениями: одышка, сердцебиение при анемии, кровоточивость из-за нехватки тромбоцитов, инфекции в связи с агранулоцитозом и иммунодефицитом. Именно обилие вто-

ричных проявлений гемобластозов лежит в основе диагностических сложностей в начале болезни. Если опухоли из некроветворных клеток получают способность к метастазированию - переносу и имплантации в не свойственных им тканях - только в результате происходящих в опухолевых клетках изменений, обычно повторных мутаций, и в огромном большинстве не бывают первым признаком заболевания, если способностью к метастазированию, за редчайшим исключением, из них обладают лишь опухоли злокачественные, то клетки большинства опухолей из кроветворной ткани "умеют" метастазировать и будучи злокачественными, и доброкачественными, так как они обладают способностью к переносу и имплантации еще до того, как станут опухолевыми.

Многочисленные и разнообразные исследования гемобластозов показали, что вся опухолевая масса клеток является потомством одной мутировавшей клетки, т.е. является клоном.

Опухолевая прогрессия в патогенезе гемобластозов. Изучая поведение опухоли молочных желез мышей, Foulds (1949) выдвинул концепцию об опухолевой прогрессии. Основные правила заключаются в следующем: злокачественные новообразования в своем росте и развитии претерпевают ряд необратимых изменений, а возникающие в опухоли новые качест-

ва не связаны ни со скоростью ее роста, ни с ее величиной; при множественной опухоли прогрессия в разных очагах совершается независимо, также независимо происходит и изменение различных свойств одной и той же опухоли; в течение жизни больного прогрессия не всегда достигает конечной стадии своего развития; первая клиническая манифестация опухоли возможна на любой стадии прогрессии; прогрессия может иметь место как в растущих, так и латентных опухолях.

Общие положения опухолевой прогрессии были введены в лейкозологию А.И. Воробьевым в 1965 г.; затем эта теория разрабатывалась в ряде исследований [Воробьев А.И., Пяткин Е.К., 1967, 1968; Юргутис Р.П., 1968; Барташук Е.И., 1971; Шапот В.С., 1977; Воробьев А.И., Бриллиант М.Д., 1980]. Теперь представление об опухолевой прогрессии существенно отличается от первоначального следующими особенностями: во-первых, доказана клональность лейкозов человека, следовательно, прогрессия должна анализировать поведение особой группы клеток, возникших из одной клетки, т. е. первоначально строго однородных; во-вторых, показано, что в основе прогрессии лежит повышенная изменчивость лейкозных клеток, приводящая к появлению в рамках первоначального опухолевого клона новых мутантных клонов - субклонов; отбор которых и определяет изменчивость свойств опухоли.

Закономерности опухолевой прогрессии человеческих гемобластозов представлены рядом правил:

1. Гемобластозы, как правило, проходят две стадии: моноклоновую (доброкачественную) и поликлоновую - появление субклонов (злокачественную); однако смена стадий происходит с неодинаковой частотой при разных формах гемобластозов и с неодинаковым интервалом.
2. Важнейшей особенностью гемобластозов является угнетение нормальных ростков кроветворения, в первую очередь, нормального гомолога опухолевых клеток.
3. Закономерна смена морфологически зрелых клеток, составляющих опухоль при хронических лейкозах и лимфомах, бластными, определяющими развитие либо бластного лейкоза, либо лимфосаркомы.
4. Иммуноглобулинсекретирующая лимфатическая или плазматическая опухоль может потерять способность к секреции, что сопровождается качественными изменениями поведения опухоли и обычно ее бластной трансформацией, и наоборот.
5. Опухолевые клетки, прежде всего бласты, могут терять ферментную специфичность

цитоплазматических включений и становиться морфологически и цитохимически неидентифицируемыми.

6. Форма ядра и цитоплазмы бластных клеток претерпевает скачкообразные или постепенные изменения от круглой к неправильной и большей по площади (рис. 49).

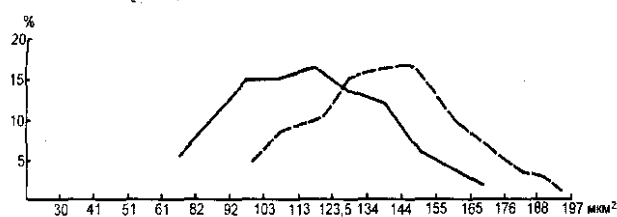


Рис. 49. Нарастание площади ядер бластных клеток.

При диагностировании острого лейкоза - сплошная линия; в рецидиве заболевания - пунктирная. На оси ординат - процент клеток, на оси абсцисс - площадь ядра.

7. Все внекостномозговые гемобластозы способны лейкемизироваться, т.е. метастазировать в костный мозг.
8. Метастазы гемобластозов вне органов кроветворения отражают появление нового, адаптированного к данной ткани субклона, метастазы ведут себя в разных органах независимо, нередко они имеют разную чувствительность к цитостатическим комбинациям.
9. В условиях современной цитостатической терапии появление резистентности опухоли к ранее эффективному лечению означает качественно новый этап ее развития; в рецидиве опухоль иногда вновь оказывается чувствительной к прежней цитостатической терапии, если пролиферируют клетки опухолевого клона, доминирующего до рецидива.

Лейкоз может последовательно проходить разные этапы прогрессии, но иногда болезнь начинается с симптомов, свойственных конечному этапу: с угнетения нормальных ростков кроветворения, образования опухолевых конгломератов из бластных клеток в разных органах или с резистентности к обычным цитостатическим препаратам. В связи с этим, в терапии всех лейкозов и вообще гемобластозов в определенном проценте случаев бывают неудачи уже на первых порах.

Принципы разделения злокачественных и доброкачественных опухолей системы крови. Для разделения злокачественных и доброкачественных опухолей системы крови критерием является наличие или отсутствие у гемобластозов свойств опухолевой прогрессии. Их отсутствие на протяжении длительного

периода опухолевого роста позволяет относить такой лейкоз или внекостномозговую опухоль из кроветворных клеток к категории доброкачественных, тогда как злокачественные опухоли кроветворной системы обнаруживают закономерности опухолевой прогрессии. Очень важным признаком является клинический динамизм злокачественных опухолей, с одной стороны, и монотонное течение без проявления качественных сдвигов при доброкачественных опухолях, - с другой.

Представленная здесь дифференциация двух типов опухолей системы крови до некоторой степени условна, так как одна и та же опухоль может быть и доброкачественной (хронические миелолейкоз и лимфолейкоз, эритремия на протяжении большей части болезни), и злокачественной (те же лейкозы в терминальной стадии, когда они трансформируются в острый лейкоз или саркому).

При всей условности разделения доброкачественных и злокачественных опухолей системы крови их терапия принципиально различна, следовательно, разделение необходимо.

Механизм угнетения нормального кроветворения при гемобластозах. Само по себе угнетение нормального гемопоэза при опухолях из кроветворных клеток является важнейшим звеном их патогенеза. По-видимому, нет какого-то одного механизма угнетения нормального кроветворения, таких механизмов может быть несколько. Известно, например, что угнетение эритроцитопоэза и гранулоцитопоэза при сублейкемическом миелозе может находиться в связи с постепенным вытеснением нормального микроокружения кроветворной ткани за счет фиброза костного мозга, индуцируемого лейкозными клетками. Этот частный механизм редко свойствен другим лейкозам. Культуральные исследования показывают [Домрачева Е.В. и др., 1980; Greenberg et al., 1982], что и сыворотка больных, и сами лейкозные клетки при разных формах оказывают и подавляющее, и стимулирующее влияние на рост культур как стромальных, так и кроветворных клеток.

Определенной форме гемобластоза свойствен довольно специфический эффект либо стимуляции, либо подавления, не всегда зависящий от стадии и особенностей процесса в момент исследования. Одни исследователи предполагали механическое вытеснение лейкозными клетками нормальных (проблема «занятого места»), другие [Шапот В.С., 1963; Васильев Ю.М., Маленков А.Г., 1968] искали причину явления в конкуренции за питание нормальной и патологической групп клеток. Не отрицая возможности и первого, и второго механизма, необходимо отметить специфичность

этого феномена при лейкозах, когда между распространенностью опухолевых клеток в костном мозге и угнетением нормальных ростков нет отчетливой связи. Особенно ярка картина угнетения нормальных ростков на фоне малого распространения лейкозных клеток при так называемых предстадиях острого лейкоза, когда глубокой панцитопенией сопровождается появление отдельных небольших групп бластных клеток в костном мозге (чаще всего это предстadium острого эритромиелоэза, миелобластного или миеломонобластного лейкоэза), или при мало-процентной форме острого лейкоэза.

Роль апоптоэа в лейкоэогенезе. Термин "апоптоэ" (от герческого - "опадение" листьев) был введен в 1972 г J.F.R. Kerr с соавт. для обозначения своеобразного механизма и морфологии гибели клетки, отличного от некроэа. При некроэе клетка разбухает, ее мембрана разрушается, лизосомальные ферменты выходят наружу, развивается воспаление. При апоптоэе клетка сморщивается, хроматин конденсируется и фрагментируется, образуя апоптотические тельца, и без воспалительной реакции остатки клетки фагоцитируются. Процесс гибели клеток по механизму апоптоэа непрерывно совершается в центрах фолликулов лимфоузла, в костном мозге, направляя без воспалительных реакций на переваривание в фагоцитах невоэребованные клетки. В настоящее время изучены биохимические основы апоптоэа. В частности, изменения ядра связаны с активацией специфической эндонуклеазы, разрезающей ДНК на фрагменты. Изучены механизмы распознавания макрофагами апоптотических клеток, цитоплазматическая мембрана которых претерпевает специфические изменения.

Принципиальное значение имеет генетическая регуляция апоптоэа. Существует система генов, "отправляющих" клетку в апоптоэ, и система генов, препятствующих этому процессу. К первым относится прежде всего ген p53. Его нормальный ("дикий") тип обеспечивает апоптоэ клеток, подвергшихся действию ионизирующей радиации, ряда цитостатиков (доксорубицин, 5-фторурацил, этопозид и др.). В доброкачественных опухолях резко преобладают клетки с "диким" типом p53. В то же время в злокачественных опухолях - много клеток с мутантными формами гена p53. Первичная резистентность опухоли к действию ионизирующей радиации, цитостатикам связана с частыми мутациями гена p53. Возникновение резистентности к цитостатической терапии хронического миелоза в терминальной стадии сопровождается появлением клеток с мутантным типом гена p53.

Противоположным действием, останавливающим апоптоэ, обладает ген bcl-2. Он был

выявлен при анализе клеток центрофолликулярной лимфомы с транслокацией 14;18 - t(14;18). Продукт гена bcl-2 - фосфопротеин с массой 26 кД, располагающийся в мембране митохондрий, перинуклеарном эндоплазматическом ретикулуме, ядерной оболочке, подавляет апоптоз, вызванный действием ионизирующей радиации, цитостатиков, лишением ростовых факторов. Ген bcl-2 обеспечивает выживание клеток в отсутствие ростовых факторов, не снижая митотической активности. Повышение активности гена bcl-2 в центрофолликулярной лимфоме обусловлено транслокацией 14;18. В дальнейшем был обнаружен целый ряд генов, функционально аналогичных гену bcl-2.

Таким же эффектом обладает химерный ген BCR-ABL, появляющийся в результате транслокации 9;22 - t(9;22) - при хроническом миелолейкозе. Опухолевые клетки этого лейкоза очень редко делятся, но долго живут, именно таким путем обеспечивая себе преимущество в борьбе с нормальным гемопоэзом.

Участие механизма апоптоза в онкогенезе может реализовываться как по линии блокады клеточной гибели и придания мутировавшим клеткам "бессмертия", так и по линии нарастания степени злокачественности за счет появле-

ния новых мутантных (в частности, анеуплоидных) субклонов, которые в обычных условиях должны отправляться в апоптоз. Первый вариант может быть реализован геном bcl-2, второй - мутацией гена p53.

Сам по себе большой фактологический материал, связанный с апоптозом, не поколебал основных закономерностей онкогенеза, опухолевой прогрессии. Однако в клиническом и морфологическом разделении опухолей на доброкачественные и злокачественные, в понимании внезапно развивающейся или с самого начала имеющейся устойчивости опухоли к цитостатикам и действию ионизирующей радиации появилось молекулярное объяснение. Оказалось, и это имеет важнейшее значение в развитии цитостатической терапии, что гибель опухолевых клеток под действием цитостатических воздействий, в основном, опосредована через механизм апоптоза. Его срыв, в частности, в результате появления, а затем и отбора в среде опухолевых клеток мутантного по гену p53 субклона, делает опухоль нечувствительной к терапии. Именно механизм апоптоза может объяснить положительный противоопухолевый эффект малых доз радиации (например, в лечении ХЛЛ), малых доз цитостатиков.

ЭТИОЛОГИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ ЧЕЛОВЕКА

В основе опухолевого роста всех гемобластозов лежит клональность: каждый лейкоз, каждая гематосаркома или лимфоцитомы всей массой своих клеток обязаны мутации в их родоначальной одной клетке. Казалось бы причина гемобластозов должна быть очевидной: мутации являются следствием действия на клетку мутагенных факторов, поэтому можно ждать увеличения частоты лейкозов при интенсификации мутационных воздействий. Однако подобный вывод справедлив лишь для некоторых лейкозов, для лимфосарком. Острые лейкозы, хронический миелолейкоз, миеломная болезнь, лимфосаркомы встречаются чаще при нарастании действия (дозы) ионизирующей радиации, химических мутагенов (например, цитостатических препаратов). Но мутагены заметно не влияют на частоту хронического лимфолейкоза, лимфоцитом, сублейкемического миелоидоза, эритремии.

Роль ионизирующей радиации в увеличении частоты хронического миелоидоза, острых лейкозов, лимфосарком и миеломной болезни была доказана при изучении последствий взрыва атомных бомб в Хиросиме и Нагасаки, при наблюдении за последствиями облучения с лечебной целью (лучевая терапия по поводу

спондилёза, облучение головы для эпиляции). Минимальную дозу однократного облучения, которое вело к удвоению частоты лейкозов по сравнению с контрольной группой, составляет 20-40 рад (0,2-0,4 Гр). Нет никаких доказательств безвредности меньших доз облучения с позиций лейкозогенеза, хотя на том же японском опыте доказана роль меньших доз в развитии микроцефалии у ребенка при его внутриутробном облучении на 2-3-м месяце беременности. Вместе с тем, и нет никаких доказательств лейкозогенного эффекта доз ниже указанного относительного порога.

Наряду с дозой, существенную роль в онкогенезе играет и мощность облучения, т.е. количество энергии в единицу времени. Повреждающий эффект растет по мере увеличения мощности. Например, при образовании критической массы в реакторе мощное излучение длится доли секунды. Смертельную дозу при этом составляют примерно 600 рад (6 Гр), так как этого вполне достаточно для необратимого уничтожения кроветворной системы человека. При растянутом во времени облучении, допустим, для подготовки к трансплантации костного мозга, аналогичный эффект достигается при суммарной дозе 1200 рад (12 Гр). Поэтому ап-

приорное утверждение о неизбежном значительном увеличении частоты лейкозов во всей популяции населения Чернобыльского региона ошибочно. Нет доказательств лейкозогенных эффектов облучения в Чернобыльской катастрофе для лиц, которые подвергались действию радиации в суммарной дозе 20-60-80 рад (0,2-0,6-0,8 Гр) на протяжении многих недель, т.е. облучались при очень низких мощностях доз. Ясно, что повреждающий эффект будет возрастать по мере сокращения времени, в течение которого человек облучался. Поэтому можно искать увеличения частоты лейкозов у ликвидаторов, которые облучались однократно вблизи от мощных источников, в той группе населения, где дозы облучения составляли более 40-80 рад (0,4-0,8 Гр). Безрезультатным является подсчет лейкозов во всей популяции облученного населения зоны выпадения радиоактивных изотопов независимо от дозы и ее мощности.

Индукцированные радиацией лейкозы преимущественно возникают в той возрастной группе, где они преобладают и в контроле: острый лимфобластный лейкоз - у облученных детей, хронический миелоз, острый миелобластный лейкоз - у взрослых. Довольно редко регистрируются специфические радиационные маркеры клона лейкозных клеток. Они наблюдались в клетках острого лейкоза, возникшего у больных эритремией после терапии их радиоактивным фосфором, зарегистрирована маркерная хромосома у больной острым лейкозом, облученной в дозе около 60 рад (0,6 Гр) в Чернобыльской катастрофе.

Среди опухолей некровавой природы в связи с Чернобылем наблюдается резкий подъем частоты рака щитовидной железы у детей, зарегистрированный вначале в Гомельской, а затем и в Брянской областях. Эффект этот был вполне ожидаемым, он обусловлен высокой дозой облучения железы за счет инкорпорации радиоактивного йода.

Аналогичную роль в лейкозогенезе играют и химические мутагены, прежде всего, цитостатические препараты: мустарген, циклофосфан, лейкеран (хлорбутин), мелфалан, азатиоприн, миелосан (единичные сообщения), метотрексат, 6-меркаптопурин, этопозид и др. Особенно высокую частоту индуцированных лейкозов наблюдали в группе больных лимфогранулематозом, которых облучали с одновременным применением мустаргена: вторичные лейкозы в этой группе наблюдались в сотни раз чаще, чем в случае раздельного использования этих лечебных средств при интервале между химиотерапией и облучением не менее месяца.

Значению вирусов в возникновении лейкозов посвящена обширная литература. Однако каких-

либо признаков прямого вирусного переноса лейкоза от больного к здоровому, эпидемиологических свидетельств такой возможности нет. Можно с большой долей вероятности говорить о роли вируса Эпштейна-Барра в развитии лимфомы Беркитта, вируса HTLV-1 в возникновении особой формы лимфатического лейкоза. Однако мутационная природа лейкоза, его клональность - возникновение из одной мутировавшей клетки - при этом не меняются. Вирус выступает в роли стимулятора повышенной частоты деления в среде клеток, из которых после мутации развивается лейкоз.

Роль наследственности, как и роль ранее обсуждавшихся этиологических факторов, весьма велика применительно к конкретным формам опухолевого роста. Достаточно часто встречается наследование в группе сублейкемический миелоз-эритремия. Нередко среди родственников этих больных (наследование обычно - по доминантному типу) встречается и острый миелобластный лейкоз. В группе хронических зрелоклеточных лимфатических опухолей (хронический лимфолейкоз, лимфоцитоз, волосатоклеточный лейкоз) достаточно часто встречаются случаи наследования как по доминантному, так и по рецессивному типу. Кроме того, в этой группе могут наблюдаться случаи лимфобластного острого лейкоза, лимфосаркомы. Практически не встречаются случаи наследования хронического миелоидоза.

Специфическая роль наследственности выступает при генетических дефектах конкретного ростка кроветворения. При наследственных нейтропениях (поражен гранулоцитарный росток) существенно чаще наблюдаются случаи острых миелобластных лейкозов, хронического миелоидоза. При наследственных дефектах иммунной системы несколько выше частота лимфо-пролиферативных опухолей (опухолей иммунокомпетентной системы). Повышена частота лейкозов - острых миелобластных, хронического миелоидоза - среди больных с дефектами хромосом (синдромы Дауна, Клайнфельтера и др.) или страдающих их повышенной ломкостью (синдром Фанкони).

Хронический лимфолейкоз, лимфоцитомы исключительно редки среди лиц тюркской этнической группы, но несколько чаще наблюдаются среди восточно-европейских евреев, отличаясь при этом несколько большей доброкачественностью течения болезни.

Поскольку группа лимфатических лейкозов характеризуется достаточно конкретными хромосомными нарушениями, следует сделать вывод, что наследственные дефекты лимфатической ткани, складывающиеся в определенные клинические синдромы, способствуют повышен-

ной мутабельности хромосом лимфатических клеток-предшественниц, на фоне которой возникают специфические мутации приводящие к развитию лимфатических опухолей. Аналогичные рассуждения: правомерны и в отношении гранулоцитарных лейкозов.

Основы молекулярно-генетических изменений, индуцируемых различными канцерогенами, подробно изложены в книге М.М. Виленчика (1977). Хотя значительная часть фактического материала получена в эксперименте, нет оснований сомневаться в её применимости к человеку. Показано, что хромосомный аппарат претерпевает многократные повреждения в отдельных нуклеотидах, подвергающихся репарации за счёт системы нуклеаз (эндо- и экзонуклеаз). Химические мутагены и ионизирующая ра-

диация существенно увеличивают частоту спонтанных повреждений. Однако их закрепление возможно лишь при ошибках репаративных процессов. Впрочем, здесь уместно и допущение, что достаточно большое число повреждений хромосом - высокие дозы радиационного воздействия, его сочетание с химическими мутагенами - превышает возможности репаративного действия нуклеаз.

У человека известны заболевания, протекающие с нарушениями продукции эндонуклеазы, ответственной за репарацию нарушений ДНК: пигментная ксеродерма, анемия Фанкони. При этих заболеваниях отмечается существенное повышение частоты новообразований: рак кожи при пигментной ксеродерме, острые лейкозы при анемии Фанкони.

ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ В ГЕМАТОЛОГИИ

На протяжении последних десятилетий хромосомный анализ широко применялся для изучения различных новообразований. Получен огромный фактический материал, важный для понимания механизмов малигнизации и прогрессии опухолей, а также для их диагностики и прогнозирования. Последнее относится, главным образом, к лейкозам и лимфомам. Большой вклад в изучение цитогенетики гемобластозов внесли отечественные ученые - Е.К. Пяткин, Р.Ф. Юргутис, Е.Э. Погосян, Е.Л. Пригожина и др.

Клональное происхождение лейкозов и лимфатических опухолей четко прослеживается при изучении их кариотипа - все аномальные клетки одного больного имеют идентичные или сходные хромосомные изменения. При этом наблюдается гетерогенность популяции: в некоторых клетках сохраняются изменения кариотипа, появившиеся на относительно ранних этапах развития опухоли, остальные клеточные элементы характеризуются дополнительными, новыми числовыми и/или структурными нарушениями, возникающими вследствие генетической нестабильности. В нормальных (не опухолевых) тканях этого же пациента кариотип клеток не изменен.

Во многих изученных новообразованиях выявлены специфические (повторяющиеся, неслучайные), характерные именно для данного типа опухолей, хромосомные изменения. Специфические аномалии кариотипа маркируют те участки хромосом, в которых локализируются гены, участвующие в канцерогенезе. При изучении хромосомных участков, которые вовлечены в специфические перестройки кариотипа при разных опухолях и лейкозах человека,

удалось обнаружить несколько десятков таких генов.

Установлено, что решающую роль в возникновении и развитии новообразований играют изменения генов, продукты которых (белки) в норме осуществляют регулирование пролиферации и дифференцировки клеток. Условно выделяют две группы таких генов - *протоонкогены* и *антионкогены* (*гены супрессоры злокачественности*). При малигнизации происходит активация протоонкогенов - превращение их в онкогены. Это может быть следствием различных событий, в частности, хромосомных перестроек. Многие протоонкогены, активация которых обнаружена в лейкозных клетках человека, по своему строению сходны с теми структурами онкогенных вирусов, которые ответственны за малигнизацию клеток экспериментальных животных. Онкогены участвуют в развитии опухолей по доминантному типу, т.е. изменение претерпевает один из двух аллелей. По другому принципу (рецессивному) участвуют в канцерогенезе гены-супрессоры злокачественности: для их инактивации необходимо выключение обоих аллелей. Как правило один из аллелей утрачивается в результате хромосомной делеции, а во втором наблюдается соматическая мутация.

В последние годы установлено, что продуктами большинства протоонкогенов являются так называемые транскрипционные факторы. Эти белки связывают специфические структуры ДНК, ответственные за регуляцию работы конкретных групп генов. Именно транскрипционные факторы определяют, какие белки продуцируются каждой клеткой, т.е. они контролируют все жизненно важные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку, старение и ги-

бель клетки. В опухолевых клетках транскрипционные факторы изменены, в результате чего названные процессы нарушены. Роль раз-

личных генов при раках и лейкозах подробно обсуждается в ряде обзоров [Rabbits, 1994, Sanchez-Garcia, 1997, Rowley, 1998].

ОСНОВНЫЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕРМИНЫ

Каждая хромосома разделена *центромерой* (перетяжкой) на два *плеча*: короткое, которое по международной номенклатуре обозначают латинской буквой *p*, и длинное - *q*. При специальной окраске каждая хромосома имеет свой индивидуальный рисунок, плечи хромосом выглядят поперечно исчерченными, в них видны светлые и темные *полосы* (bands) разной интенсивности. Эти полосы пронумерованы и объединены в *районы* (regions). Район может содержать несколько полос. При описании любой конкретной точки разрыва используют 4 показателя - номер хромосомы, плечо, район, полоса. Например, 14q32 (область перестроек, специфичных для лимфатических опухолей): изменение касается длинного плеча хромосомы 14 и захватывает вторую полосу района 3.

Числовые изменения кариотипа - увеличение числа или утрата целых хромосом. Клетки с измененным числом хромосом называются *анеуплоидными*, в отличие от *диплоидных* (нормальных клеток с 23 парами хромосом). Клетки с нормальным числом хромосом (46), но содержащие перестроенные хромосомы, обозначаются как *псевдодиплоидные*. Клетки,

число хромосом в которых увеличено по сравнению с нормой, называют *гипердиплоидными*, уменьшено - *гиподиплоидными*. Увеличение числа хромосом в 1,5 и более раз приводит к образованию *полиплоидных клеток*: три-, тетра-, пентаплоидных и т.д.

Для большинства опухолевых клонов характерны не только числовые, но и *структурные* перестройки кариотипа: чаще всего наблюдаются *транслокации* (t) - обмен хромосомными участками, *делеции* (del) - утрата хромосомного материала или *инверсии* (inv) - поворот сегмента в пределах одной хромосомы на 180°. Перестроенные хромосомы называют *маркерными*. Транслокации могут быть сбалансированными и несбалансированными. При первых хромосомный материал не теряется: хромосомы обмениваются участками; при несбалансированных происходит утрата части генетического материала. Делеции могут быть концевыми (утрата терминальных районов хромосом), и интерстициальными (выпадают участки хромосомного плеча между центромерой и теломерой).

ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ

Приготовление и окраска хромосомных препаратов. При стандартном цитогенетическом анализе исследуются хромосомы, зафиксированные на стадии метафазы митоза. Методика приготовления препаратов включает в себя:

- 1) введение митостатиков (колхицин, колцемид), останавливающих митозы на стадии метафазы;
- 2) гипотоническую обработку с целью разобщения хромосом набора;
- 3) фиксацию смесью метанола и уксусной кислоты;
- 4) нанесение приготовленной суспензии на предметные стекла путем раскапывания.

Опыт показывает, что препараты получаются лучше, если перед добавлением митостатических агентов клетки культивируются в течение 1-2 суток. При необходимости срочного анализа препараты можно приготовить прямым методом, т.е., исключив предварительное культивирование. К сожалению, качество препаратов, полученных прямым методом, не всегда позволяет провести полноценный анализ кариотипа. Все этапы получения препаратов можно варьиро-

вать, добиваясь лучшего качества. Каждое цитогенетическое исследование - процесс творческий. Методику невозможно стандартизовать, поскольку клетки разных больных отличаются друг от друга по чувствительности к веществам, применяемым в процессе приготовления препаратов. Готовые препараты высушивают в течение 2-7 дней. Затем проводят дифференциальное окрашивание, после которого каждая хромосома приобретает индивидуальный рисунок поперечной исчерченности, позволяющий идентифицировать не только хромосомы, но и отдельные их участки. Систематизация хромосом в каждой отдельной метафазной пластинке, согласно общепринятой международной номенклатуре (раскладывание на пары и идентификация маркеров), дает *кариотип* клетки.

Время анализа препаратов варьирует в зависимости от их качества и сложности изменений кариотипа. Чаще всего от момента взятия материала до окончания анализа проходит 2-3 недели. Как правило анализируют не менее 20 метафаз. Если все они имеют нормальный набор хромосом, можно считать, что кариотип ис-

следуемых клеток не изменен. Однако это не позволяет отвергать тот или иной предполагаемый диагноз.

Необходимо сказать, что на цитогенетическом препарате видны отдельные интерфазные ядра и метафазные пластинки при полном отсутствии клеточных структур, позволяющих определить морфологию исследуемых клеток. Следовательно, проводя хромосомный анализ морфологически гетерогенной клеточной популяции, исследователь не может определить, из какой именно клетки происходит каждая конкретная метафазная пластинка - из нормальной или опухолевой.

В отдельных научных работах применялись сложные методики подкраски остатков цитоплазмы клеток для понимания происхождения метафазных пластинок, но в практической работе эти методики не применяются из-за трудоемкости и плохой воспроизводимости.

Поскольку опухолевые клетки обычно имеют клональное происхождение, основная работа цитогенетика сводится к обнаружению и характеристике опухолевого клона. Принято считать, что исследуемый материал содержит клон клеток с измененным кариотипом, если удалось обнаружить не менее двух идентичных гипердиплоидных клеток или не менее трех идентичных гиподиплоидных клеток.

В ряде опухолей высоко злокачественные клетки не имеют видимых хромосомных нарушений. Сейчас известно, что это может отражать реальную действительность, а может быть следствием того, что малигнизированные клетки не делятся в момент взятия образца для исследования кариотипа (пункция или биопсия), и метафазы, которые видит цитогенетик, представляют не клетки опухоли, а нормальные элементы, например, стромальные. Иными словами, невозможность выявить клон аномальных клеток при цитогенетическом анализе не отвергает диагноз опухоли. Генетические изменения могут быть вне пределов разрешающей способности светового микроскопа, но в отдельных случаях их можно обнаружить с помощью молекулярных методов. Ниже будут приведены соответствующие примеры.

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)

Сложные хромосомные перестройки не всегда могут быть полностью расшифрованы при стандартном цитогенетическом анализе.

В последние годы в клиническую практику все шире внедряются методы молекулярно-генетического исследования, главным образом, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Оба

метода пока еще дороги и не в каждом случае могут быть применены, поскольку не для всех известных изменений кариотипа, характерных для гемобластозов, в настоящее время имеются молекулярные зонды для выполнения FISH и так называемые праймеры для ПЦР. Эти методы высоко специфичны: они не дают возможность увидеть одновременно все изменения кариотипа, а отвечают на конкретный вопрос о наличии или отсутствии той перестройки, зонд на которую применяется в каждом изучаемом случае. Необходимость дополнить стандартный цитогенетический анализ той или иной молекулярно-генетической методикой возникает в клинике относительно редко, однако по мере накопления знаний в этой области эта необходимость становится более частой.

Методика FISH позволяет метить и изучать конкретные участки ДНК (в том числе уникальные гены) и получать сведения о числовых и структурных перестройках кариотипа. В основе лежит способность однонитчатой ДНК связываться (гибридизоваться) с комплементарной ДНК. Сначала исследуемый материал (цитогенетический препарат) и нанесенную на него меченую пробу (зонд) денатурируют для получения однонитчатых ДНК. Затем проводят *гибридизацию*, после чего выявляют метку под флюоресцентным микроскопом, поскольку зонд предварительно был соединен с *флюоресцирующим красителем*.

FISH может быть проведена только для тех участков ДНК, для которых уже разработаны молекулярные зонды, то есть, он не дает возможности увидеть сразу весь хромосомный набор. Метод позволяет в ряде случаев получить ответ быстрее, чем обычный хромосомный анализ. Кроме того, можно исследовать не только метафазные пластинки, но и интерфазные ядра. Это дает возможность за короткое время проанализировать сотни клеток. Именно это делает FISH более чувствительным методом, который может выявить сравнительно небольшое количество аномальных клеток. FISH незаменим при малом количестве митозов.

Нужно отметить, что метод быстро развивается, совершенствуется, количество зондов растет. В настоящее время уже многие специфические хромосомные аномалии могут быть обнаружены с помощью FISH. Причем FISH можно проводить на клетках, окрашенных по Романовскому-Гимза или с различными цитохимическими и иммуно-морфологическими методиками. Это позволяет понять гистогенез клеток, в которых произошли изменения кариотипа.

В самые последние годы в единичных хорошо оборудованных лабораториях используется дорогостоящая установка для спектрального

анализа хромосом, в основе которой тоже лежит принцип FISH (SKY- multicolor spectral karyotyping). Эта установка позволяет увидеть весь кариотип, причем каждая хромосома окрашивается в свой цвет. Использование SKY дает возможность улавливать большинство транслокаций, поскольку маркеры, возникшие в результате обмена между хромосомами, окрашенными в разные цвета, состоят из разноцветных участков. Такие маркеры очень демонстративны, и при определенном опыте легко увидеть и понять, какие хромосомы приняли участие в их формировании. Существуют опухоли и лейкозы, где происхождение маркерных хромосом невозможно установить без применения SKY или некоторых других модификаций FISH. О конкретных возможностях FISH при различных гемобластозах будет рассказано в разделах, посвященных отдельным заболеваниям.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод основан на специфическом многократном копировании (амплификации) определенных участков ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Работа ведется не с цитогенетическими препаратами, а с ДНК или РНК, выделенными из клеток, которые нуждаются в исследовании. Обычно при гемобластозах анализу подвергаются кровь и/или костный мозг. Если в исследуемом материале имеется участок ДНК, перестроенный в результате, например, хромосомной транслокации, это можно обнаружить, проведя ПЦР с использованием специальных молекулярных зондов (*праймеров*). Эти праймеры должны быть комплементарны ДНК, ограничивающей искомый участок с обеих сторон. За счет многократного копирования (*раундов полимеризации*) исследуемый материал обогащается той ДНК, праймеры к которой были использованы, конечно, при условии, что клетки с искомой перестройкой присутствуют в материале. Метод очень чувствителен: можно обнаружить клетки с аномалиями, даже если их количество не превышает 1×10^6 . Результат получается быстрее, чем при хромосомном анализе. Однако ПЦР дороже стандартного цитогенетического исследования и требует специального дорогостоящего оборудования, реактивов и квалификации.

Следует подчеркнуть, что при опухолях системы крови хромосомный и молекулярно-генетический анализ прочно вошел в комплекс важнейших диагностических и прогностических методов, без которых немыслима работа современной гематологической клиники.

Очевидна важность хромосомного анализа для современной клиники гемобластозов, необходимость продолжения изучения кариотипа

различных лейкозов и лимфом на молекулярной основе с учетом постоянно совершенствующихся методов лечения этих заболеваний. Следует подчеркнуть, что новые адекватные терапевтические схемы переводят отдельные специфические хромосомные аномалии из разряда прогностически неблагоприятных в разряд признаков, предвещающих успех лечения. Следовательно, говорить о прогностическом значении хромосомного анализа можно только применительно к конкретным терапевтическим схемам.

Есть несколько важных точек приложения хромосомного анализа в диагностике новообразований. Это решение вопросов:

- опухоль - не опухоль,
- доброкачественная опухоль или злокачественная,
- какой конкретный тип опухоли.

Конечно, цитогенетика не всегда полезна в названных ситуациях, однако в ряде конкретных обстоятельств она может иметь *решающее* значение.

Сформулировать показания к проведению хромосомного анализа для практической диагностики и дифференциальной диагностики лейкозов и лимфом сегодня можно следующим образом.

1. Редкие ситуации, когда диагноз ХМЛ невозможно поставить только на основании клинико-гематологических показателей. Необходимо отметить, что комплекс гематологических показателей позволяет врачу ставить диагноз ХМЛ и при отсутствии Ph-хромосомы, даже при нормальном кариотипе. Там, где клинический диагноз затруднен, необходимо применение стандартной цитогенетики, FISH и/или ПЦР.
2. Мониторинг лечения лейкозов: для этой цели надежнее всего применение FISH и ПЦР.
3. Трудности в диагностике МДС и миелопролиферативных заболеваний. Выявление клона с характерными аномалиями кариотипа помогает в таких случаях, но обнаружение только нормальных метафаз оставляет вопрос открытым.

Три перечисленных момента - минимум. Важно было бы проводить цитогенетическое исследование в каждом случае острого лейкоза для уточнения диагноза и прогноза, а также последующего мониторинга остаточной резидуальной болезни. Для мониторинга незаменим метод ПЦР, FISH обладает гораздо меньшей чувствительностью.

Серьезное прогнозирование течения ХЛЛ, а в ряде случаев и уточнение диагноза при лимфомах тоже требует цитогенетических анализов и FISH.

В настоящее время можно условно разделить клоновые изменения кариотипа, обнаруженные в клетках самых разнообразных опухолей, на повторяющиеся (обнаруженные в нескольких новообразованиях) и неповторяющиеся или неспецифические. Увеличение общего количества цитогенетически исследованных опухолей позволяет переводить хромосомные перестройки из разряда неповторяющихся в разряд повторяющихся. Более того, последние могут оказаться специфичными для конкретных

уникальных субвариантов неоплазии и важными для диагностики именно этих редких форм.

Все сказанное выше относится к практической цитогенетике, но и теоретическое значение современной цитогенетики опухолей трудно переоценить: специфические хромосомные аномалии маркируют участки генома, играющие кардинальную роль в малигнизации и прогрессии, и служат ориентиром при исследовании молекулярных механизмов канцерогенеза.

ИЗМЕНЕНИЯ КАРИОТИПА ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

Цитогенетический анализ позволяет выявить целый ряд фактов, свидетельствующих о ключевой роли генетических изменений в малигнизации и прогрессии опухолей.

Самыми частыми хромосомными аномалиями, характерными для гемобластозов и для ряда солидных опухолей, являются транслокации. На молекулярно-генетическом уровне различают два основных типа специфических хромосомных транслокаций: первые приводят к *активации протоонкогенов без изменения их структуры*; в результате транслокаций второго типа возникают совершенно *новые уникальные гены - химерные или гибридные*, образовавшиеся из фрагментов двух ранее существовавших генов. Изучены уже десятки транслокаций, ведущих к образованию химерных генов, идентифицировано несколько десятков генов из точек соединения хромосом при транслокациях, характерных для острых лейкозов, лимфом и сарком. Функции этих генов интенсивно изучаются. Многие из них кодируют белки, важные для пролиферации, дифференцировки и запрограммированной клеточной смерти (апоптоза). Установлено, что они могут кодировать ростовые факторы, рецепторы ростовых факторов, сигнальные молекулы (signal transducers), протеинкиназы, транскрипционные факторы, регулирующие уровень транскрипции определенных генов-мишеней, причем изменения каждого из них могут привести к неконтрольной пролиферации. Все эти данные - свидетельство ключевой роли хромосомных транслокаций в канцерогенезе. Примеры транслокаций, характерных для разных типов гемобластозов, будут приведены в соответствующих разделах.

Активация протоонкогенов (продукция активных онкопротеинов) может осуществляться не только за счет хромосомных транслокаций, но и другими путями, например, в результате точковых мутаций или генной амплификации.

Установлено, что важную роль в малигнизации и прогрессии злокачественных новообразо-

ваний играют также делеции хромосом. Опыт показывает, что за повторяющимися (закономерными, неслучайными) хромосомными делециями стоит инактивация генов-супрессоров опухолевого роста. К настоящему времени идентифицировано около двадцати таких генов. Среди них наиболее известны гены RB, p53, BRCA1, BRCA2, APC, WT1 и целая группа генов, тесно ассоциированных с наследственным неполипозным раком толстой кишки: MSH2, MLH1, PMS1, PMS2. Многие из этих генов кодируют транскрипционные факторы.

К сожалению, гены-супрессоры изучены значительно хуже, чем протоонкогены. Работа по идентификации генов, претерпевающих изменения при неслучайных делециях, характерных для некоторых лейкозов и лимфом, ведется уже на протяжении многих лет, но знания в этой области накапливаются очень медленно. Обнаружение специфических хромосомных делеций имеет большое клиническое значение: они, так же как и несбалансированные транслокации, более характерны для рака, чем для гемобластозов. Такие аномалии часто наблюдаются при вторичных (возникших после химио-, лучевой или комбинированной терапии) лейкозах и миелодисплазиях. Эти факты используются с диагностическими и дифференциально-диагностическими целями.

Напомним, что специалист-цитогенетик не видит гены при работе со световым микроскопом и проведении стандартного хромосомного анализа. Однако в ряде случаев можно предположить, какие именно гены изменены в результате конкретной хромосомной перестройки, и проверить предположение с помощью молекулярно-генетических методов.

Хронический миелолейкоз

У 90-95% больных ХМЛ наблюдается специфическая хромосомная транслокация - t(9;22). Укороченная в результате этой перестройки 22-я хромосома известна как Ph - по первым буквам названия города, где она впервые была от-

крыта (Philadelphia) [Nowell, J. Hungerford, 1960]. Филадельфийская хромосома - первый из маркеров, характерных для конкретной опухоли человека. Именно с этого маркера начинается клиническая цитогенетика в онкологии. В 1973 году известный американский ученый Janet Rowley показала, что Ph-хромосома образуется в результате сбалансированной транслокации между 9q34 и 22q11. Обычно результатом этой транслокации являются две маркерные хромосомы, кратко обозначаемые как 9q+ и 22q- (Ph). Следует отметить, что это обозначение соответствует той реальной картине, которую цитогенетик видит под микроскопом: одна из хромосом 9-й пары удлинена, а одна из хромосом 22-й пары укорочена. Такая картина обусловлена неравной величиной участков, которыми обмениваются названные хромосомы: фрагмент, утраченный хромосомой 22 и перенесенный на хромосому 9, значительно больше, чем фрагмент, перенесенный с хромосомы 9 на делетированную хромосому 22.

Примерно в 10% случаев имеет место перенос участка хромосомы 22 не на 9-ю, а на другую хромосому. Такие транслокации называются атипичными. Кроме того, иногда при ХМЛ обнаруживают сложные Ph-транслокации с участием не двух (девятой и двадцать второй), а трех или более хромосом. Установлено, что практически при всех Ph-транслокациях участвуют хромосомы 9 и 22, однако это не всегда видно при стандартном цитогенетическом исследовании. Тип Ph-транслокации (стандартная, атипичная или сложная) не имеет клинического значения.

С помощью молекулярно-генетических исследований обнаружено, что в хромосоме 9 разрыв проходит через ген ABL, идентифицированный ранее в одном из вирусов лейкоза у мышей. В хромосоме 22 наблюдается разрыв гена BCR. В результате слияния фрагментов ABL и BCR образуется химерный ген BCR-ABL, расположенный, как правило, на делетированной хромосоме 22 (Ph-хромосоме). Этот ген кодирует белок с молекулярной массой 210 кДа, обладающий более высокой протеинкиназной активностью, чем продукт нормального протоонкогена ABL (P145). При лейкозе, вызванном у мышей вирусом Абельсона, онкогенной активностью обладает белок - продукт гибридного гена gag/abl с высокой протеинкиназной активностью. В эксперименте проводилось вырезание гена gag/abl, после чего вирус терял способность вызывать лейкоз у мышей [J.Cortes, S.O'Brien, 1994].

Решающая роль гена BCR-ABL и его белка P210 в развитии ХМЛ была убедительно продемонстрирована на разных модельных системах

in vivo и in vitro. [Hariharn et al., 1989; Daley et al., 1990].

Изучение разрывов в генах ABL и BCR показало, что у разных пациентов локализация этих разрывов неодинаковая. Так, в гене ABL протяженность участка, на котором могут происходить разрывы, велика - до 200 kb, а в гене BCR разрывы локализуются обычно на маленьком участке - 8,5 kb, отсюда и название гена - breakpoint cluster region. В подавляющем большинстве случаев ХМЛ ген BCR разрывается на участке, обозначаемом M-BCR. При этом в химерный ген входит длинный фрагмент гена BCR и в результате образуется характерный для ХМЛ белок - P210 BCR-ABL.

Ряд исследователей считает, что большое прогностическое значение имеет собственно локализация разрыва на участке M-BCR (ближе к центромере или дальше от нее). Продолжительность жизни больных на бусульфано-терапии существенно различается в зависимости от этого показателя [Туркина и др., 1991; Inocuchi et al., 1991; Miles et al., 1991]. Данные других авторов не подтверждают эту точку зрения [Fioretas et al., 1993]. Необходимо дальнейшее изучение данного вопроса.

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

В типичных случаях гематолог легко ставит диагноз ХМЛ без хромосомного и/или молекулярно-генетического анализа. Изредка клинико-гематологическая картина не совсем типична: у таких пациентов диагноз может быть подтвержден цитогенетически. Однако отсутствие Ph не исключает диагноз ХМЛ, поскольку транслокация BCR-ABL может быть субмикроскопической и только применение молекулярных методик (FISH, PCR) дает точный ответ.

В настоящее время отвергается существование Ph-негативного ХМЛ: практически во всех случаях с типичной (а иногда и с атипичной) гематологической симптоматикой можно выявить химерный ген BCR-ABL и его продукты. Исключения составляют немногочисленные сообщения о пожилых людях с типичной клинико-

гематологической симптоматикой, но без образования химерного гена BCR-ABL. Терминальная фаза болезни в этих случаях имеет ряд особенностей [Kurzrock et al., 1990].

Картина крови, напоминающая таковую при ХМЛ, наблюдается при целом ряде заболеваний: ювенильном ХМЛ, хроническом миело monocитарном лейкозе (ХММЛ) и некоторых других миелопролиферативных процессах. Ювенильный ХМЛ отличается кожными высыпаниями, частыми повторными инфекциями, наличием лимфоаденопатий, анемии и тромбоцитопении уже на сравнительно ранних стадиях болезни. Характерен нормальный уровень щелочной фосфатазы в отличие от пониженного при Ph-позитивном ХМЛ и повышенное содержание фетального гемоглобина в крови. Цитогенетическое исследование нередко выявляет моносомию 7.

Переход ХМЛ в терминальную фазу у 70-80% больных сопровождается появлением клонов клеток с дополнительными (кроме Ph-транслокации) аномалиями кариотипа. Из них наиболее характерны: появление второй Ph-хромосомы, дополнительной хромосомы 8 и/или маркера i(17q). Значительно реже наблюдаются различные другие изменения кариотипа (числовые и/или структурные). Важно, что клон клеток с дополнительными хромосомными аномалиями нередко выявляется за несколько месяцев до обнаружения четких симптомов терминальной стадии болезни. Следовательно, цитогенетический анализ помогает диагностировать терминальную фазу ХМЛ раньше, чем другие клинико-лабораторные показатели.

Необходимо осветить еще ряд клинкоморфологических и цитогенетических особенностей ХМЛ. Так, существует группа больных, у которых бластный криз развивается после короткой развернутой фазы (менее двух лет) и не имеет дополнительных хромосомных аномалий. Терминальная фаза протекает без выраженной анемии и тромбоцитопении и сравнительно продолжительна, так как поддается цитостатической терапии: в большинстве случаев удается достигнуть ремиссии, как правило, кратковременной.

Существуют и другие варианты течения ХМЛ, отличающиеся друг от друга общей продолжительностью болезни, соотношением ее фаз и основными характеристиками терминальной стадии, в том числе, изменениями кариотипа. У большинства больных ХМЛ средняя продолжительность развернутой фазы близка к четырем годам и терминальная фаза относительно коротка, протекает тяжело, сопровождается обычно выраженной анемией, тромбоцитопенией и геморрагическим диатезом; бластные клетки

имеют четкие признаки миелоидной дифференцировки, а цитогенетический анализ выявляет маркер i(17q). Ремиссии достигаются редко. У больных с общей продолжительностью ХМЛ, приближающейся к 10 годам и выше на бусульфано-терапии, бластный криз имеет наиболее короткое и тяжелое течение и характеризуется резкой анемией, тромбоцитопенией, ремиссии, как правило, не достигаются. Изменения кариотипа наблюдаются в терминальной фазе у всех "долгожителей" с ХМЛ, но маркер i(17q) крайне редок [Fleischman et al., 1981].

Показано, что некоторые четко очерченные варианты бластного криза ХМЛ отличаются по своей хромосомной характеристике. Так, промиелоцитарный вариант сопровождается появлением транслокации t(15;17)(q22;q21), характерной для острого промиелоцитарного лейкоза, при монобластном кризе с эозинофилией наблюдается инверсия хромосомы 16 как при соответствующе остром лейкозе; мегакариобластный криз может сочетаться с инверсией хромосомы 3, inv(3)(q21;q26); лимфобластный криз сопровождается различными дополнительными аномалиями кариотипа, самой частой из которых является моносомия 7.

Бластный криз ХМЛ может начинаться в экстрамедуллярных очагах: селезенке, лимфатических узлах и др. Затем происходит генерализация процесса путем метастазирования. Этот вывод сделан на основании наблюдений за динамикой распространения клеток, маркированных специфическими хромосомными изменениями.

Следует отметить, что изучение кариотипа и молекулярно-генетические методики широко применяются для оценки эффективности различных методов лечения ХМЛ: поскольку известно, что Ph - t(BCR-ABL) до лечения у подавляющего большинства больных содержится практически во всех клетках костного мозга, появление нормальных клеток (без этих маркеров) и нарастание их количества свидетельствуют о сужении или исчезновении лейкозного клона. Подчеркнем, что молекулярно-генетические методы выявления аномальных клеток гораздо более чувствительны, чем хромосомный анализ: они могут обнаружить аномальные клетки, даже при их содержании 1×10^7 .

В последние годы достигнуты большие успехи в лечении ХМЛ: применение интерферона или его аналогов для монотерапии или в сочетании с другими препаратами позволило регулярно получать длительные клинические и цитогенетические ремиссии. Причем первые удается достигнуть быстрее и значительно чаще вторых. Типы цитогенетического ответа на интерферон представлены в табл. 16.

Таблица 16
Типы цитогенетического ответа на интерферон
у больных ХМЛ

Ответ	Количество Ph-позитивных клеток в костном мозге, %
Полный	0
Частичный	<35
Малый	36-95
Отсутствует	100

Существует выраженный параллелизм между цитогенетическим и клиническим эффектом INF: при полном ответе 5-летняя выживаемость составляет 90%, при малом - 76%, при остальных типах - 38% [Kantarjian et al., 1996]. К сожалению, цитогенетический ответ удается получить только в 20-30% случаев, а полный - у 8-12% больных [Spencer et al., 1995; Kantarjian et al., 1996]. Конечно, большое значение имеют дозы интерферона и весь комплекс терапевтических средств [Wetzler et al., 1995]. Полный ответ, если и достигается, то обычно не ранее, чем через 8-12 месяцев (от 6 месяцев до 4 лет). Некоторого уменьшения количества Ph-позитивных клеток в костном мозге можно ждать уже через 3-6 месяцев от начала лечения [Wetzler et al., 1995].

Лечение INF существенно увеличило продолжительность жизни больных ХМЛ. По данным разных клиник средняя выживаемость составляет 59-102 месяца и зависит от времени начала терапии: если это первый год от момента постановки диагноза, то шанс получить продолжительность жизни более 5 лет существенно возрастает [Allan et al., 1994; Italian Cooperative Study Group, 1994; Kantarjian et al., 1996].

Мониторинг в процессе лечения лучше всего проводить с помощью FISH или разных вариантов ПЦР, поскольку это дает возможность быстро получать ответ, причем на клетках крови, а не костного мозга.

Миелопролиферативные синдромы

Эритропения. До начала цитостатической или лучевой терапии клоны аномальных клеток находят у 15-20% больных, на фоне лечения - у 40%, при трансформации в острый лейкоз - у 85% пациентов [Mertens et al., 1991; Roulston et Le Beau, 1997]. Самые характерные изменения: трисомии 8 или 9, интерстициальная делеция хромосомы 20, трисомия всего длинного плеча хромосомы 1 или части его, появление маркера 13q- [Swolin et al., 1988; Sandberg, 1990; Heim et Mitelman, 1991].

Хронический мегакариоцитарный лейкоз. Клоновые изменения находят в 5% случаев (III IWCL, 1981). Наиболее частыми являются моносомия 7 или трисомия 8.

Сублейкемический миелоз. Клоновые изменения кариотипа наблюдаются, примерно, у половины пациентов. Характерны: моносомия 7, трисомии 8 или 9 и некоторые структурные аномалии, в частности, перестройки 1q, 5q, 13q, и 20q. В 75% случаев с клоновыми изменениями выявляется одна из перечисленных аномалий [Mitelman, 1994].

Обычно обнаружение анеуплоидного клона не имеет прогностического значения, за исключением случаев с маркером i(17q) или множественными перестройками, позволяющими предсказать неблагоприятное развитие событий. Кроме того, отрицательное прогностическое значение имеет обнаружение клонов аномальных клеток в ходе болезни, после того, как предыдущие анализы выявляли только клетки с нормальным кариотипом [Heim et Mitelman, 1995].

Острые лейкозы

Результаты хромосомного анализа при острых лейкозах трудно переоценить: они имеют *независимое прогностическое значение* и постоянно используются для усовершенствования классификации этой группы заболеваний.

Клоновые изменения кариотипа удается обнаружить, приблизительно, в 60-80% случаев, у остальных больных хромосомные аномалии не выявляются.

Уместно подчеркнуть, что отсутствие клеток с изменениями кариотипа не может быть решающим критерием для того, чтобы отвергнуть предполагаемый диагноз при подозрении на острый лейкоз. Добавим, что получены факты, свидетельствующие о генетических изменениях при острых лейкозах, происходящих на субмикроскопическом уровне. Эти изменения, как правило, тоже клоновые, могут быть выявлены с помощью FISH и ПЦР.

В тех случаях, когда наблюдаются клоны клеток с нарушениями кариотипа, количество таких клеток соответствует обычно количеству бластных элементов в исследуемом материале. При достижении ремиссии количество аномальных клеток уменьшается, и они могут исчезнуть. Степень уменьшения величины клона измененных клеток служит одним из критериев эффективности терапии. В настоящее время существуют понятия *молекулярная ремиссия* и *молекулярный рецидив*: при наступлении клинико-морфологической ремиссии оставшиеся лейкозные клетки выявляются молекулярными методами, из которых наиболее чувствителен ПЦР. FISH также применяется для оценки полноты ремиссии и диагностики рецидива, но этот метод менее чувствителен, чем ПЦР.

В подавляющем большинстве острых лейкозов аберрантные клетки представляют один клон. В отличие от ХМЛ, клональная эволюция практически не наблюдается. Два или более аномальных клон обнаруживаются, примерно, в 1-2% случаев [Heim et Mitelman, 1995].

К настоящему времени выявлено несколько десятков различных хромосомных аномалий, характерных для острых лейкозов; большей частью это транслокации. Среди них есть такие, которые обнаруживаются почти исключительно при определенных морфологических формах, другие при различных формах [Sandberg, 1990; Borden et al., 1993; Rowley, 1993].

Острый нелимфобластный лейкоз (ОНЛЛ). Клоны клеток с хромосомными аномалиями удается обнаружить в 60-80% случаев ОНЛЛ. Частота отдельных специфических изменений кариотипа представлена в табл. 17.

Таблица 17
Основные хромосомные аномалии, характерные для ОНЛЛ

Аномалии	Частота, %
t(1;3)(p36;q21)	<1
t(1;7)(p11;p11)	<1
inv(3)(q21;q26)	<1
t(3;5)(q21;q31)	<1
t(8;16)(p11;p13)	<1
+13	<1
+4	1-2
t(6;9)(q23;q34)	1-2
t(9;22)(q34;q11)	1-2
Del/t(11q13-14)	1-2
i(17q)	1-2
Del(20)(q11)	1-2
+21	1-2
-Y	1-2
Del(7q)	3-4
-7	3-4
Del(9q)	3-4
Del/t(12p)	3-4
Del(5q)	5-6
+8	5-6
Del/t(11q23)	5-6
inv(16)	8
t(8;21)(q22;q22)	12
t(15;17)(q22;q21)	12

Эта таблица опубликована Heim и Mitelman в 1992 г. Приведенные частоты определены на огромном материале - около 6 тыс. ОНЛЛ, цитогенетически обследованных в разных странах мира. Частота, приведенная в табл. 17, получена за счет усреднения результатов разных авторов. В реальной жизни наблюдаются весьма значительные различия в частоте неслучайных хромосомных аномалий, ассоциированных с лейкозами: известны возрастные и географические различия. Результаты клинко-цитогенети-

ческих и молекулярных исследований ОНЛЛ детально изложены в целом ряде публикаций [Rowley, 1993; Heim et Mitelman, 1995; Mrozek et al., 1997].

Основные морфо-цитогенетические параллели при острых нелимфобластных лейкозах обобщены Mrozek et al. (1997) и приводятся в табл. 18.

Следует отметить, что частота отдельных хромосомных изменений при миелобластных лейкозах сильно варьирует: одни обнаруживаются сравнительно часто (5-20% случаев), другие весьма редки (1% и менее). Так, более чем половина ОНЛЛ, в которых обнаружены клоны клеток с хромосомными аномалиями, представлена случаями со следующими характерными изменениями: t(8;21), t(15;17), inv(16), -5/5q-, -7/7q-, +8, +21; причем у 20% больных удается обнаружить клоны клеток с одной аномалией (числовой или структурной), в 45% случаев наблюдается два или более изменения кариотипа. Степень перестроенности кариотипа в известной мере коррелирует с морфологическим вариантом лейкоза: так, при М3 в подавляющем большинстве случаев (около 80%) обнаружена только специфическая транслокация t(15;17), а при варианте М6 у 70% больных кариотип резко перестроен.

Таблица 18
Параллелизм между особенностями кариотипа и морфологической формой ОНЛЛ

Аномалии	FAB-вариант
t(1;3)(p36;q31)	M4
t(1;22)(p13;q13)	M7
t(7;11)(p13;q13)	M2
t(1;7)(p10;q10)	M1-M2
t(8;16)(p11;p13)	M5
t(8;21)(q22;q22)	M2
t(9;22)(q34;q11)	M1-M2
t(9;11)(p21-p22;q23)	M5
t(11;V)(q23;V)	M4-M5
t(15;17)(q22;q11)	M3
inv(16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22)	M4E0
t(16;21)(p11;q22)	M1-M2
+4	M1-M2
+11	M1-M2
+22	M4

Переходим к изложению данных о клиническом значении отдельных специфических аномалий кариотипа.

t(15;17)(q22;q21). Транслокация специфична для острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), при котором она наблюдается почти во всех случаях (90-95%). Частота же самого промиелоцитарного лейкоза (М3) сильно варьирует в разных регионах мира, составляя от 5 до 50% от всех ОНЛЛ. Судя по литературным данным,

эти различия обусловлены особенностями национального состава населения, например, есть публикации, свидетельствующие о высокой частоте ОПЛ и $t(15;17)$ среди латиноамериканцев и китайцев. В большинстве районов нашей страны частота ОПЛ составляет 5-7%, но есть области, где эта частота повышена - до 20% (пример - Кировская область).

Транслокация $t(15;17)$ не обнаружена ни при одном гемобластозе, кроме ОПЛ и промиелоцитарного бластного криза ХМЛ. Эта транслокация приводит к образованию химерного гена за счет слияния фрагмента гена PML из хромосомы 15 с фрагментом гена, кодирующего рецептор α -ретиновой кислоты (RAR α) из хромосомы 17. С помощью FISH и ПЦР можно обнаружить химерные гены и их продукты не только в случаях, протекающих с $t(15;17)$, но и у больных, у которых она цитогенетически не выявляется, в частности, при субмикроскопических слияниях PML/RAR α (например, в отдельных случаях ОПЛ с нормальным кариотипом). Поскольку скрытая транслокация PML/RAR α не является крайней редкостью, постановка диагноза ОПЛ требует применения молекулярно-генетических методов исследования в случаях без транслокации $t(15;17)$, но с клинико-морфологическими признаками, характерными для этого заболевания.

Морфологический диагноз ОПЛ не всегда прост. Значительные трудности возникают, в частности, при идентификации так называемого М3вг, который с большой точностью можно распознать при электронной микроскопии используя цитогенетический анализ, обнаруживающий транслокацию $t(15;17)$. Клинически эта форма тоже отличается от типичного гипергранулярного ОПЛ.

Иногда возникают трудности при дифференциальном диагнозе между FAB вариантами М2 и М3 или М4 и М3. Уточнить диагноз помогает стандартное цитогенетическое исследование, а в случаях, когда транслокацию $t(15;17)$ обнаружить не удастся, следует уточнить диагноз с помощью FISH или ПЦР. Кроме того, в настоящее время разработаны антитела, позволяющие отличить М3 вариант от других типов ОМЛ.

В 1999 г. английские гематологи [Allford et al., 1999] получили новые убедительные данные, свидетельствующие о тесной ассоциации химерного гена PML/RAR α с промиелоцитарным лейкозом и высокой чувствительностью к ATRA. Их наблюдения показали, что популяция клеток с характерными признаками М3-бластов может быть небольшой. У 1 из 530 больных с различными морфологическими вариантами ОМЛ, за исключением М3, эти авторы обнаружили химерный транскрипт PML/RAR α . Кроме того, в

этом случае удалось выявить небольшое количество клеток с характерной морфологией М3-бластов. Был поставлен диагноз М3 и отменен первоначальный диагноз М5 с нормальным кариотипом. Эти же авторы изменили диагноз еще у 2 больных с характерной транслокацией $(15;17)$ и типичным химерным транскриптом. До цитогенетического и ПЦР анализа диагнозы были М1 и М2. В обоих случаях обнаружена небольшая популяция характерных М3-бластов.

Приблизительно в 10% случаев при остром промиелоцитарном лейкозе выявляется не $t(15;17)$, а атипичные перестройки с участием гена RAR α и других генов: это транслокации $t(11;17)(q23;q21)$, $t(5;17)(q31;q21)$ и $t(11;17)(q13;q21)$. В результате этих транслокаций образуются химерные гены: PLZF-RAR α , NPM-RAR α , NuMA-RAR α . Как правило морфологическая картина при этих лейкозах атипична. Поскольку такие наблюдения редки, судить о прогностическом значении упомянутых перестроек пока трудно. Тем не менее, известно, что первая из них не обладает высокой чувствительностью к препаратам ретиновой кислоты, которая характерна для стандартной транслокации $(15;17)$ и двух других атипичных транслокаций. Так как во всех случаях ОПЛ, исследованных молекулярно-генетическими методами, обнаружены перестройки гена RAR α , сделан вывод о том, что изменения этого гена играют решающую роль в развитии промиелоцитарного лейкоза (Melnik et Licht, 1999).

Необходимо отметить, что и при типичной $t(15;17)$, видимой при стандартном хромосомном анализе, молекулярно-генетические подходы позволяют обнаружить некоторые различия между пациентами. Чаще всего это варианты локализации разрывов в гене PML, приводящие к образованию разных транскриптов PML/RAR α . В 1997 г. появились новые результаты молекулярно-генетических исследований большой группы больных с ОМЛ-М3 [Gallagher et al., 1997]. Исследовав более 200 случаев PML/RAR α позитивного ОПЛ, авторы приходят к выводу, что тип транскрипта ассоциирован (не очень строго) с гематологическими особенностями лейкоза, в частности, с уровнем лейкоцитов, а этот показатель сам по себе имеет прогностическое значение. В то же время авторы не обнаружили различий в эффективности лечения у лиц с разными типами транскрипта.

В ряде случаев ОПЛ транслокация $t(15;17)$ сопровождается появлением дополнительных хромосомных аномалий, чаще всего трисомии 8. Влияние дополнительных аномалий на прогноз не доказано.

ОПЛ является пока единственным примером злокачественного новообразования, при кото-

ром удалось разработать и с успехом применить патогенетическую терапию: полная ремиссия может быть достигнута практически во всех случаях введением производных ретиноевой кислоты. Последние снимают блок дифференцировки лейкозных клеток, вызванный действием химерного белка - продукта гена PML/RAR α . Ремиссии у больных ОПЛ, индуцированные препаратами ретиноевой кислоты, непродолжительны. Их длительность удается значительно увеличить за счет подключения комплексных схем, сочетающих антрациклиновые производные (чаще всего даунорубин) и цитостатики типа Ага-С. Современные терапевтические протоколы позволяют получить полные ремиссии у 65-80% больных ОПЛ, причем, у 87% этих пациентов на протяжении 18 месяцев наблюдается безрецидивное течение. Пятилетняя выживаемость достигает 70% [Grimwade et al., 1998].

Интересно, что ремиссии при ОПЛ обусловлены созревaniem лейкоэмических клеток, а не их уничтожением. Однако «созревают» опухолевые бласты не в обычные сегментоядерные элементы, а в уродливые двухядерные образования, часто сохраняющие в цитоплазме палочки Ауэра; зернистость становится скудной; на нейтрофилы эти клетки не похожи.

Итак, применение адекватной терапии при ОПЛ обеспечивает не только высокую продолжительность жизни больных, но в ряде случаев приводит к их излечению. Следовательно, чрезвычайно важна своевременная диагностика этой формы лейкоза, которая не всегда возможна без цитогенетического и/или молекулярно-генетического анализа. Обнаружение транслокации (15;17) на цитогенетическом или молекулярном уровне имеет решающее значение для выбора терапии. Установлено, что достижение полной ремиссии при ОПЛ сопровождается исчезновением химерного транскрипта, в ходе ремиссии даже высоко чувствительные методы определяют "полную ПЦР-негативность". Если же после периода ПЦР-негативности удается вновь обнаружить транскрипт и количество его нарастает - это обычно предвещает рецидив. Опубликованы результаты успешного предотвращения гематологического рецидива ОПЛ в результате интенсификации лечения в начале молекулярного рецидива. Эти факты свидетельствуют о необходимости мониторинга остаточной резидуальной болезни при ОПЛ с помощью ПЦР, поскольку именно этот метод позволяет диагностировать молекулярный рецидив и своевременно изменить тактику ведения больного для того, чтобы предотвратить гематологический рецидив, лечение которого гораздо менее эффективно.

t(8;21)(q22;q22). Транслокация характерна для М2 варианта и очень редко наблюдается при М1, М4, М5. Американские исследователи выделяют 6 морфологических особенностей клеток костного мозга, сочетание которых характерно для ОМЛ с t(8;21) в отличие от миелобластных лейкозов с другими специфическими изменениями кариотипа. Кроме того, при этой аномалии нередко наблюдается повышенное содержание эозинофилов в костном мозге [Heim et Mitelman, 1995].

В нашей стране частота t(8;21) составляет около 30% от всех ОНЛЛ и более 40% от М2 лейкозов [Frenkel et al., 1994]. В разных регионах мира частота t(8;21) при М2 варьирует: от 70% в Китае до 19% в Северной Европе [Johansson et al., 1991].

Молекулярно-генетические исследования показали, что при t(8;21) происходят разрывы в двух генах ЕТО (хромосома 8) и AML1 (хромосома 21). При слиянии образовавшихся фрагментов ДНК на хромосоме 8 образуется химерный ген: AML1-ЕТО. Продукты этого гена - РНК и белок можно обнаружить у 100% больных. Транслокация может быть скрытой - не видимой при стандартном цитогенетическом исследовании, но она обязательно выявляется с помощью FISH и/или ПЦР. Установлено, что эта транслокация чаще наблюдается у молодых пациентов.

По данным VI Совещания Международной рабочей группы "Хромосомы при лейкозах" [VI IWCL, Arthur et al., 1987] медиана выживаемости у больных с t(8;21) составила 14 месяцев, более 4 лет прожило 6% больных. Позже появились сообщения о том, что частота ремиссий при ОНЛЛ с этой транслокацией может достигать 90-100%, а 5-летняя выживаемость у взрослых составляет 50-70% [Dastugue et al., 1995; Grimwade et al., 1998; Bloomfield et al., 1998].

Имеются отдельные сообщения о том, что лейкозы с транслокацией t(8;21) у детей могут иметь крайне неблагоприятное течение [Martinez-Clement et al., 1995]. Возможно, это связано с тем, что именно в детском возрасте могут наблюдаться такие особенности лейкоза, как повышенное содержание гранулоцитов в крови и параспинальные саркомы, резистентные к терапии [O'Brien et al., 1989; Byrd et al., 1995].

Достижение полной гематологической ремиссии при ОМЛ с транслокацией t(8;21) у ряда больных сопровождается понижением количества химерного транскрипта в крови и костном мозге до уровня ниже чувствительности ПЦР, однако нередко химерный транскрипт удается обнаружить даже во время гематологической ремиссии [Chang et al., 1992; Nucifora et al., 1993]. Следовательно, для мониторинга ОМЛ с транслокацией (8;21) подходит только количест-

венная модификация метода ПЦР, позволяющая оценить эффективность лечения и предсказать гематологический рецидив, который неизбежно следует за молекулярным. Молекулярный рецидив диагностируется при существенном повышении уровня химерного транскрипта по сравнению с фоновым уровнем, установившимся в периоде получения полной гематологической ремиссии. Так же, как и другие специфические хромосомные аномалии, $t(8;21)$ может встречаться не только в типичной форме: в литературе приводятся сообщения об атипичных и сложных перестройках с образованием химерного гена AML1-ETO.

Нередко наблюдается сочетание транслокации $t(8;21)$ с утратой одной из половых хромосом: X у женщин и Y у мужчин; часто эти изменения наблюдаются вместе с делецией длинного плеча хромосомы 9. Большинство цитогенетиков считает, что появление дополнительных хромосомных аномалий у больных с транслокацией (8;21) не имеет прогностического значения (IV IWCL). Эта точка зрения разделяется не всеми [Swansbury et al., 1994; Slacik et al., 1996].

$inv(16)(p13;q22)$ и $t(16;16)(p13;q22)$. Эти изменения кариотипа характерны для острого миеломонобластного лейкоза: M4Eo и M4, где их выявляют с частотой 100% и 40% соответственно. Причем обычно речь идет об инверсии хромосомы 16, транслокация $t(16;16)$ - аномалия значительно более редкая. Необходимо подчеркнуть тесную связь между наличием инверсии хромосомы 16 и присутствием в костном мозге аномальных эозинофилов, даже в небольшом количестве. Иными словами: названные хромосомные перестройки обнаруживаются изредка и при различных других морфологических вариантах ОМЛ (не только при M4Eo и M4), однако практически все случаи с инверсией хромосомы 16 характеризуются присутствием аномальных эозинофилов.

По данным VI IWCL (1987), медиана выживаемости у больных с $inv(16)$ и $t(16;16)$ составляла 18 месяцев, а при наиболее интенсивной терапии - 27 месяцев; 14% пациентов были живы через 4 года от начала лечения. В настоящее время результаты лечения этой формы существенно улучшились: полные ремиссии достигаются в 90%, а медиана выживаемости составляет 77 месяцев [Jovetntino et al., 1995].

Молекулярный анализ выявил во всех изученных случаях химерный ген, образовавшийся при слиянии фрагментов двух разорванных локусов, MYH11(16q13) и CBFB(16q22). Химерный белок - продукт нового гена является транскрипционным фактором. Разработанные к настоящему времени молекулярно-генетические

методики пригодны для мониторинга минимальной резидуальной болезни у больных с $inv(16)$ и $t(16;16)$ [Claxton et al., 1994]. У большинства больных с $inv(16)$ гематологическая ремиссия, полученная в результате лечения, сопровождается несколько отсроченной молекулярной ремиссией. Повторное появление характерного гибридного транскрипта предвещает неизбежный рецидив.

Существует группа больных, у которых при инверсии 16 происходит делеция гена множественной лекарственной устойчивости, локализованного в коротком плече хромосомы 16(16p13). Это событие существенно улучшает прогноз [Kuss et al., 1994].

Нельзя не отметить, что инверсии и транслокации хромосомы 16 могут быть обнаружены только при очень хорошем качестве цитогенетических препаратов, в то же время использование FISH и ПЦР выявляет ее безотказно.

Перестройки 11q23. Такие хромосомные аномалии чаще всего наблюдаются при остром лейкозе у детей до одного года (до 70% от всех наблюдающихся изменений), у старших пациентов их частота становится значительно меньше, особенно у пожилых людей (2-15%).

Молекулярно-генетические методики, как правило, обнаруживают изменения гена MLL (myeloid lymphoid leukemia). Перестройки этого гена наблюдаются при лейкозах как миелоидной, так и лимфоидной природы, что и отразилось в его названии. Ген является транскрипционным фактором.

В настоящее время известно около 40 хромосомных участков, вовлеченных в транслокации с 11q23. Самые известные и лучше всего изученные транслокации: $t(4;11)(q21;q23)$, $t(6;11)(q27;q23)$, $t(9;11)(p21-p22;q23)$, $t(11;19)(p13;q23)$.

Лейкозы, при которых происходят перестройки гена MLL, обладают рядом общих признаков: чаще всего бластные клетки имеют моноцитарные черты, лейкоцитоз нередко значительно повышен, прогноз крайне неблагоприятен. Однако следует учитывать, что прогноз определяется не только геном MLL, но и вторым участником транслокации. Так транслокация (9;11) имеет более благоприятное прогностическое значение, чем другие транслокации гена MLL. Частота полных ремиссий при $t(9;11)$ составляет 90%, а при других транслокациях с участием MLL - всего 56%. Трехлетнее безрецидивное течение составляет 67 и 15% соответственно (Martintz-Clement et al., 1995).

$t(3;3)(q21;q26)$ и $inv(3)(q21q26)$. Эти хромосомные аномалии характерны для ОНЛЛ и миелодисплазий, протекающих со своеобразной клинико-гематологической картиной: повышен-

ный или нормальный уровень тромбоцитов в крови, гиперплазия и резко выраженная дисплазия мегакариоцитарного ростка в сочетании с дисплазией одного или двух других ростков кроветворения. Практически все случаи резистентны к терапии [Bitter et al., 1985].

Кроме перестроек длинного плеча хромосомы 3, для острых лейкозов, развивающихся после периода миелодисплазии, характерны также $t(1;7)(p10;q10)$, $t(2;11)(p13;q23)$, $t(1;3)(p36;q21)$, $t(3;5)(q21-25;q31-35)$, $t(6;9)(p23;q34)$ и некоторые другие изменения кариотипа.

По мере увеличения количества случаев ОНЛЛ, исследованных цитогенетически, постоянно пополняется список неслучайных хромосомных аномалий, характерных для отдельных клинико-морфологических вариантов этого заболевания. В частности, стало известно, что $t(1;22)(p13;q13)$ характерна для мегакариобластного лейкоза (M7). Эта транслокация значительно чаще наблюдается у детей, чем у взрослых. Практически у всех детей с мегакариобластным лейкозом обнаружена транслокация $t(1;22)$. Для лейкозов с этой перестройкой характерна интенсивная инфильтрация органов брюшной полости бластными клетками и как результат - гепато- и спленомегалия. Обычно наблюдаются фиброз костного мозга и тромбоцитопения. Прогноз крайне неблагоприятный.

Оценка прогностического значения отдельных цитогенетических маркеров меняется по мере усовершенствования терапии острого нелимфобластного лейкоза. Ниже приводятся примеры классификаций хромосомных аномалий при ОНЛЛ с точки зрения прогноза.

Пользуясь этими классификациями, необходимо учитывать, что отнесение больных в ту или иную прогностическую группу условно. В частности, ОНЛЛ с хромосомными изменениями, предвещающими хороший ответ на терапию, могут проявляться тяжелыми и смертельно опасными клиническими особенностями, требующими специальных лечебных мероприятий. Так, при лейкозе с $t(8;21)$ могут возникать гранулоцитарные саркомы, в том числе локализу-

ющиеся в головном или спинном мозге; $inv(16)$ может сопровождаться обширными внутримозговыми гемorragиями, $t(15;17)$ нередко сопровождается ДВС-синдромом. Естественно, прогноз во всех этих случаях может зависеть не только от стандартных схем лечения лейкоза, но и от эффективности купирования названных тяжелых синдромов.

В обобщенном виде прогностическое значение отдельных специфических изменений кариотипа представлено в табл. 19 [Heim et Mitelman, 1995].

Сравнительно новая оценка прогностического значения хромосомных изменений при ОНЛЛ представлена в табл. 20.

Эти данные опубликованы в 1998 г. как результат многоцентрового исследования более полутора тысяч больных острым миелобластным лейкозом, проведенного в Англии. На основании общепринятых критериев (частоты полных гематологических ремиссий, безрецидивной 5-летней выживаемости и некоторых других) сделан вывод о том, что относительно благоприятными являются $t(15;17)$, $t(8;21)$ и аномалии длинного плеча хромосомы 16 (инверсии, транслокации). Подтверждено неблагоприятное прогностическое значение множественных нарушений кариотипа, перестроек длинного плеча хромосомы 3, моносомий 5 и 7, а также делеций длинного плеча хромосомы 5. В группу нарушений, имеющих промежуточное прогностическое значение, были включены трисомия 8 и перестройки 11q23, туда же помещены трисомии 21 и 22, делеция длинного плеча хромосомы 9 и некоторые другие аномалии. Впервые приведены убедительные данные о том, что наличие маркера 7q- не предвещает неблагоприятного течения болезни, как это принято было считать. В этом же исследовании, проведенном на больших группах одинаково леченных больных, удалось сравнить две подгруппы с разными транслокациями одного и того же хромосомного участка 11q23: $t(9;11)(p22;q23)$ и $t(10;11)(p12;q23)$. Оказалось, что 5-летняя выживаемость у больных с $t(9;11)$ в 3 раза выше,

Таблица 19

Прогностическое значение основных хромосомных аномалий при ОНЛЛ

Аномалии	Частота полных ремиссий	Длительность ремиссий
$inv(3)$	Низкая	Короткие
-5/5q-	Низкая	Короткие
-7/7q-	Низкая	Короткие
$t(8;16)$	Низкая	Короткие
+8	Варьирует	Варьирует
$t(11q23)$	Варьирует	Варьирует
$t(15;17)$	Высокая	Длительные
$inv(16)$	Высокая	Длительные
$i(17q)$	Низкая	Короткие
+21	Высокая	Варьирует

Таблица 20

Прогностическое значение хромосомного анализа при ОНЛЛ [Grimwade et al., 1998]

Благоприятный*	Промежуточный	Неблагоприятный**
t(8;21) t(15;17) inv(16)/t(16;16)	Нормальный кариотип 7q- +8 9q- Перестройки 11q23 +21 +22	inv(3), t(3;3) -5/5q- -7 Множественные нарушения кариотипа

Примечание. * 5-летнее безрецидивное течение наблюдалось у 60-70% больных; ** 5-летнее безрецидивное течение наблюдалось у 5-10% больных.

чем у пациентов с t(10;11).

В настоящее время рекомендуется проводить исследование кариотипа у каждого больного ОНЛЛ, поскольку неслучайные хромосомные аномалии имеют независимое прогностическое значение. В то же время ясно, что каждая группа лейкозов с идентичными изменениями кариотипа - неоднородна. В группе с относительно хорошим прогнозом доля больных, которые живут более 5 лет, значительно выше, чем в группе с плохим прогнозом, но не все больные в каждой группе будут иметь одинаковую продолжительность жизни при однотипном лечении. Например, только 70-80% пациентов с миелобластным лейкозом и транслокацией t(8;21) переживают 5-летний рубеж, каждый же больной из оставшихся 30% может прожить значительно меньше. Все сказанное имеет целью подчеркнуть мысль об относительном значении цитогенетического прогноза в каждом конкретном случае. С другой стороны, результаты хромосомного анализа очень важны при оценке эффективности новых терапевтических протоколов, поскольку цитогенетическая характеристика группы дает представление о доле случаев с благоприятным и неблагоприятным прогнозом.

Вторичные лейкозы. Характерен резко перестроенный кариотип. Число хромосом в большинстве случаев уменьшено: наблюдаются гиподиплоидные клоны с множественными хромосомными маркерами (Rowley et Le Beau, 1989; Pedersen-Bjergaard et al., 1993). Часто встречаются утраты или делеции длинного плеча хромосом 5 и/или 7, трисомия 8, а также транслокации t(3;21)(q26;q22), t(1;7)(q10;p10), t(11;16)(q23;p13) и t(16;21)(p12;q22), редко наблюдаемые при первичных лейкозах.

В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что изменения кариотипа при вторичных лейкозах различаются в зависимости от терапии по поводу первичной опухоли: если применяются алкилирующие агенты и лучевое лечение, то возникают аномалии хромосом 5 и/или 7; вторичные лейкозы и миелодисплазии у пациентов, ранее получавших ингибиторы топоизомеразы II, характеризуются перестройками хромосомных участков 11q23 и 21q22 (Pedersen-Bjergaard et al., 1991; Ratain et Rowley, 1992).

Основные особенности вторичных лейкозов приведены в табл. 21.

Изучение вторичных лейкозов имеет большое значение для понимания этиологии и патогенеза гемобластозов, т.к. эти лейкозы представляют собой злокачественные опухоли, индуцированные у человека определенными агентами, дозы и сроки введения которых известны. Интересно также, что целый ряд специфических хромосомных аномалий, характерных для лейкозов de novo: t(8;21), t(9;11), t(11;19), может быть обнаружен и при вторичных лейкозах.

Острый лимфобластный лейкоз. Клоны клеток с изменениями кариотипа обнаруживаются при ОЛЛ в 60-70% случаев. Для этого заболевания характерен широкий спектр хромосомных аномалий, их выявлено более 30.

Данные клинко-цитогенетических и молекулярных исследований при ОЛЛ подробно изложены в ряде оригинальных работ и обзоров [Nowell et Croce, 1990; Pui et al., 1990; Rowley et al., 1993; Heim et Mitelman, 1995].

Самые известные специфические аномалии при ОЛЛ представлены в табл. 22. Их частота вычислена Heim et Mitelman на большом сводном материале разных цитогенетических

Таблица 21

Цитогенетические типы вторичных лейкозов [Roulston et Le Beau, 1997]

Особенности кариотипа	-5/5q-, -7/7q-	t(11q23;V0); t(21q22;V)
Возраст	пожилы	молодой
Латентный период	не менее 5 лет	1 - 2 года
Предшествующий МДС	да	нет
Трехлинейная миелодисплазия	да	нет
Ответ на лечение	плохой	относительно благоприятный

Таблица 22

Основные повторяющиеся хромосомные перестройки при ОЛЛ

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

лабораторий мира - всего около 6 тыс. ОЛЛ.

Некоторые изменения кариотипа наблюдаются как при ОЛЛ, так и при других лимфоидных опухолях, другие - исключительно при ОЛЛ. К первым относятся, в частности, перестройки 14q11, 14q32, 11q23, делеции длинного плеча хромосомы 6 и короткого плеча хромосом 9, 12 и 17. Для острого лимфобластного лейкоза, но не для других лимфопролиферативных заболеваний, характерны транслокации t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), t(1;19)(q23;p13).

В-клеточные лейкозы и лимфомы отличаются от Т-клеточных по спектру хромосомных изменений. Так, для В-клеточных опухолей характерны перестройки, затрагивающие локусы иммуноглобулиновых генов: гена тяжелых цепей иммуноглобулинов (14q32), легких цепей каппа (2p12) и ламбда (2q11). В новообразованиях из Т-клеток нередко наблюдаются перестройки, затрагивающие гены Т-клеточных рецепторов (14q11, 7p15, 7q34).

Краткие молекулярно-генетические данные и частота основных хромосомных перестроек, характерных для В- и Т-клеточных ОЛЛ, приведены в табл. 23 и 24.

ОЛЛ детей и взрослых имеют некоторые цитогенетические различия. Это касается как числовых, так и структурных аномалий и демонстрируется цифрами, представленными в табл. 23. Кроме того, клоны клеток с числом хромосом

более 50 встречаются у детей в 25-30% случаев, а у взрослых их частота составляет, примерно, 5%. Этот вариант лейкоза имеет наиболее благоприятный прогноз: 60-80% больных переживает 5 лет с момента постановки диагноза [Heim et Mitelman, 1995; Secker-Walker et al, 1997]. Выявление структурных перестроек в клетках с числом хромосом более 50 имеет неблагоприятное прогностическое значение.

Влияние числовых изменений кариотипа на прогноз демонстрируется еще целым рядом примеров: обнаружение гиподиплоидных клонов определяет плохой прогноз: только 30% больных остается в живых по истечении 2 лет от момента постановки диагноза. Еще более неблагоприятен прогноз при острых лейкозах с так называемым окологиподиплоидным числом хромосом, при которых каждая клетка содержит 26-28 хромосом. В таких клетках вместо большинства хромосомных пар остается по одному гомологу; сохранено по два гомолога лишь в 10-й, 14-й, 18-й и 21-й парах [Pui et al., 1990]. Неблагоприятен также прогноз и в случаях с околотетраплоидными клонами. Следует отметить, что окологиподиплоидный и околотетраплоидные клоны клеток редко наблюдаются при ОЛЛ: не более 1-2% [Heim et Mitelman, 1995].

Остановимся на отдельных хромосомных аномалиях, характерных для ОЛЛ.

Таблица 23

Хромосомные транслокации, характерные для В-клеточных ОЛЛ [Sallan et al., 1997]

Транслокации	Гены	Частота
t(9;22)(q34;q11)	BCR, ABL	Взрослые - 20, дети - 4
t(1;19)(q23;p13)	E2A, PBX1	Взрослые - 2, дети - 5
t(11;V)(q23;V)	MLL, разные	Дети до 1 года - 75, остальные - 3
t(12;21)(p13;q22)	TEL, AML1	Взрослые - 3, дети - 25
t(17;19)(q22;p13)	E2A, HLF	<1
t(5;14)(q31;q32)	IL3, IgH	<1
t(8;14)(q24;q32)	MYC, IgH	2-5
t(8;22)(q24;q11)	MYC, IgL	<15

t(9;22)(q34;q11). Транслокация наблюдается у 20-30% взрослых и у 5-10% детей с ОЛЛ. При стандартном цитогенетическом анализе транслокация между 9 и 22 хромосомами при ОЛЛ не отличима от таковой при ХМЛ. На молекулярном уровне примерно в половине случаев у взрослых и у 20% детей изменения такие же, как при ХМЛ; у остальных пациентов разрыв

Таблица 24

Хромосомные транслокации, характерные для Т-клеточных ОЛЛ [Sallan et al., 1997]

Транслокации	Гены	Частота, %
t(1;14)(p32;q11)	TAL/SCL, TCR β	<1
t(8;14)(q24;q32)	MYC, TCR α	<1
t(11;14)(p15;q11)	TTG2, TCR δ	<1
t(7;10)(q34;q24)	HOX11, TCR γ	<1
t(7;9)(q34;q34)	TAN1, TCR β	<1

в хромосоме 22 (ген BCR) расположен ближе к центромере. Образующийся химерный белок - P190 BCR/ABL обладает более высокой протеинкиназной активностью, чем характерный для ХМЛ P210 BCR/ABL. Сочетание различных молекулярно-генетических методик (исследование ДНК, РНК, белка, применение методов FISH и ПЦР) позволяет выявить комплекс BCR/ABL чаще, чем хромосомный анализ выявляет Ph-транслокацию. Это важно для диагностики и мониторинга ОЛЛ.

В отличие от ХМЛ, при котором практически все клетки костного мозга содержат Ph-транслокацию в любой фазе болезни, костный мозг при Ph-позитивном остром лейкозе даже до начала лечения обычно содержит какое-то количество клеток без Ph-хромосомы (с нормальным кариотипом), а наступление ремиссии сопровождается уменьшением или полным исчезновением клона клеток с Ph-хромосомой. Прогноз при Ph-позитивном ОЛЛ крайне неблагоприятен. Анализ результатов лечения 4 тыс. взрослых с ОЛЛ, проведенный в 1994 г. известным немецким гематологом Hoelzer на основании данных литературы, показал, что средняя частота ремиссий составляет 73% (64-85%), в то время, как при Ph-позитивном варианте - лишь около 60%. Причем, средняя продолжительность ремиссии в этой группе не превышает 10 месяцев, т. е. она в два раза короче, чем в среднем при ОЛЛ. До 3 лет доживают не более 15% больных с t(9;22), тогда как по всем ОЛЛ эта цифра достигает 40%. Кооперированные (многоцентровые) исследования, проведенные во Франции и посвященные терапии ОЛЛ у взрослых, дали еще менее утешительные результаты (1996).

У детей показатели эффективности лечения ОЛЛ значительно выше, включая Ph-позитивный вариант. Сравнительно недавно

были получены данные, свидетельствующие о том, что трансплантация костного мозга во время 1- или 2-й ремиссий улучшает выживаемость при ОЛЛ с Ph-хромосомой [Hoelzer, 1994].

t(1;14)(p32-34;q11). Сравнительно редкая транслокация, характерная для Т-клеточного ОЛЛ. На молекулярном уровне обнаружено образование химерного гена из фрагментов двух генов - гена Т-клеточных рецепторов (локализованного в 14q11) и гена TAL(1p32). Интересно, что ген TAL экспрессируется только в лейкозных, но не в нормальных лимфоидных клетках-предшественниках. Лейкемогенная активность этого гена показана в экспериментах на мышах [Elwood, 1993].

Установлено, что приблизительно в 5-25% случаев при Т-клеточных острых лейкозах имеют место интерстициальные делеции в коротком плече хромосомы 1, в результате которых 5' конец гена TAL соединяется с другим геном - SCL, расположенным ближе к центромере, чем ген TAL. В результате образуется химерный ген SCL-TAL (Drow et al., 1993). Во всех этих случаях, так же, как и при t(1;14), происходит активация гена TAL. Такие лейкозы имеют относительно благоприятное течение: 3-летняя выживаемость составляет 60-70% [Sallan et al., 1997].

t(4;11)(q21;q23). Специфическая хромосомная транслокация, которую удается обнаружить при различных вариантах острого лейкоза (см. выше). Чаще всего она встречается при ОЛЛ и бифенотипических ОЛ. Эта транслокация наиболее характерна для детей младше 1 года (более 50% от общего количества ОЛ), при лейкозах у младенцев до полугода она обнаруживается еще чаще, а у детей старше года и у взрослых людей с ОЛЛ ее частота составляет 10-15%.

На молекулярном уровне при данной транслокации обнаружены разрывы в гене MLL (11q23) и AF4 (4q21). При слиянии образовавшихся фрагментов образуются химерные гены. Принято считать, что химерный ген, сформировавшийся на хромосоме 11, играет решающую роль в развитии лейкоза. В настоящее время разработаны очень чувствительные молекулярные зонды, позволяющие выявлять практически все перестройки гена MLL.

Лейкозы с транслокацией t(4;11) или с другими транслокациями, в которых участвует хромосомный район 11q23 (ген MLL), характеризуются высоким лейкоцитозом и крайне неблагоприятны в прогностическом отношении. У взрослых пациентов прогноз практически такой же, как при Ph-транслокации, у детей до года - еще хуже. Наихудший прогноз отмечен у младенцев до полугода, у которых острый лейкоз протекает с t(4;11). Так, медиана безрецидивного течения

ОЛЛ с $t(4;11)$ у детей до года составляет 7 месяцев, а у детей этого же возраста, но с другими изменениями кариотипа - 23 месяца. Необходимо отметить также, что эффективность лечения ОЛЛ с $t(4;11)$ у детей от 1 года до 9 лет значительно выше, чем у взрослых людей [Chen et al., 1993].

$t(8;14)(q24;q32)$. В 80-е годы ее относили к прогностически неблагоприятным хромосомным аномалиям. При современных методах лечения, оказавшихся высоко эффективными, обнаружение транслокации $t(8;14)(q24;q32)$ при ОЛЛ не предвещает неблагоприятного течения [Hoelzer, 1994].

$t(1;19)(q23;p13)$. Характерна для ОЛЛ, развивающихся из В-клеточных предшественников (пре-В-клеток), где ее частота достигает 25%. В среднем при ОЛЛ у взрослых она обнаружена в 1% случаев, у детей - в 5-6%. В США большинство больных с этой транслокацией - представители черной расы [Heim et Mitelman, 1995].

При молекулярно-генетических исследованиях транслокации $t(1;19)$ было установлено, что один из разрывов ($19p13$) проходит через ген E2A-регулятор (усилитель) работы иммуноглобулиновых генов. Второй разрыв расчленяет ген PRL (pre-B leukemia), локализованный в $1q23$. Из образовавшихся фрагментов формируется новый химерный ген со значительным онкогенным потенциалом, доказанным в экспериментальных исследованиях [Kamps et Baltimore, 1993].

Лейкозы с $t(1;19)$ характеризуются высоким лейкоцитозом и сравнительно неблагоприятны в прогностическом отношении: 45% детей переживает 3 года с момента постановки диагноза; этот показатель значительно ниже, чем при ОЛЛ с числом хромосом более 50.

$t(12;21)(p13;q22)$. В последние годы было показано, что, примерно, 25% В-клеточных лейкозов характеризуются наличием клеточных клонов с транслокацией $t(12;21)(p13;q22)$. На молекулярном уровне результатом транслокации является образование химерного гена из фрагментов генов TEL($12p13$) и AML1($21q22$). О гене AML1 мы уже говорили: он участвует в транслокации $t(8;21)$. TEL - сравнительно недавно выявленный ген, который сейчас интенсивно изучается. Вероятно, он может работать как онкоген и как ген-супрессор. Изменения этого гена находят, примерно, у половины пациентов с самыми различными гемобластозами, когда при стандартном цитогенетическом исследовании наблюдаются перестройки короткого плеча хромосомы 12.

Транслокация $t(12;21)$ почти неуловима при стандартном цитогенетическом исследовании. Она четко определяется с помощью FISH и

ПЦР. Эта аномалия имеет весьма благоприятное прогностическое значение: доля полных ремиссий приближается к 100%, подавляющее большинство больных переживает 5 лет.

Делеция 6q (6 q-). Примерно в 5-10% случаев ОЛЛ обнаруживают делеции длинного плеча хромосомы 6, иногда в сочетании с другими изменениями, реже - как единственную аномалию. Точки разрыва отличаются у разных больных, группируясь в двух сегментах: $6q15$ и $6q21$. Делеции обычно не концевые, а интерстициальные. Имеет ли эта аномалия самостоятельное прогностическое значение - не ясно, но сочетание ее с другими изменениями ухудшает прогноз. Ведутся поиски генов-супрессоров, расположенных в делетирующихся участках длинного плеча хромосомы 6.

Делеция 9p (9p-). Эта нередкая аномалия характерна, главным образом, для Т-клеточных лейкозов, протекающих с выраженной лимфаденопатией и спленомегалией. В половине случаев отмечен неблагоприятный прогноз. Группа лейкозов с делецией 9p клинически гетерогенна, и, возможно, молекулярные изменения различаются у разных пациентов. У многих больных делетировавшийся участок содержал locus интерфероновых генов, нередко наблюдалась гомозиготность [Diaz et al., 1990; Neuman et al., 1993]. Клиническое значение 9p- и ее роль в патогенезе не ясны.

Прогностическое значение результатов цитогенетического анализа при ОЛЛ наглядно иллюстрирует табл. 25.

Таблица 25
Прогностическое значение неслучайных хромосомных аномалий при ОЛЛ у детей
(Heim et Mitelman, 1995)

Особенности кариотипа	Доля больных, %, переживших	
	2 года	5 лет
Число хромосом >50	90	80
Нормальный кариотип	70	60
$t(1;19)(q23;p13)$	50	40
$t(9;22)(q34;q11)$	40	30
$t(8;14)(q24;q32)$	40	30
Перестройки $11q23$	30	20
Гиподиплоидные клоны	30	20
$t(4;11)(q21;q23)$	20	20

Более новые данные о прогностическом значении отдельных специфических хромосомных транслокаций можно почерпнуть табл. 26. Видно, что показатели эффективности терапии в этих таблицах не точно совпадают: более поздняя таблица демонстрирует лучшие результаты.

Заканчивая раздел, посвященный острому лейкозам, следует повторить, что хромосомный анализ, имея большое значение для прогноза и

мониторинга лечения, не является абсолютно независимым диагностическим критерием. Он должен применяться в комплексе с другими клинико-лабораторными исследованиями. Существенный интерес представляют данные Heim et Mitelman (1992), показавшие, что почти все изменения кариотипа, характерные для ОНЛЛ, могут (правда, значительно реже) наблюдаться при ОЛЛ.

Таблица 26

Прогностическое значение специфических хромосомных транслокаций при ОЛЛ
[Sallan et al., 1997]

Аномалии	Доля больных, %, с длительным безрецидивным течением	
	Дети (5 лет)	Взрослые (3 года)
t(12;21)(p13;q22)	85 - 90	85 - 90
t(9;22)(q34;q11)	20 - 25	<10
t(1;19)(q23;p13)	70 - 80	20 - 40
t(4;11)(q21;q23)	10 - 30	10 - 20
t(8;14)(q24;q32)	70 - 85	50 - 60
t(2;8)(q12;q24)	70 - 85	50 - 60
t(8;22)(q24;q11)	70 - 85	50 - 60
t(1;14)(p34;q11)	60 - 70	?

Нет полной ясности в вопросе о том, почему результаты одинакового лечения групп больных с идентичными хромосомными изменениями могут сильно различаться в разных клиниках. Конечно, результаты терапии определяются всем комплексом лечебных мероприятий, включая такие важные моменты, как профилактика инфекций и борьба с ними, коррекция гемостаза, замещение кровопотери и т. д.

Опухоли лимфатической системы

Лимфатические опухоли - первые, где были расшифрованы генетические события, стоящие за специфическими хромосомными транслокациями. Именно изучение лимфом позволило убедительно показать ключевую роль хромосомных транслокаций в развитии злокачественных опухолей. Перечень основных хромосомных аномалий, характерных для лимфом, суммирован в табл. 27.

Эта таблица показывает, что существует определенный спектр хромосомных изменений, наблюдаемый в опухолях лимфоидной природы, однако нет строгого параллелизма между морфологическими и цитогенетическими особенностями этих новообразований. Лишь отдельные повторяющиеся аномалии кариотипа ассоциированы с особенностями гистологической картины, то есть их можно наблюдать с более высокой частотой в определенных типах лимфом. Например, транслокация t(8;14) наблюдается, примерно, в 90% случаях при лим-

фоме Беркитта, транслокация t(14;18) - в большинстве фолликулярных лимфом, транслокация t(11;14) обнаружена в 50-70% случаев при лимфоме мантийной зоны, транслокация t(2;5) характерна для крупноклеточных анапластических лимфом (50% случаев). Но все названные транслокации с небольшой частотой обнаруживаются при различных лимфопролиферативных процессах.

К настоящему времени имеются данные о кариотипе нескольких тысяч лимфопролиферативных заболеваний [Mitelman, 1994]. В большинстве случаев обнаружены клоны клеток с несколькими хромосомными перестройками, позволяющими предположить, что исследование проводилось уже на сравнительно поздней стадии развития опухоли.

Сведения о цитогенетической характеристике лимфом и молекулярно-генетических событиях, приводящих к их развитию, изложены в ряде публикаций (Fleischman et al., 1989; Nowell et Croce, 1990; Offit et al., 1991-1993; Knutsen, 1998).

Как уже говорилось в предыдущей главе, изменения кариотипа при В- и Т-клеточных опухолях имеют определенные различия. При В-клеточных лимфомах активация протоонкогенов нередко происходит за счет переноса их к регуляторным элементам иммуноглобулиновых генов. При этом резко усиливается продукция белков, кодируемых онкогенами; этот процесс выходит из-под контроля регулирующих воздействий организма - носителя опухоли, т.е. дерегулируется. Другими словами: в норме существует зависимость между фазами клеточного цикла и синтезом определенных белков, в опухоли эта зависимость нарушается, что приводит к усиленной пролиферации клеток и блоку их дифференцировки.

Остановимся на клиническом значении отдельных изменений кариотипа, характерных для лимфом.

t(8;14)(q24;q32). Эта аномалия наблюдается в 90% случаев лимфомы Беркитта и сравнительно редко обнаруживается при так называемых "неберкиттовских" лимфомах. Ее считают характерной для мелкоклеточных лимфом с нерасщепленными ядрами. Частота этой аномалии при лимфопролиферативных заболеваниях в нашей стране не превышает 5%. При данной транслокации происходит перемещение гена MYC, расположенного в 8q24, в область гена тяжелых цепей иммуноглобулинов, локализованного в 14q32. В результате этого события повышается продукция белка (транскрипционного фактора), кодируемого геном MYC.

Изменения кариотипа, характерные для лимфом		
Аномалии кариотипа	Вовлеченные гены	Морфоиммунологические особенности
1p и 1q	?	В- и Т-клеточные лимфомы; Лимфогранулематоз
t(2;3)(p12;q27)	IGK;LAZ3	Диффузные крупноклеточные или фолликулярные лимфомы (В-клеточные)
t(2;5)(p23;q35)	ILK;NPM	Ki-1 лимфомы
t(2;8)(p12;q24)	IGK;MYC	Лимфомы Беркитта
t(2;18)(p12;q21)	IGK;FVTI	Фолликулярные В-клеточные лимфомы
+3	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы
Перестройки 3q	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы, лимфогранулематоз
t(3;14)(q27;q32)	LAZ3;IGH	Диффузные крупноклеточные или фолликулярные лимфомы (В-клеточные)
t(3;22)(q27;q11)	LAZ3;IGL	Диффузные крупноклеточные или фолликулярные лимфомы (В-клеточные)
Перестройки 6p	?	Т-клеточные лимфомы
del(6q)	?	Различные лимфомы (в основном В-клеточные), лимфогранулематоз
+7	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы
Перестройки 7q	?	Лимфогранулематоз
t(8;14)(q24;q32)	MYC;IGH	Лимфомы Беркитта
t(8;22)(q24;q11)	MYC;IGL	Лимфомы Беркитта
Перестройки 9q	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы
t(9;14)(p13;q32)	?;IGH	Мелкоклеточные В-лимфомы
t(10;14)(q24;q32)	LYT10;IGH	Различные В-клеточные лимфомы
del(11q)	?	Мелкоклеточные В-лимфомы
t(11;14)(q13;q32)	BCL1/PRAD1;IGH	Мелкоклеточные или centroцитарные В-лимфомы
t(11;18)(q21;q21)	?	Мелкоклеточные В- и MALT- лимфомы
+12	?	Мелкоклеточные или диффузные крупноклеточные В-лимфомы
Перестройки 12p	?	Лимфогранулематоз
Перестройки 13p	?	Лимфогранулематоз
Перестройки 14q11	TCRA;TCRD	Т-клеточные лимфомы
del(14q)	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы
Перестройки 14q32	IGH	Различные В-клеточные лимфомы, лимфогранулематоз
t(14;18)(q32;q21)	IGH;BCL2	Фолликулярные или диффузные крупноклеточные В-лимфомы
+18	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы
t(18;22)(q21;q11)	BCL2;IGL	Фолликулярные В-клеточные лимфомы
-X/+X/-Y	?	Различные В- и Т-клеточные лимфомы

Необходимо отметить, что 14q32 - самая частая область перестроек кариотипа, обнаруживаемых при В-клеточных опухолях.

t(11;14)(q13;q32). Эту транслокацию считают характерной для зрелоклеточных (лимфоцитарных) лимфом и ХЛЛ. Частота ее сравнительно невелика при расчете на всю группу лимфом (около 5%) и имеет некоторые географические различия.

В последние годы было показано, что t(11;14) характерна для лимфомы мантийной зоны, где ее удается обнаружить в 50 - 70% случаев [Weisenburger et Armitage, 1996].

Установлено, что при t(11;14) происходит активация гена BCL1, расположенного в 11q13, в результате его переноса в область гена тяжелых цепей иммуноглобулинов (14q32). Молекулярно-генетические исследования показали также, что при транслокации (11;14) наблюда-

ется повышенная экспрессия белка циклин D1. Обнаружение этого маркера является более чувствительным тестом, чем хромосомный анализ. Это очень важно в диагностическом и дифференциально-диагностическом отношении. Согласно последним данным, сочетание различных методов исследования позволяет обнаружить транслокацию t(11;14) в 80-95% случаев лимфомы мантийной зоны. При множественной миеломе и хроническом лимфолейкозе эта аномалия наблюдается значительно реже.

Не исключено, что работы, опубликованные в 70-80-е годы, отражают не истинную частоту t(11;14) при отдельных лимфопролиферативных процессах, а трудности в диагностике лимфомы мантийной зоны. Истинная частота t(11;14) при разных лимфоидных опухолях устанавливается сейчас, когда приобретен опыт в диагностике лимфомы мантийной зоны и в

дифференциальной диагностике между этой и другими морфологически сходными новообразованиями.

t(14;18)(q32;q21). Эта аномалия специфична для фолликулярных лимфом. В нашей стране она наблюдается редко: в 10% фолликулярных лимфом и, примерно, в 3% всех лимфосарком. В США эта аномалия отмечена в 80% фолликулярных лимфом и в 20% диффузных; в Западной Европе частота ее, примерно, в два раза ниже [Johansson et al., 1991].

Транслокация (14;18) приводит к активации гена BCL2. Одной из важнейших функций этого гена является его участие в регуляции запрограммированной клеточной смерти (апоптоза). BCL2 блокирует апоптоз, что очень существенно для процесса злокачественной трансформации клетки. Интересно, что, примерно в 75% случаев миеломной болезни обнаружена повышенная продукция белка BCL2, но перестройки хромосомного участка 18q21, где расположен этот ген, на цитогенетических препаратах не видны. Вероятно, в этих случаях происходят субмикроскопические транслокации или включаются другие механизмы активации BCL2.

При Т-клеточных лимфомах происходит активация различных протоонкогенов (нередко гена MYC) за счет их перемещения к генам Т-клеточных рецепторов. Для этого типа новообразований характерны следующие хромосомные изменения: t(7;7)(q34;V), t(7;V)(p14;q35), inv(7)(p14q35), del(9)(p13-22), t(9;17)(q34;q23), t(14;V)(q11;V), inv(14)(q11;q32).

Основные аномалии кариотипа, характерные для различных лимфопролиферативных заболеваний, приведены в табл. 28 и 29.

Таблица 28
Изменения кариотипа, характерные для отдельных В-клеточных хронических лимфо-пролиферативных заболеваний

Диагноз	Аномалии кариотипа	Частота, %
ХЛЛ	+12	30
	14q+	20
	del/t	20
	6q-	10
Пролимфоцитарный лейкоз	14q+	50
Волосатоклеточный лейкоз	14q+	20
	6q-	10
	14q-	10
Макроглобулинемия Вальденстрема	Мало данных	
Множественная миелома	Перестройки	70
	хр.1	
	14q+	50
	6q-	10

Некоторые основные выводы о клиническом значении результатов хромосомного анализа при лимфо-пролиферативных заболеваниях изложены Julisson et al.(1990). Эти выводы сделаны на основании обобщения результатов работы пяти европейских гематологических центров:

1. Больные с нормальным кариотипом имеют более благоприятный прогноз, чем пациенты с клональными изменениями: средняя выживаемость 15 лет против 7,7 месяцев.
2. При клональных изменениях высокая доля аномальных метафаз прогностически менее благоприятна, чем низкая.
3. Резко перестроенный кариотип прогностически менее благоприятен, чем кариотип с единичными нарушениями.
4. Трисомия 12 как единственная аномалия - свидетельство неблагоприятного прогноза. С другой стороны, трисомия 12 в сложном кариотипе так же неблагоприятна, как другие и аномалии.

Таблица 29
Изменения кариотипа, характерные для Т-клеточных лимфо-пролиферативных заболеваний

Диагноз	Аномалии кариотипа	Частота, %
ХЛЛ	inv(14)(q11q32)	40
	Перестройки 14q11	50
Пролимфо-цитарный лейкоз	del/t(7q34-36)	15
	6q-	25
АТЛ-лимфома	Перестройки 14q32	20
	Перестройки 14q11	15
Кожная лимфома	t(2p)	10
	6q-	10
Mycosis fungoides	6q-	20
	14q+	20
Синдром Сезари	14q+	20
	del/t(2p)	30
	6q-	20
	14q+	20

Хронический лимфолейкоз

Различают В- и Т-клеточный варианты этого заболевания. Первый наблюдается значительно чаще.

Изучение особенностей кариотипа В-ХЛЛ стало возможным только после введения веществ, стимулирующих митотическую активность В-клеток. Обычно в каждом случае применяется несколько стимуляторов, то-есть производится посадка нескольких культур из крови или других пораженных органов с различными стимуляторами. В отдельных культурах удается выявить клоны аномальных клеток. Иногда в разных клеточных культурах, полученных от одного больного и подвергнутых действию разных стимуляторов, обнаруживаются разные клоны

клеток. Наиболее характерны: дополнительная хромосома 12, делеция длинного плеча хромосом 6 и 13, различные перестройки длинного плеча хромосомы 11. В ряде случаев наблюдаются различные транслокации с участием 14q32, столь характерные для В-клеточных новообразований. Из них самыми частыми являются $t(11;14)(q13;q32)$, $t(2;14)(p13;q32)$ и $t(14;19)(q32;p13)$.

Перечисленные изменения кариотипа отличаются друг от друга в прогностическом отношении. Так, наличие дополнительной хромосомы 12, перестройки 11q и делеции 17p прогностически неблагоприятны [Neilson et al., 1997; Jefferi et al., 1997; Julisson et Merup, 1998].

Необходимо подчеркнуть, что трисомию 12 не всегда удается обнаружить при стандартном цитогенетическом исследовании, поскольку клетки с этой аномалией нередко имеют низкий митотический индекс. Следовательно, заключение о прогнозе у больного ХЛЛ невозможно без применения FISH с зондами на хромосому 12.

Делеции длинного плеча хромосомы 13 обычно наблюдаются у пациентов с относительно благоприятным прогнозом [Dohner et al., 1997].

Для Т-клеточного ХЛЛ характерна инверсия хромосомы 14-inv(14)(q11;q32).

Миеломная болезнь

Миеломная болезнь является весьма сложным объектом для цитогенетического исследования, поэтому хромосомные изменения при этом заболевании сравнительно плохо изучены. Основные характерные аномалии кариотипа показаны в табл. 30.

Таблица 30
Изменения кариотипа, характерные для миеломной болезни

Аномалии кариотипа	Частота, %
Перестройки хромосомы 1	40-50
14q+	20-25
6q-	1-12
7q-	6-40
$t(9;22)(q34;q11)$	<5
$t(8;14)(q24;q32)$	<5
$t(14;18)(q32;q21)$	<5
17p+ или i(17q)	<5

Из табл. 30 видно, что по характеру хромосомных аномалий миеломная болезнь очень близка к другим В-клеточным новообразованиям. В самые последние годы появились результаты цитогенетического исследования больших серий пациентов с множественной миеломой. Выделяют две группы с разным прогнозом. Для первой характерны клоны гипердиплоидных клеток с трисомиями 5, 7, 9 и множественными

структурными перестройками. Большинство из них, характерно для В-клеточных лимфом. Во вторую группу отнесены случаи с гиподиплоидными, псевдодиплоидными и околотриплоидными клонами, где также наблюдаются множественные структурные перестройки. В прогностическом отношении первая группа существенно лучше второй: медиана выживаемости в ней составляет 36,8 месяцев против 18,2 месяцев. Подчеркивается неблагоприятное прогностическое значение делеций 4q, а также перестроек 11q13 и 14q22 [Smadia et al., 1998].

Следует отметить, что после длительной цитостатической терапии у больных может развиваться гематологическая картина, требующая проведения дифференциальной диагностики между токсическим поражением костного мозга и приближением вторичного лейкоза. Результат хромосомного анализа очень важен в такой ситуации, поскольку вторичные лейкозы имеют характерные изменения кариотипа.

Лимфогранулематоз

Для этого заболевания характерно наличие в лимфатических узлах клонов полиплоидных клеток с множественными числовыми и структурными изменениями кариотипа. Количество аномальных клеток обычно не превышает 50%, остальные имеют нормальный кариотип.

Лимфогранулематоз сравнительно плохо изучен цитогенетически, поскольку из этой опухоли трудно получить пригодные для анализа хромосомные препараты. Имеется лишь несколько оригинальных публикаций [Schouten et al., 1989; Tily et al., 1991 и др.]. По характеру изменений кариотипа можно отметить черты сходства с так называемыми "неходжкинскими" лимфомами: маркерные хромосомы возникают чаще всего за счет структурных перестроек 1p, 1q, 3p, 3q, 6q (обычно делеции) и 12p; нередко наблюдаются трисомии 1, 3, 7, 8 и 21.

Отдельные авторы подчеркивают, что по типу хромосомных аномалий лимфогранулематоз ближе к Т-клеточным опухолям, чем к В-клеточным.

Цитогенетические изменения, характерные именно для лимфогранулематоза, которые отличали бы его от других опухолей, не выявлены. Однако некоторые исследователи отмечают своеобразие нарушений кариотипа при данном заболевании: моносомии и делеции хромосомы 13, а также перестройки, затрагивающие 2p25, 12p11-13, 13p11-13, 14p11, 15p11-13, 20q12-13.

Миелодисплазии

Примерно у 50% больных с миелодисплазиями обнаружены клоны аномальных клеток. Изменения кариотипа весьма разнообразны,

спектр их близок к спектру хромосомных изменений, наблюдаемых при ОНЛЛ, особенно вторичных. Часто наблюдаются утрата хромосом 5 и 7, появление дополнительной хромосомы 8 и делеции длинного плеча хромосом 5, 7 и 20.

Есть данные о том, что доля случаев, в которых удается обнаружить клоны анеуплоидных клеток, существенно различается в зависимости от фазы болезни: на относительно ранних этапах миелодиспластических состояний эта частота составляет 20-30%, при появлении признаков трансформации - 40-60%, и достигает 80-90% при трансформации в ОМЛ [Heim et Mitelman, 1995; Roulston et LeBeau, 1997].

Транслокации, специфичные для первичных ОНЛЛ, при миелодисплазиях наблюдаются редко. Есть сообщения о повторяющихся транслокациях $t(3;3)(q21;q26)$ и $t(3;21)(q26;q22)$ [Heim, 1992]. Основные хромосомные аномалии, характерные для различных миелодисплазий, представлены в следующем виде.

-7 или 7q-	-5 или 5q-
$t(1;7)(q10;p10)$	$del(12)(p12-p13)$
$t(2;11)(p13;q23)$	$del(13)$ (обязательно с включением 13q14)
$t(6;9)(p23;q34)$	$del(20)(q11q13)$
+8	$t(1;3)(p36;q21)$

Перечисленные хромосомные аномалии наблюдаются при различных миелодисплазиях, но частота их несколько различается (табл. 31).

Таблица 31
Частота характерных аномалий кариотипа при различных миелодиспластических синдромах, %
[Heim et Mitelman, 1995]

Аномалии	RA	RARS	RAEB(T)	CMML
Перестройки 3(q21q26)	1-5	<1	1-5	<1
-5	5-10	5-10	10-15	1-5
5q-	50	25	25	20
-7	10-15	10	25	20
7q-	1-5	1-5	5-10	5-10
+8	20	30	20	20
11q-	1-5	10	1-5	1-5
20q-	5-10	10-15	5-10	1-5

Обнаружение клонов клеток с аномальным кариотипом при МДС имеет важное теоретическое и клиническое значение, поскольку свидетельствует об их опухолевой принадлежности.

Остается не вполне ясным вопрос о прогностическом значении хромосомных изменений при миелодисплазиях. Опыт большинства исследователей свидетельствует о том, что обнаружение клона с изменениями кариотипа предвещает скорую трансформацию в острый лейкоз, однако существует и точка зрения, что не

все цитогенетические находки имеют одинаковое прогностическое значение. Так, относительно благоприятным считается прогноз в случаях, когда выявлены клоны клеток с единственной перестройкой: 5q- или 20q- [Heim, 1992; Wattel et al., 1993]; с другой стороны, при любом варианте МДС обнаружение клона с множественными хромосомными аномалиями является крайне неблагоприятным (табл. 32).

Таблица 32
Продолжительность жизни больных МДС с различными изменениями кариотипа
(Sanz et Sanz, 1992)

Кариотип	Исследовано больных	Средняя выживаемость, мес.
Нормальный	40	26
Одна аномалия	35	20
в том числе:		
5q-	4	65
-7 или 7q-	6	13
+8	6	4
другие	19	55
Множественные аномалии	18	4
Всего:	93	19

В 1997 г. были опубликованы материалы международного совещания, посвященного диагностике и прогнозированию МДС. На основании ретроспективной оценки длительности заболевания до перехода в острый лейкоз и общей продолжительности жизни больных, с учетом результатов цитогенетического анализа, последний был расценен как важнейший прогностический признак. В группу с благоприятным прогнозом отнесены случаи с единичными хромосомными аномалиями: -Y, 5q- и 20q-. Неблагоприятное течение наблюдалось в случаях с множественными нарушениями (3 или более перестроек кариотипа) и при изменениях хромосомы 7 (делеции длинного плеча, моносомии). Другие аномалии определяли промежуточный прогноз. Средняя длительность заболевания до перехода в острый лейкоз составила по группам: 9,4; 0,4 и 1,1 - 3,3 года соответственно. Авторы предлагают использовать эти данные при оценке эффективности новых схем лечения миелодисплазий.

Синдром 5q-. Это рефрактерная сидеробластная анемия у пожилых больных, преимущественно женщин. Характерна макроцитарная анемия, резистентная к лечению. Число тромбоцитов нормально или повышено, но мегакарициты в костном мозге диспластичны. Клиническое течение сравнительно медленное. Трансформации в острый лейкоз наблюдаются приблизительно в 10%. Синдром был впервые описан van den Berghe et al. в 1974-1985 гг.

Делеции длинного плеча хромосомы 5 наблюдаются и при других гематологических заболеваниях.

Предполагают, что делетирующий участок содержит один или более генов-супрессоров. В этом направлении ведутся интенсивные исследования. До настоящего времени не была подтверждена важная роль в патогенезе рефрактерной анемии ни одного из изучавшихся генов - кандидатов на роль гена-супрессора.

Синдром моносомии 7. Встречается чаще у мальчиков до 4 лет. Характерна спленомегалия, часто лейкоцитоз с моноцитозом, тромбоцитопения, анемия. Прогноз плохой.

При миелодисплазиях со сложными изменениями кариотипа нередко наблюдается делеция короткого плеча хромосомы 17 (17p-). Как правило 17p- сочетается с двумя или более хромосомными аномалиями и имеет неблагоприятное прогностическое значение.

В 75% случаев в присутствии маркера 17p- наблюдается дисгранулоцитопоз в виде псевдопельгеровских гиподольчатых ядер и вакуолизации цитоплазмы [Fenaux et al., 1996].

В 1997 г. были опубликованы материалы международного совещания, посвященного диаг-

ностике и прогнозированию МДС. На основании ретроспективной оценки длительности заболевания до перехода в острый лейкоз и общей продолжительности жизни больных, с учетом результатов цитогенетического анализа, последний был расценен как важнейший прогностический признак. В группу с благоприятным прогнозом отнесены случаи с единичными хромосомными аномалиями: -Y, 5q- и 20q-. Неблагоприятное течение наблюдалось в случаях с множественными нарушениями (3 или более перестроек кариотипа) и при изменениях хромосомы 7 (делеции длинного плеча, моносомии). Другие аномалии определяли промежуточный прогноз. Средняя длительность заболевания до перехода в острый лейкоз составила по группам: 9,4; 0,4 и 1,1-3,3 года соответственно. Авторы предлагают использовать эти данные при оценке эффективности новых схем лечения миелодисплазий. Приблизительно в то же время были опубликованы результаты применения интенсивной химиотерапии у 90 больных МДС [Wattel et al., 1997]. Установлено, что особенно эффективным лечение оказалось в группе RAEB, в случаях, где не выявлены прогностически неблагоприятные хромосомные аномалии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заклячая разделы *патогенеза, цитогенетики и этиологии гемобластозов*, можно сказать следующее. Анализ условий, способствующих развитию лейкозов, результаты цитогенетических исследований, выявившие частые хромосомные изменения в лейкозной клетке, опыты по переносу ДНК из этой клетки в нормальную, ведущему к ее опухолевой трансформации, развитие лейкозного процесса в соответствии с законами опухолевой прогрессии - все это свидетельствует о том, что лейкозы имеют генетическую, мутационную основу. При этом речь идет о специфических для отдельных форм лейкоза мутациях, касающихся определенных хромосом и определенных участков в них, т. е. определенных генов, ответственных за пролиферацию клеток, с одной стороны, и за отдельные этапы дифференцировки конкретных ростков в кроветворении, - с другой. Такие специфические мутации возникают лишь в условиях неспецифической повышенной мутабельности еще неопухолевых клеток, вызванной либо действием радиации, либо химическими факторами, либо вирусными инфекциями, либо на-

следственными болезнями или наследственными дефектами кроветворной ткани. В свою очередь, опухолевая нестабильность генотипа, характеризующая уже возникшие мутантные опухолевые клетки, приводит к повторным мутациям, обуславливающим отбор автономных субклонов и опухолевую прогрессию.

Таким образом, развитие лейкоза можно представить схематически как цепь событий, начинающихся с предшествующего лейкозу этапа повышенной мутабельности нормальных кроветворных клеток латентного периода, в течение которого в одной из таких нормальных клеток появляется специфическая мутация и активируется определенный ген (или гены), ведущий к возникновению опухолевой клетки, к ее безграничной моноклональной пролиферации, означающей развитие доброкачественной стадии лейкоза в каком-то из кроветворных ростков. Затем уже в опухолевой клетке случаются повторные мутации, происходит отбор специфически мутировавших автономных субклонов, ведущий к прогрессии и становлению злокачественной опухоли.

ВОПРОСЫ КЛАССИФИКАЦИИ ЛЕЙКОЗОВ

Все лейкозы делятся на острые и хронические. Определяющим признаком является не скорость течения процесса, а форма клеток, составляющих опухоль: если основная масса этих клеток представлена бластами, то речь идет о лейкозе остром, напротив, при хронических лейкозах основной массой опухолевых клеток являются зрелые и созревающие элементы.

В основном острые лейкозы получили названия по нормальным бластам соответствующих ростков кроветворения: лимфобластный, миелобластный, эритробластный, монобластный. Однако клетки опухоли только частично соответствуют своим нормальным предшественницам. Ряд лейкозов не может быть связан с каким-то определенным исходным клеточным элементом, или имеет признаки нескольких ростков. Острый промиелоцитарный лейкоз составляют клетки с чертами базофила, тучной клетки и нейтрофила. Целый ряд острых лейкозов имеет признаки двух ростков: монобласта и миелобласта, миелобласта и эритрокариоцитов. Кроме того, существуют острые лейкозы, клетки которых, будучи бластными, не имеют признаков принадлежности к какому-либо ростку кроветворения. В этих случаях речь идет о недифференцируемом остром лейкозе. Принадлежность бластных клеток к тому или иному ростку кроветворения определяется либо при обычной окраске: острые - эритромиелоз, плазмобластный, мегакариобластный, либо при кариологическом, гистохимическом, иммунофенотипическом исследованиях.

Разработка методов дифференцированной терапии острых лейкозов потребовала дальнейшей детализации их форм. При этом учитываются наряду с описанными признаками и спе-

цифические генные нарушения, и связанные с ними изменения структуры белков.

Определенный отпечаток на классификацию накладывает и возраст больных. Как и при остальных опухолях человека, лейкозы детей (в конкретном возрастном интервале) не соответствуют аналогичным лейкозам взрослых или стариков по результатам лечения - нуждаются в иных специфических для них программах терапии. Значительная часть лейкозов привязана к определенному возрастному периоду, не встречаясь практически или вообще в возрасте ином. Сказанное относится к детскому варианту острого лимфобластного лейкоза, миеломной болезни, хроническому лимфолейкозу, хроническому моноцитарному лейкозу и некоторым другим формам.

В 1976 г. была разработана классификация острых лейкозов гематологами Франции, Америки и Британии (FAB-классификация). Эта классификация не внесла принципиальных изменений в представление об острых лейкозах, но получила достаточно широкое распространение. В табл. 33, наряду с другими, приведена FAB-классификация нелимфобластных и лимфобластных острых лейкозов. Принципиально новым в классификационном плане было выделение в особую группу ряда хорошо известных состояний, многие из которых на этапе первых проявлений не поддаются точной идентификации в качестве нозологической формы. Речь идет о миелопозитической дисплазии, в которую наряду с неидентифицируемыми рефрактерными к терапии анемиями попали и хорошо определяемые состояния - малопроцентный острый лейкоз, хронический моноцитарный лейкоз.

Подробная классификация различных гемобластозов дана в соответствующих разделах руководства.

ОСТРЫЕ ЛЕЙКОЗЫ

ВВЕДЕНИЕ

Еще со времен Гиппократов известны описания больных с увеличением размеров селезенки или лимфатических узлов, симптомы болезни у которых можно было предположительно связать с анемией, лейкопенией или тромбоцитопенией. Однако как нозологическая форма острый лейкоз был выделен лишь в середине XIX века, когда в 1845 г. Р. Вирхов представил описания клинических случаев и данные аутопсии. Термин "лейкемия" (белокровие) был также предложен Р. Вирховым из-за того, что у части

больных кровь была белесоватого оттенка. В монографии 1856 г. Р. Вирхов уже подразделил лейкозы на спленогенные (миелоидные по современной терминологии) и лимфатические. П. Эрлих в 1877 г., еще будучи студентом, использовал для микроскопирования новую окраску клеток, что позволило ему выделить лимфоцитарную, миелоцитарную и бластную форму заболевания. Миелобласт был описан в 1900 г. Нагели, который затем разделил бластные клетки на миелоидные и лимфоидные. Моноци-

тарный подтип острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) был описан Решадом и Шиллинг-Торгау в 1913 г. Промиелоцитарный вариант был выделен значительно позже - в 1957 г. Л. Хильштадом.

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы крови - гемобластозов. Острые лейкозы характеризуются поражением костного мозга морфологически незрелыми - бластными - кроветворными клетками. В дальнейшем или с самого начала может иметь место инфильтрация бластными клетками различных тканей и органов. Все острые лейкозы клональны, то есть возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки, которая может относиться как к очень ранним, так и к коммитированным в сторону различных линий кроветворения клеткам-предшественникам. Принадлежность бластных клеток к той или иной линии кроветворения, степень их дифференцировки в какой-то мере определяет клиническое течение острого лейкоза, программу терапии, эффективность проводимого лечения и соответственно прогноз заболевания.

До появления современных цитостатических препаратов и программ лечения острый лейкоз был быстропрогрессирующим и фатальным во

всех случаях заболеванием со средней продолжительностью жизни пациентов 2,5-3 месяца. Причиной смерти в большинстве случаев оказывались тяжелые инфекционные осложнения и геморрагический синдром из-за тромбоцитопении и агранулоцитоза, которые являются следствием подавления и вытеснения нормального кроветворения опухолевым.

Острый лейкоз довольно редкое заболевание - лишь 3% от всех злокачественных опухолей человека. Заболеваемость острыми лейкозами составляет в среднем 5 случаев на 100 000 населения в год, 75% всех случаев диагностируется у взрослых, среднее соотношение миелоидных и лимфоидных лейкозов равно 6:1.

В детском возрасте 80-90% всех острых лейкозов это лимфобластные формы (ОЛЛ), а после 40 лет наблюдается обратное соотношение - у 80% больных острым лейкозом выявляется нелимфобластные варианты заболевания (ОНЛЛ - острые нелимфобластные лейкозы). Острые миелоидные лейкозы - это болезни пожилых людей, средний возраст при этом заболевании составляет 60-65 лет. При остром лимфобластном лейкозе средний возраст - около 10 лет [6, 102, 138].

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Начало острых лейкозов не имеет клинической картины: больные чувствуют себя совершенно здоровыми вплоть до повсеместного расселения опухолевых клеток по кроветворной системе и развития органных нарушений, связанных с опухолевыми разрастаниями. Появление лейкозных клеток в костном мозге приводит к угнетению нормального кроветворения. При острых лейкозах обычно развиваются инфекции, обусловленные уменьшением числа гранулоцитов в крови, появляется кровоточивость из-за тромбоцитопении, отмечаются слабость, сердцебиение и одышка в связи с анемией. Все эти признаки могут быть лишь поводом для обращения к врачу, но сами по себе они не имеют диагностической ценности и не являются ранними признаками опухолевого роста, хотя нередко больной утверждает, что до их появления он чувствовал себя совершенно здоровым. Диагноз острого лейкоза может быть установлен только морфологически - по обнаружению несомненно бластных опухолевых клеток в крови или костном мозге.

Сколько-нибудь характерного начала, каких-либо специфических внешних признаков, свойственных острым лейкозам, найти не удастся. Более того, трудно представить состояние, которое не могло бы быть клиническим началом

острого лейкоза. Катар верхних дыхательных путей, ангина, воспаление легких, картина менингита или опухоли спинного мозга, упорный тяжелый радикулит, увеличение лимфатических узлов, печени, селезенки, появление опухоли в глубине подкожной клетчатки или в коже, отчетливая связь появившихся опухолей (чаще лимфатических узлов) с инфекцией, болезненность или полная безболезненность (последнее бывает чаще, но отнюдь не всегда) увеличенных лимфатических узлов, боли в костях, беспричинный субфебрилитет или высокая лихорадка, боли в суставах с характерной для ревматоидного артрита утренней скованностью - все эти явления при острых лейкозах можно встретить в качестве первого признака, заставившего больного обратиться к врачу. При любом неясном или затянувшемся заболевании необходимо проводить исследование крови (полный анализ с подсчетом формулы крови, числа тромбоцитов и ретикулоцитов): оно может обнаружить явные или косвенные признаки острого лейкоза.

Гематологическая картина острых лейкозов может быть двоякого рода. При выходе бластных клеток в кровь в ней встречаются одновременно молодые - бластные - клетки и зрелые гранулоциты, моноциты, лимфоциты. Однако в мазке крови содержание промиелоцитов и мие-

лоцитов при острых лейкозах невелико и «пропал» в формуле между молодыми и зрелыми клетками сохраняется [Бейер В.А.]. Если бластные клетки не обрели еще способность к выходу из костного мозга в периферическую кровь, но уже привели к каким-то нарушениям, то их достаточно много в костном мозге. При этом, как правило, будут нарушения в составе клеточных элементов крови: лейкопения, анемия, тромбоцитопения либо панцитопения. Следует считать обязательным пунктирное исследование костного мозга во всех случаях повторно обнаруживаемых непонятных цитопений. Лучше одновременно делать и трепанобиопсию или, как минимум, проводить гистологическое исследование крошек костного мозга, содержащихся в аспирате, полученном при стеральной пункции.

При остром лейкозе костный мозг содержит десятки процентов бластных клеток практически всегда, если в крови уже обнаруживается цитопения. Исключением из этого правила могут быть редкие случаи затяжного начала острого лейкоза, когда бластные клетки обладают выраженным цитопеническим эффектом, но еще не успели дать значительных разрастаний; точно так же при появлении с самого начала острого лейкоза аутоиммунной цитопении (аутоиммунные цитолитические состояния могут осложнять течение любого лейкоза) процент бластных клеток в костном мозге может быть невелик.

Малопрцентный острый лейкоз характеризуется невысоким содержанием бластных клеток в крови (менее 10-20%) и иногда еще меньшим бластозом в костном мозге. Однако диагностика этого сравнительно редкого острого лейкоза, встречающегося преимущественно у пожилых людей, не столь уж сложна, так как в периферической крови ни при каких реактивных состояниях бластные клетки в количестве нескольких процентов не встречаются.

Безусловно обязательным для диагностики является установление классической структуры ядра бластных клеток (нежнохроматиновой - тонкосетчатой с равномерными окраской и калибром нитей хроматина - рис. 50, см. цвет. вклейку). Никакие узкоплазменные с гомогенной структурой ядра и единичными ядрышками клетки, никакие так называемые микрогенерации бластов, не имеющих явной структурности и равномерности нитей хроматина, никакие крупные с голубыми ядрышками, но с толстыми грубыми нитями хроматина клетки, если обнаружены только они и нет классических бластов, не могут быть отнесены к бластам и служить основанием для диагноза острого лейкоза.

Вместе с тем, приходится учитывать, что лейкозные бласты весьма разнородны даже в одном и том же случае, в одном мазке. Только

что описанных типичных форм может быть сравнительно немного, а основную массу клеток опухоли составляют элементы либо со смазанной структурой хроматина, но цитоплазмой, аналогичной типичным бластам этого препарата, либо с грубой и неправильной сетью хроматина, но с ядрышками и т. п. Все подобные клетки при счете миелограммы или гемограммы могут относиться к категории бластов лишь тогда, когда настоящие бласты составляют десятки процентов. Во всех остальных случаях атипичные клетки к бластам относить нельзя (никаких «мне кажется», «по мнению консультанта, профессора» и т. п. допускать нельзя, так как настоящий бласт двояко не трактуют): таким клеткам дают словесный портрет - их точно описывают, но не называют бластами.

Все сказанное приобретает особое значение при установлении ремиссии острого лейкоза, при которой процент бластных клеток в костном мозге не должен превышать 5. Завышение, равно как и занижение процента, может иметь роковые последствия.

При оценке лимфоидных клеток важно ориентироваться на содержание миелокариоцитов в мазке: при малой его клеточности (например, при агранулоцитозе) могут преобладать молодые с узкой цитоплазмой, иногда с ядрышком (особенно у детей), но с гомогенной структурой хроматина лимфоидные клетки. Это клетки-предшественницы, но не бласты. Их надо относить к категории лимфоидных клеток. Глыбчатой структуры нормальных лимфоцитов они не имеют. Обнаружение более 20-30 (на 100 миелокариоцитов) круглоядерных, напоминающих бласты клеток в костном мозге, обычно приходится расценивать как «высокое содержание атипичных клеток», требующих точного морфологического описания, но к бластам их относить нельзя.

Применение цитостатических препаратов и преднизолона до установления диагноза может создать ситуацию, при которой «клеймо» острого лейкоза будет поставлено (на всю жизнь!) человеку, перенесшему инфекционный мононуклеоз или иммунный гемолитический криз, причем никакими последующими исследованиями уже нельзя будет ни отвергнуть, ни подтвердить диагноз острого лейкоза. Вместе с тем, если в связи с предполагаемым острым лейкозом анализ крови или костного мозга сделан на следующий день или в ближайшее время после начала цитостатической терапии, то бластные клетки могут уже утратить структурность и нитчатость хроматиновой сети, иметь конденсированный хроматин ядра. Эти так называемые леченые клетки почти не отличимы от лимфоцитов, и по ним можно дать ошибочное заключение.

ние, отвергнув предположение об остром лейкозе.

В некоторых случаях острый миелобластный лейкоз начинается с повышения в крови уровня всех молодых клеток: и бластных, и промиелоцитов, и миелоцитов, и метамиелоцитов, и т. д. В такой ситуации нелегко отвергнуть предположение о начале хронического миелолейкоза, сразу приобретшего черты терминальной стадии - бластного криза. Здесь на помощь приходит хромосомный анализ. Обнаружение Ph-хромосомы в сочетании с низким уровнем ЩФ и скудной зернистостью нейтрофилов будет говорить о хроническом миелозе.

Значительные трудности в диагностике может представить острый иммунный гемолиз, сопровождающийся резким увеличением уровня «ретикулярных» клеток в костном мозге - до 10-20%. Эти клетки иногда ошибочно принимают за бласты, хотя они всегда имеют грубую структуру хроматина и крупные синие ядрышки; кроме того, при анализе в костном мозге резко повышен уровень эритрокариоцитов, а в крови - высокий ретикулоцитоз.

Возможна и такая ситуация, когда наряду с невысоким процентом бластных клеток в пунктате костного мозга имеется обрыв созревания клеток гранулоцитарного ряда на уровне миелоцитов или промиелоцитов, чаще наблюдающийся при иммунной нейтропении или агранулоцитозе. Диагностические трудности особенно велики тогда, когда в анализах крови нет бластов и нет тромбоцитопении, а бластные клетки в пунктате костного мозга не отличаются атипизмом и по соотношению ядра и цитоплазмы, отсутствию зернистости в цитоплазме напоминают нормальные клетки-предшественницы в форме бласта. Именно здесь сомнение может разрешить трепанобиопсия, позволяющая обнаружить при остром лейкозе пролифераты молодых клеток.

Иногда врач не может поставить диагноз в связи с цитопеническим синдромом, хотя и подозревает острый лейкоз. В этих случаях придется ждать несколько недель, месяцев и повторять все исследования снова. Необходимо подчеркнуть, что некоторая часть запоздалых диагнозов обусловлена сокращенными исследованиями крови, когда при анемии оказываются не подсчитанными тромбоциты и ретикулоциты.

В начале острого лейкоза возможна анемия - либо нормохромная, либо несколько гиперхромная - цветовой показатель достигает 1,2-1,3. Особенно выражена тенденция к гиперхромии при остром эритромиелозе; при этом отмечается значительное число макроцитов. Количество тромбоцитов в большинстве случаев либо сни-

жено, либо нормально. Однако встречаются очень редкие случаи острых лейкозов (по-видимому, нелимфобластных) с гипертромбоцитозом, достигающим нескольких миллионов в 1 мкл; обнаруживаются и необычные формы тромбоцитов больших размеров с голубой цитоплазмой. Количество лейкоцитов в начале процесса чаще всего снижено, но вместе с тем встречаются случаи, когда первым клиническим симптомом является и высокий лейкоцитоз с преобладанием бластных клеток в гемограмме.

Довольно часто при острых лейкозах в крови встречаются единичные эритрокариоциты. Они имеют существенное дифференциально-диагностическое значение: их нет при реактивных состояниях (исключая гемолиз, лейкомоидные реакции на рак) и инфекционном мононуклеозе. В отдельных очень редких случаях отмечается эритроцитоз (более $5 \times 10^{12}/л$), предшествующий развернутой картине острого лейкоза. Если выход в кровь эритрокариоцитов, как и появление в крови миелоцитов и промиелоцитов, может быть связан с нарушением структуры костного мозга, разрастанием бластов (подобная картина крови бывает и при метастазах рака в костный мозг), то макроцитоз, гиперхромия эритроцитов, а также нередко наблюдаемый феномен мегалобластности эритрокариоцитов, вероятно, связаны с дефектностью самих предшественников красного ряда, которые, будучи уже лейкозными, сохраняют некоторую способность к дифференцировке. РОЭ при острых лейкозах нередко ускорена более или менее значительно, но может быть и нормальной.

Описанная картина крови связана с первичным, обусловленным самим лейкозом процессом и существенно меняется под влиянием цитостатической терапии; кроме того, она неодинакова при различных формах острого лейкоза.

Определение принадлежности бластных клеток к миелоидной или лимфоидной линии кроветворения при проведении обычной окраски по Романовскому-Гимзе возможно лишь приблизительно в 70% случаев. Для более точного определения необходимо выполнение других диагностических методов: цитохимического исследования, иммунофенотипирования, цитогенетических, молекулярно-биологических и культуральных исследований.

До создания современных цитостатических препаратов (50-60 гг. XX столетия) не было необходимости в жестком дифференцировании типов острых лейкозов, так как не была разработана современная дифференцированная терапия острых лейкозов. С середины 70-х годов началась эра многокомпонентной и дифференцированной терапии острых лейкозов, что в конце 70-х - начале 80-х годов позволило кон-

статировать тот факт, что острый лейкоз стал болезнью излечимой.

Таким образом, установление точного диагноза острого лейкоза является не только необходимым с точки зрения академического интереса, но и принципиальным для выбора тактики лечения и прогноза заболевания.

До недавнего времени в соответствии с классификацией FAB [Bennet et al., 1976] диагноз острого лейкоза, позволяющий начинать цитостатическое лечение, устанавливался при обнаружении в пунктате костного мозга (в ряде случаев в периферической крови) 30% и более бластных клеток. При обнаружении в костном

мозге менее 30% бластных клеток, а в периферической крови - более 30%, также констатировался диагноз острого лейкоза. В рекомендациях ВОЗ 1999 года этот «порог» - 30% - снижен до 20% (к чему мы призывали уже много лет).

При наличии в пунктате костного мозга и в крови менее 20% бластных клеток устанавливается диагноз малопроцентного лейкоза («рефрактерная анемия с избытком бластов» - FAB-классификация). Здесь необходима оговорка: во всех случаях обнаружения в крови нескольких процентов бластных клеток развитие острого лейкоза неизбежно в течение недель или месяцев.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИЦИРОВАНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

В нашей стране основные формы острых лейкозов человека были выделены Кассирским И.А., 1970; Воробьевым А.И. и др., 1973; Лорие Ю.И., 1974; Дегтяревой М.М., 1974; Файнштейном Ф.Э. и др., 1980 на основании цитохимических особенностей цитоплазмы бластных клеток, позволяющих определить эти формы, а также выделить некоторые морфологические и клинические их критерии.

И морфологический, и цитохимический подход к классификации опирается на сопоставление патологических клеток с их нормальными предшественниками. Оба подхода правомерны. Однако с введением новых комплексов цитостатических средств, с появлением длительных ремиссий, сменяемых рецидивами, рефрактерными к ранее эффективным цитостатическим препаратам, стала очевидна изменчивость в первую очередь формы и величины ядер и цитоплазмы лейкозных клеток [Воробьев А.И., 1968, 1970].

Классификация любой группы сходных заболеваний не может начинаться с чистого листа. Предлагаемый текст отражает ту историю гематологии, в атмосфере которой авторы жили. Есть и другой подход: предложить принципиально новую классификацию с новыми названиями, опирающуюся на отдельные признаки, которые по тем или иным причинам показались составителям основополагающими. Для простоты можно названия болезней, над расшифровкой которых бились поколения ученых, заменить номерами. Авторы классификации FAB так поступили, тем самым предопределив ее судьбу: острые лимфобластные лейкозы в том виде, в котором они там представлены, умерли, так и не родившись, другие остались в литературе в качестве буквенно-цифрового синонима. Классификация ВОЗ, опубликованная в 1999 г., продолжая традиционные для мировой лейкологии подходы, используя, в отличие от класси-

фикации FAB, все признаки опухоли - морфологические, иммунофенотипические, кариологические, клинические и др., базируется на общепринятых рациональных названиях острых лейкозов. Именно такой подход к классифицированию опухолей всегда был принят в нашей стране.

В "Клинической гематологии" И.А. Кассирского и Г.А. Алексеева, 1970 г., написанной на заре цитогенетики, до широкомасштабного применения гистохимии, выделяли следующие основные формы острых лейкозов: миелобластные, лимфобластные, острый промиелоцитарный, острый эритромиелоз, острый плазмобластный. В этом руководстве описана клиническая картина и других острых лейкозов, которые были выделены и изучены позднее.

Сам по себе факт излечения одних острых лейкозов и безуспешной терапии других, внешне не отличимых от первых, стимулировал поиск тех признаков, которые могли бы помочь в выборе адекватной программы. Не все эти признаки можно выявить существующими цитохимическими, иммунологическими, цитогенетическими или молекулярно-биологическими методами, они могут скрываться в клинической картине, в особенностях локализации очагов опухолевого роста, в возрасте больных и в их этнической принадлежности. Поэтому все перечисленные аспекты заболевания требуют детального анализа.

Полностью охарактеризовать острый лейкоз, ограничившись каким-то узким, заведомо определенным набором тестов, невозможно. Следовательно, нельзя не выделять острый лимфобластный лейкоз детей, поскольку именно он - детский - при применении соответствующей программы лечения прогностически наиболее благоприятен. И это при том, что по всем остальным признакам - известным в настоящее время генетическим нарушениям и иммунофе-

нотипу - острые лимфобластные лейкозы детей и взрослых идентичны. Бессмысленно и сохранение термина "острые нелимфобластные лейкозы", бессмысленно хотя бы потому, что терапия отдельных форм из этой искусственно выделенной группы гемобластозов в последние годы стала дифференцированной. Так, благодаря включению в программу лечения острого промиелоцитарного лейкоза полностью транс-ретиновой кислоты этот ранее самый злокачественный, часто - молниеносный лейкоз теперь рассматривается в качестве исключительно благоприятной формы.

Клетки злокачественных опухолей, к которым принадлежат острые лейкозы, подчиняясь закономерностям опухолевой прогрессии, претерпевают достаточно грубые изменения, происходящие иногда в течение недель и месяцев.

Поэтому опорой для выделения того или иного лейкоза в специальную форму должны служить более или менее стабильные признаки опухолевых клеток. В целом надо все-таки помнить, что строгое разграничение двух важнейших групп лейкозов во всех случаях невозможно хотя бы по той простой причине, что лейкозные клетки миелоидных, монобластных острых лейкозов могут нести маркеры лимфатических лейкозов и наоборот. Признавая такую возможную бимодальность некоторых случаев острого лейкоза, тем не менее нам кажется очень важным сохранять основные названия форм, определяющие сегодня выбор программы лечения.

Высказанные замечания служат необходимым пояснением к приводимому ниже перечню острых лейкозов из классификации, рекомендованной в 1999 г ВОЗ. Параллельно классифика-

Таблица 33

Острые лейкозы		
Переработанная и дополненная классификация А. И. Воробьева и М. Д. Бриллиант (2000 г.)	Классификация ВОЗ (1999 г.)	Классификация FAB (1976 г.)
1	2	3
Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ)		
Острый миелобластный лейкоз, вариант с t(8;21)(q22;q22) и вариант с перестройками 11q23	ОМЛ с t(8;21)(q22;q22)	M1
	ОМЛ с перестройками 11q23	M2
	ОМЛ	M2Baso
	- с мультилинейной дисплазией	
	- с предшествующим миелодиспластическим синдромом	
Острый промиелоцитарный лейкоз с t(15;17)(q22;q11-12) и вариантами	- без предшествующего миелодиспластического синдрома	
	ОМЛ с минимальной дифференцировкой	
	ОМЛ без признаков вызревания	
	ОМЛ с признаками вызревания	
	ОМЛ с базофилией	
Острый миеломонобластный лейкоз, вариант с inv(16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22) и с патологической костномозговой эозинофилией, вариант с перестройками 11q23	Промиелоцитарный лейкоз [ОМЛ с t(15;17)(q22;q11-12) и вариантами]	M3
	Острый миеломоноцитарный лейкоз	M4
	ОМЛ с inv(16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22) и с патологической костномозговой эозинофилией	M4Eo
	ОМЛ с перестройками 11q23	
Острый монобластный лейкоз, вариант с перестройками 11q23	Острый моноцитарный лейкоз	M5a (не дифференцированный)
	ОМЛ с перестройками 11q23	M5b (дифференцированный)
Острый эритромиелоз, острый эритромегакариобластный лейкоз	Острый эритроидный лейкоз	M6
	-	-
Острый монобластный лейкоз новорожденных	-	-

Продолжение таблицы 33

1	2	3
Острый мегакариобластный лейкоз	Острый мегакариоцитарный лейкоз	M7
Острый мегакариобластный лейкоз с миелофиброзом	Острый мегакариоцитарный лейкоз	M7
Острый миелобластный лейкоз с миелофиброзом	Острый панмиелоз с миелофиброзом	-
Острый малопроцентный лейкоз, вариант с 5q ⁺	Миелодиспластические синдромы рефрактерная анемия - с кольцевыми сидеробластами - без кольцевых сидеробластов рефрактерная цитопения (миелодиспластический синдром) - с мультилинейной дисплазией рефрактерная анемия (миелодиспластический синдром) - с избытком бластов Синдром 5q- Миелодиспластические синдромы, неклассифицируемые	
Вторичные миелобластные лейкозы	Вторичные ОМЛ и миелодиспластический синдром, развившиеся после химиотерапии	M1 M2 M4 M5 M6 M7
Острый макрофагальный лейкоз	-	-
Острые лимфобластные лейкозы		
Острый В-лимфобластный лейкоз взрослых, цитогенетические варианты с - t(9;22)(q34;q11), - t(1;19)(q23;p13), - t(12;21)(p12;q22) - и с перестройками 11q23; иммунофенотипические варианты - ранний пре-В (про-В) - пре-В - В	В-лимфобластный лейкоз/лимфома из предшественниц В-клеток, варианты с - t(9;22)(q34;q11), - t(1;19)(q23;p13), - t(12;21)(p12;q22) - и с перестройками 11q23	L1 L2
Острый В-лимфобластный лейкоз детей - цитогенетические варианты - t(9;22)(q34;q11), - t(1;19)(q23;p13), - t(12;21)(p12;q22) - и с перестройками 11q23; иммунофенотипические варианты - ранний пре-В (про-В) - пре-В - В	-	-
Острый плазмобластный лейкоз	-	-
Острый Т-лимфобластный лейкоз взрослых	Т-лимфобластный лейкоз/лимфома из клеток-предшественниц	-

Продолжение таблицы 33

1	2	3
Острый Т-лимфобластный лейкоз детей	Т-лимфобластный лейкоз/лимфома из клеток-предшественниц	-
Острый Т-лимфобластный лейкоз с апластическим синдромом	-	-
Острые бифенотипические лейкозы		МО
Острые недифференцируемые лейкозы		МО

Примечание. *Весь перечень заболеваний, входящих в группу миелодисплазий, в нашей классификации обозначен своими названиями, без использования объединяющего термина МДС.

ции ВОЗ представлена наша классификация. Расхождения между ними минимальны, но необходимы. В частности, мы считаем обязательным выделение детских лимфобластных лейкозов - нозологической формы со специфической терапией и благоприятным прогнозом, равно как необходимо выделять и другие ранее описанные формы острых лейкозов. Здесь невольно вспоминаются слова Дональда Пинкеля, объяснившего случаи неэффективного лечения детских острых лимфобластных лейкозов тем, что в силу объективных причин нам известны далеко не все формы этой опухоли, и соответствующая программа химиотерапии просто еще не разработана.

В последней колонке таблицы перечислены обозначения лейкозов по классификации FAB. Следует отметить, что с выходом в свет классификации ВОЗ надобность в последней отпала окончательно. В классификации ВОЗ, в том виде, в котором она представлена в литературе, все лейкозы разделены на группу миелоидных и группу лимфоидных, а не на острые и хронические, как это принято в нашей стране, и как это представляется нам более логичным по диагностическим, терапевтическим и организационным соображениям. Поэтому предложенный нами перечень острых лейкозов по классификации ВОЗ представляет собой выборку из общего списка. Что касается хронических лейкозов, то последние будут рассмотрены в соответствующих разделах.

Попытка авторов классификации ВОЗ (1999 г.) ввести в название форм острых лейкозов характерные для них генетические нарушения безусловно прогрессивна и не вызывает ка-

ких-либо возражений. В ближайшее время генотипическая дифференциация лейкозов наверняка будет дополнена, внеся новые коррективы в классификацию. С другой стороны, нельзя не отметить тот факт, что при учете всех потенциально выявляемых мутаций количество возможных генетических вариантов лейкозов оказывается очень большим. Между тем, не все известные в настоящее время генетические нарушения определяют клиническую картину и чувствительность опухолевых клеток к тем или иным цитостатикам. Соответственно не все описанные на сегодняшний день мутации подразумевают специфическую для них терапию. Именно поэтому мы пока не сочли нужным выделить некоторые формы острых лейкозов, отраженных в классификации ВОЗ, в качестве самостоятельных нозологических форм. Помнить о них надо, искать новые терапевтические подходы надо, но выделять их в качестве нозологической формы преждевременно.

Вместе с тем, в группе острых лимфобластных лейкозов иммунофенотипу до последнего времени придавалось важнейшее дифференцирующее значение, поэтому отказываться от такого подхода нельзя. В то же время, наличие t(12;21)(p12;q22) имеет самостоятельное, независимое от иммунофенотипа значение, поскольку определяет выбор специфической терапии. Естественно, детский вариант острого В-лимфобластного острого лейкоза с той же транслокацией мы выделяем в самостоятельную нозологическую форму, так как ни по программе лечения, ни по прогнозу он со взрослым вариантом не совпадает.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

На поверхности гемопоэтических клеток определено около 100 антигенов, названных кластерами дифференцировки, к которым созданы моноклональные антитела. Эти антигены в большинстве случаев представляют собой поверхностные (мембранные) гликопротеины, ред-

ко - карбогидраты или гликолипиды [Paraskevas F., 1998]. Хотя не найдены лейкозоспецифические антигены, тем не менее характеристика гемопоэтических клеток на основании набора антител к кластерам дифференцировки (CD) позволяет определять их линейную принадлеж-

ность и этап дифференцировки. Обнаружение одновременной экспрессии на клетке антигенов, в норме вместе не встречающихся, позволяет говорить об aberrантном иммунофенотипе.

К задачам иммунофенотипирования можно отнести следующие:

- 1) подтверждение диагноза;
- 2) установление диагноза, когда цитоморфологический метод недостаточен;
- 3) определение бифенотипических вариантов острых лейкозов;
- 4) характеристика aberrантного иммунофенотипа в дебюте заболевания с целью дальнейшего отслеживания минимальной остаточной популяции клеток в период ремиссии острого лейкоза;
- 5) выделение прогностических групп.

Каждый из CD-антигенов с помощью моноклональных антител выявляется на нормальных гемопоэтических клетках соответствующей линейной принадлежности и на определенных стадиях дифференцировки. Бластные клетки считаются позитивными по экспрессии того или иного антигена, если 20% и более из них экспрессируют исследуемый антиген.

К антигенам, определяемым на клетках относят:

- лимфоидным: CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD56, CD57;
- миелоидным: CD11, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD41, CD42, CD65, HLA-DR;
- ранним клеткам-предшественникам: CD34.

Определенное сочетание указанных антигенов на лейкоэмических клетках, позволяет дифференцировать в рамках лимфоидной линии по меньшей мере 6 (в ряде случаев - 7) подтипов [67]. Именно для ОЛЛ иммунофенотипирование стало важнейшим диагностическим методом, поскольку программы лечения различных подтипов ОЛЛ принципиально отличаются. Дифференцированный подход к терапии различных вариантов ОЛЛ позволил добиться за последние 10 лет значительных успехов в плане долгосрочных результатов и выделить определенные факторы риска (табл. 34).

Иммунодиагностика нелимфобластных острых лейкозов

Наибольшее распространение иммунодиагностика получила при ОМЛ и бластном кризе хронического миелолейкоза (БК ХМЛ). Иммунологический метод диагностики ОНЛЛ имеет как преимущества, так и недостатки в сравнении с морфоцитохимическим исследованием. Преимущества связаны с возможностью более точного установления вариантов M0, M6 и M7 на основании экспрессии дифференцировочных антигенов бластными клетками. Недостатки метода связаны с тем, что он не позволяет с такой надежностью, как морфоцитохимия, разграничивать монобластные и гранулоцитарные лейкозы, а также устанавливать стадию зрелости последних. По этим причинам на практике иммунофенотипическое исследование является методом, дополняющим стандартную морфоцитохимическую диагностику и позволяющим уточнять варианты ОМЛ.

Таблица 34

Иммунологический фенотип ОЛЛ (частота встречаемости, прогноз и ассоциированные цитогенетические аномалии) [47, 66, 87]				
Вариант ОЛЛ	Определение	Частота, %	Прогноз	Цитогенетические аномалии
Ранний пре-В	CD10⁺ , CD19 ⁺ Clg ⁻ , Sig ⁻	5-10	Плохой**	t(4;11)*
Common	CD10⁺ , CD19 ⁺ Clg ⁻ , Sig ⁻	40-45	Средний	t(9;22)*
Пре-В	CD10 ⁺ , CD19 ⁺ Clg⁺ , Sig ⁻	20	Средний	t(9;22)* t(4;11)* t(1;19)
В	CD10 ⁺ /- , CD19 ⁺ Clg ⁻ , Sig⁺	4-5	Плохой***	t(8;14) t(8;22) t(2;8)
Пре-Т	CD7, cCD3	5-6	Плохой	14q11
Т	CD1, CD3, CD4, CD7, CD8	20	Хороший	7q34

Примечания: Жирным шрифтом выделены ключевые для дифференцирования иммунологических подтипов антигены. * - Прогноз значительно ухудшается при обнаружении указанных транслокаций вне зависимости от иммунофенотипа ОЛЛ. ** - При использовании высокодозной консолидации прогноз хороший. *** - При использовании программ химиотерапии В-лимфосарком прогноз благоприятный (с модификациями Е.А. Copelan, Е.А. Mc Guire 1995; D. Hoelzer et al., 1995).

Важное значение иммунологического изучения бластных клеток ОМЛ (помимо диагностики) заключается в том, что некоторые маркеры ассоциированы с агрессивностью течения и результатами лечения ОМЛ. Это позволяет рассматривать их в качестве независимых прогностических признаков, которые могут быть перспективными для разработки иммуноклассификаций ОМЛ, ориентированных на последующую индивидуализацию химиотерапевтических режимов.

В настоящее время дифференцировка миелоидных клеток изучена достаточно детально. Палитра МКА, которая может быть применена для характеристики ОМЛ поистине многообразна, однако лишь немногие типы МКА нашли широкое применение в практике иммунофенотипической диагностики ОМЛ.

Иммунологические маркеры ОМЛ можно условно разделить на следующие группы:

- общемиелоидные,
- стадийспецифичные,
- линейспецифичные.

Последовательность изменения иммунофенотипа клеток в ходе миелоидной дифференцировки представлена в табл. 35, 36.

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

CD13. Согласно лейкоцитарным кластерам дифференцировки, наименование CD13 соответствует аминопептидазе N. Это мембраносвязанная металлопротеаза, участвующая в метаболизме пептидов различными типами клеток, включая макрофаги, гранулоциты и некоторые негемопозитические клетки. Антиген присутству-

ет на всех стадиях дифференцировки гранулоцитарных и моноцитарных клеток, начиная с гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ), а также в 60% случаев ОМЛ. Молекула CD13 отсутствует на лимфоидных Т- и В-клетках. Существует связь между уровнями экспрессии CD13 и активностью миелопероксидазы.

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

МКА к **CDw65** распознают фукоганглиозид (церамид-додекасахарид), который экспрессирован на колониеобразующих клетках, гранулоцитах, гетерогенно - на моноцитах, а также в большинстве случаев ОМЛ. Этот антиген характеризуется высокой специфичностью для клеток миелоидного ряда и рекомендован к использованию при диагностике острых лейкозов.

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

Стволовоклеточный антиген **CD34** экспрессирован только на незрелых гемопоэтических предшественниках и отсутствует на морфологически распознаваемых элементах миелоидного ряда. В нормальном костном мозге 1,5% мононуклеарных клеток имеют на мембране CD34. Практически все колониеобразующие клетки находятся в пределах CD34+ популяции: унипотентные (БОЕ-Э, КОЕ-ГМ, КОЕ-Mera, КОЕ-Эоз) и мультипотентные (КОЕсмеш или КОЕ-ГЭММ, пре-КОЕ, КОЕ-бл). При ОМЛ взрослых экспрессия CD34 наблюдается в 43% случаев. Наличие CD34 чаще отмечено при вариантах M1/M2 с ко-экспрессией CD7 или TdT.

Таблица 35

Иммунофенотип клеток гранулоцитарной линии						
Маркер	КОЕ-ГЭММ	КОЕ-ГМ	Миелобласт	Промиелоцит	Миелоцит	Нейтрофил
CD34	+	+	+/-	-	-	-
HLA-DR	+	+	+	-	-	-
CD33	+	+	+	+	+	+/-
CDw65	+/-	+/-	+	+	+	+
CD13	-	+	+	+	+	+
CD15	-	-	-	+	+	+
CD11b	-	-	-	+	+	+

Таблица 36

Иммунофенотип клеток моноцитарной линии						
Маркер	КОЕ-ГЭММ	КОЕ-ГМ	Монобласт	Промоноцит	Моноцит	Гистиоцит/ макрофаг
CD34	+	+	-	-	-	-
HLA-DR	+	+	+	+	+	+
CD33	+	+	+	+	+	+
CDw65	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD13	-	+	+	+	+	+
CD15	-	-	+	+	-	-
CD11b	-	-	-	+	+	+
CD14	-	-	-	+	+	+
CD11c	-	-	-	-	+	+
CD68	-	-	-	+	+	+

Антигены CD11b, CD14, CD15 в отличие от CD34 появляются, напротив, на более поздних этапах дифференцировки клеток миелоидного ряда. CD15 - это углеводный антиген лакто-N-фукопентаоза III. CD15 принято считать маркером преимущественно гранулоцитарного ряда. В норме антиген экспрессирован на промиелоцитах и более поздних этапах дифференцировки гранулоцитов. На клетках гранулоцитарной линии, находящихся на ранних этапах созревания, антиген чаще отсутствует. При ОМЛ CD15 выявляется с высокой частотой и служит дополнительным маркером при определении линейной принадлежности и степени зрелости миелобластов. CD15 отсутствует на моноцитах, но выявляется на монобластах, что не позволяет использовать его для дифференциальной диагностики гранулоцитарных и монобластных лейкозов.

CD11b является рецептором для C3bi-компонента комплемента. Так же, как и CD15, он появляется довольно поздно в ряду миелоидной дифференцировки и используется для уточнения стадии зрелости бластных клеток ОМЛ. Отличие от CD15 заключается в экспрессии антигена на моноцитах, макрофагах, NK-клетках.

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

На основании иммунофенотипа бластных клеток невозможно установить M1-M5 варианты ОМЛ в соответствии с FAB-классификацией. Одной из причин этого является отсутствие точного соответствия процессов дифференцировки миелоидных клеток в норме и при лейкозах. Так, например, для нормальных промиелоцитов характерна экспрессия CD15, а при промиелоцитарном лейкозе этот антиген обнаруживается редко. Вместе с тем, существуют определенные антигенные сочетания, которые достаточно типичны для монобластных и миеломонобластных лейкозов (экспрессия CD14) в отличие от гранулоцитарных, а, кроме того, характерной особенностью варианта M3 является практически полное отсутствие мембранных HLA-DR на промиелоцитах. По этим причинам дополнение стандартного морфocyтохимического исследования иммунофенотипированием повышает воспроизводимость диагностики вариантов ОМЛ с 89 до 99%.

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

Единственным специфическим маркером клеток эритроидного ряда является гликофорин А. Гликофорин А является сиалогликопротеином и присутствует на всех морфологически распознаваемых клетках эритроидного ряда, начиная с эритробластов и заканчивая зрелыми эритроцитами. На унипотентных эритроидных предшественниках (КОЕ-Э, БОЕ-Э) антиген отсутствует. При лейкозах гликофорин А может выявляться на бластных клетках, не имеющих типичной эритроидной морфологии, что позволяет устанавливать в этих случаях вариант M6. Экспрессия других дифференцировочных антигенов при эритробластном лейкозе может быть весьма вариabельной и не влияет на установление диагноза. Так, при эритробластном лейкозе обнаруживаются антигены стволовых клеток и коммитированных предшественников

(CD34, CD13, CD33, HLA-DR, CD38, CD71, CD7). Следует отметить, что экспрессия гликофорина А при вариантах М1 - М5 ОМЛ у взрослых представляет чрезвычайную редкость и в наших исследованиях при использовании отечественных моноклональных антител HAE-3 наблюдалась лишь в 2 из 84 случаев. Гликофорин А является одним из немногих линейно-рестриктированных антигенов и представляет собой большую ценность в иммунодиагностике ОМЛ. Дополнительным маркером клеток эритроидного ряда является антиген эритробластов, который появляется раньше гликофорина А в ряду эритроидной дифференцировки, отсутствует на эритроцитах и может быть определен с помощью МКА HAE-9.

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

Наиболее специфичным маркером тромбоцитов и мегакариобластов является комплекс gpIIb/IIIa. Он является цитoadгезином, состоит из 2 полипептидных цепей интегринового суперсемейства. МКА, распознающие β_3 -цепь интегринов (β -цепь витронектинового рецептора, gpIIb), сгруппированы в кластер CD61. МКА, распознающие α -цепь gpIIb, сгруппированы в кластер CD41. МКА кластера CD61 позволяют выявить ранние клетки, принадлежащие к мегакариоцитарной линии.

Одним из наиболее сложных диагностических вопросов, решаемых иммунологическими методами при ОМЛ взрослых, является установление варианта М0 (минимально дифференцированный миелобластный лейкоз). Критерии диагностики этого подварианта были сформулированы FAB-группой. Вариант М0 устанавливается на основании трех основных признаков:

1. Содержание бластов, выявляемых в реакции на миелопероксидазу, а также при окраске суданом черным Б невелико (менее 3%, часто вообще отсутствует);
2. На бластных клетках отсутствуют лимфоидные антигены (за исключением тех, которые в норме экспрессируются на миелоидных предшественниках, например, CD7);
3. Панмиелоидные (CD13, CD33, CDw65) или стадийнеспецифичные маркеры (CD11b, CD15, CD14 и т.д.) подтверждают миелоидную природу бластных клеток.

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН проведено сопоставление прогностической роли иммунологических маркеров в прогнозе ОМЛ у детей (ле-

чились по модифицированной программе BFM-87) и взрослых (цитозар-антрациклиновые программы лечения). Показано, что частота экспрессии иммунологических маркеров (миелоидные, Т-клеточные, В-клеточные, CD10, CD38, HLA-DR, CD34, эритроидные) существенно не различается у детей и взрослых. В прогнозе ОМЛ детского возраста экспрессия В-клеточных и эритроидных маркеров связана с более короткой продолжительностью ремиссии. Отсутствие на мембране бластных клеток молекул HLA-DR или присутствие Т-клеточных антигенов являлись факторами благоприятного прогноза при ОМЛ у детей. У взрослых большая длительность безрецидивного периода отмечена при CD38+ ОМЛ. В случаях CD10+ ОМЛ у взрослых наблюдались высокая частота ремиссий (91%) и достоверное увеличение общей продолжительности жизни. По-видимому, иммунологические факторы имеют различное влияние на прогноз ОМЛ у детей и у взрослых.

В последние годы помимо изучения прогностической значимости иммунофенотипических маркеров ОМЛ большое внимание уделяется поиску устойчивых иммуноцитогенетических и морфocyтохимических ассоциаций. Установлено, что для варианта М2 с транслокацией [8; 21] характерно отсутствие CD13. При промиелоцитарном лейкозе М3/t [15;17] типичным является фенотип HLA-DR- CD15-. При этих вариантах, а также при М4 с эозинофилией/inv [16] прогноз у взрослых больных ОМЛ существенно лучше, чем при других вариантах.

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

Иммунологический фенотип бластных клеток при миелоидных лейкозах очень разнообразен, и чаще всего (у 80% больных) определяется aberrантная экспрессия антигенов, то есть типичные маркеры миелоидной направленности могут экспрессироваться, во-первых, совместно с антигенами, характерными для лимфоидных клеток; во-вторых, их экспрессия может быть аномальной по сочетанию ранних и поздних маркеров клеточной дифференцировки; в-третьих, может отмечаться избыточная экспрессия какого-либо антигена (например, CD34). Именно эти признаки - aberrантный иммунофе-

В табл. 37 представлены иммунофенотипические характеристики клеток при различных морфологических вариантах ОНЛЛ. Для ОНЛЛ, за исключением острого недифференцированного миелобластного (M0) и острого мегакариобластного (M7) лейкозов, иммунофенотипирование не является принципиальным методом, оно лишь подтверждает диагноз. В случае M0 и M7 использование иммунофенотипирования позволяет достоверно установить диагноз [147].

С внедрением в практику метода иммунофенотипирования и созданием большого количества моноклональных антител появилось понятие бифенотипического или билинейного острого лейкоза. Чаще всего речь идет о тех случаях, когда лейкоэмические клетки несут на себе маркеры двух или более линий кроветворения (миелоидной и лимфоидной [104]. Довольно часто выявляется следующий феномен: бластные клетки морфологически и цитохимически принадлежат к определенной линии кроветворения, например, к лимфоидной, но при иммунофенотипировании на мембране их выявляются маркеры миелоидной линии, и наоборот. Эти случаи не относятся к бифенотипическим ост-

Реже определяются случаи, когда сосуществуют две популяции бластных клеток, иммунофенотипически принадлежащих к различным линиям кроветворения. Этот вариант острого лейкоза называют билинейным.

Прогностическое значение аберрантной коэкспрессии маркеров при острых лейкозах пока не достаточно ясно. Существуют данные, на пример, что обнаружение миелоидных маркеров как при В-клеточном, так и при Т-клеточном ОЛЛ не влияет на результаты лечения [95]. И, наоборот, наличие лимфоидных маркеров при ОНЛЛ является неблагоприятным фактором в плане терапии. С другой стороны, есть публикации, доказывающие, что наличие CD2, CD7 антигенов на миелоидных клетках свидетельствует о благоприятном течении ОНЛЛ [20]. Требуется время и большее количество многоцентровых кооперированных исследований, чтобы с достоверностью ответить на вопрос о значимости указанных маркеров.

Считается, что результаты лечения бифенотипических острых лейкозов существенно хуже, нежели ОЛЛ или ОНЛЛ, и пока еще не созданы дифференцированные и стандартизованные программы терапии этих острых лейкозов.

Иммунологические маркеры, характерные для разных вариантов ОНЛЛ

[illegible]

Диагностика бифенотипического острого лейкоза			
Линия	0,5 балла	1 балл	2 балла
Миелоидная	CD11b, CD11, CD15	CD33, CD13, CD14	МПО
В-лимфоидная	Тдт, реанжировка гена тяжелой цепи Ig	CD10, CD19, CD24	цCD22, ц-мю цепь
Т-лимфоидная	Тдт, CD7	CD2, CD5, реанжировка гена T-клеточного рецептора	цCD3

Примечания. Обозначения: ц - цитоплазматический антиген, МПО - миелопероксидаза, Тдт - терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза.

ПРЕДЛЕЙКОЗ

Начальные проявления лейкоза иногда пытаются представить в виде самостоятельной патологии - *предлейкоза*. Систематические наблюдения за составом крови облученных людей показывают, что при развивающемся у них остром лейкозе в отдельных редких случаях могут обнаруживаться гематологические предвестники, заключающиеся в развитии цитопенического синдрома, иногда в проявлении признаков иммунного гемолиза или неэффективного эритропоэза (увеличенного количества эритрокариоцитов в костном мозге и прогрессирующей анемии без ретикулоцитоза). Обычно с развитием острого лейкоза при трепанобиопсии обнаруживаются отдельные скопления недифференцированных клеток с ядрышками [Краевский Н.А., Неменова Н.М., 1965]. Поставить точный диагноз в этот период иногда невозможно, хотя обоснованные предположения и высказываются. Если при хромосомном анализе обнаруживается клон анеуплоидных клеток, то развитие в будущем острого лейкоза становится практически несомненным.

Наиболее часты такие якобы «предлейкемические» стадии при остром эритромиелозе; нередко в этом случае обнаруживают клон клеток со структурно измененными хромосомами. Во всех описываемых ситуациях по существу речь идет о ранних признаках лейкоза, но не об особом состоянии, которое еще не является лейкозом и может им не стать в результате каких-то терапевтических мероприятий. Проблема «предлейкоза» подробно обсуждалась в работах М.М. Дегтяревой (1979), Л.И. Дворецкого (1984), Б.В. Афанасьева (1983), Кат (1982).

Иммунологические тесты, направленные на выявление антител на поверхности клеток, особенно агрегатгемагглютинационная проба [Идельсон Л.И. и др., 1975], показали, что среди аутоиммунных гемолитических анемий около 5% составляют случаи начала острого лейкоза, который может проявиться спустя несколько лет после развития иммунного гемолиза.

Сидероахрестическая анемия, парциальная красноклеточная аплазия, в ряде случаев гемо-

литическая анемия Маркиафава - Микели нередко предшествуют развитию острого лейкоза. Вероятно, их взаимоотношение с лейкозом неоднозначно. С одной стороны, они как процессы, сопровождающиеся усиленной пролиферацией клеток-предшественниц красного ростка и клетки-предшественницы миелопоэза, могут способствовать появлению неустойчивости кариотипа этих клеток и лейкозогенезу. С другой стороны, поскольку красный росток является опухолевым во многих случаях и при остром миелобластном или миеломонобластном лейкозе, гемолитический процесс может оказаться следствием уже имеющегося лейкемического клона, возникшего на уровне клетки-предшественницы миелопоэза. Возможно, подобное соотношение между процессом в красном ряду и лейкозом обнаружили при остром миелобластном лейкозе человека В.С. Тер-Григорьев и соавт. (1980), найдя общий антиген у эритробластов при парциальной красноклеточной аплазии и у миелобластов, появившихся у больной, у которой развитию острого лейкоза предшествовал этот синдром.

Обсуждая проблему начальных проявлений острых лейкозов, необходимо подчеркнуть, что во всех случаях, где удавалось обнаружить анеуплоидный клон или клон с каким-нибудь дефектом в кариотипе, через тот или другой промежуток времени этот клон становился основой острого лейкоза.

Одним из наиболее ярких объектов изучения лейкозогенеза являются случаи острого лейкоза, индуцированного цитостатическим воздействием. Чаще всего это бывает при применении мустаргена в комбинации МОРР и последующей лучевой терапии. Острый лейкоз в описываемых случаях часто начинается с длительной глубокой цитопении, причем появление аномального клона с дефектом в кариотипе на месяцы предшествует развитию бластоза, который может служить доказательным признаком острого лейкоза. И здесь, как и во всех других случаях, обнаружение клона с аномальным кариотипом есть признак лейкоза, уже имеющегося, но еще

не давшего высокого бластоза ни в крови, ни в костном мозге. Возникает вопрос о формальном диагнозе описываемых состояний, так как это имеет значение для выбора терапии. Если обнаружен аномальный клеточный клон у больного с цитопенией, то следует предполагать диагноз острого лейкоза. Эти больные подлежат наблюдению гематолога: окончательный диагноз им может быть установлен при появлении и нарастании бластоза в костном мозге.

При нормальном кариотипе диагноз «острый лейкоз» не возможен, и ставится синдромологический диагноз: апластический синдром (апластическая анемия с очаговой гиперплазией недифференцированных элементов в костном мозге), тромбоцитопенический синдром, гранулоцитопения неясного генеза и т. д. Предлагаемый по FAB-классификации термин «миелопоэтическая дисплазия» не способствует диагностической ясности. Из FAB-классификации в части, касающейся обсуждаемых состояний, следует одно важное положение: больные с этими состояниями до развития значительного бластоза - более 20% - не должны получать цитостатических препаратов, так как они не пре-

пятствуют развитию острого лейкоза, но ускоряют смерть больных.

Ответ на цитостатическую терапию острых лейкозов, начинавшихся с длительной фазы «предлейкоза», в целом существенно хуже, чем обычных острых лейкозов. Одним из признаков будущего острого лейкоза может быть немотивированный моноцитоз, который, в отличие от хронического моноцитарного лейкоза, не сопровождается полиморфноклеточной гиперплазией клеток в трепанате костного мозга. Природа такого моноцитоза, появляющегося нередко за несколько лет до развития лейкоза, не ясна.

В заключение необходимо подчеркнуть следующее: во всех классификациях лейкозов существует группа неклассифицируемых опухолей, в основном это ситуации предлейкоза. Во избежание диагностической путаницы, неоправданных грубых и ошибочных терапевтических вмешательств следует помнить, что отсрочка лечения острого лейкоза, проделывающего фазу «предлейкоза», - благо для пациента, а не вред. Разумное ожидание, иногда затягивающееся на несколько лет(!) - не является ни врачебной ошибкой, ни показателем плохо поставленной гематологической службы.

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПРИ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ

Периоды заболевания

Выделение стадий острого лейкоза преследует сугубо практические цели: выбор терапевтической тактики и прогноз. В настоящее время в связи с успехами цитостатической терапии лейкозов четкие границы стадий процесса определяют всю лечебную тактику.

В течении острых лейкозов выделяют первый острый период (дебют или манифестация), ремиссию и рецидив. Дебют острого лейкоза характеризуется выраженным угнетением нормального кроветворения, связанного с лейкемической инфильтрацией костного мозга; как следствие этого развиваются геморрагический синдром, различные инфекционные осложнения. В ряде случаев начало острого лейкоза бессимптомно, и диагноз устанавливается случайно. Клиническая манифестация опухоли происходит, когда ее масса составляет 10^{12} клеток. Насколько длителен предклинический период заболевания, неизвестно. Но определенные симптомы болезни могут появляться задолго до диагностики острого лейкоза.

Как только устанавливается вариант заболевания и выделяются прогностические признаки, начинается химиотерапия. *Надо особо подчеркнуть, что не следует торопиться с началом химиотерапии до завершения диагностики.* Прежде всего следует установить как можно бо-

лее точный диагноз (не только лимфобластного или миелоидного вариантов острого лейкоза, но и их морфологические типы, обязательно получить материал для иммунофенотипирования, цитогенетических исследований), подготовить пациента к проведению индукционной терапии. Как правило на предварительные этапы обследования и подготовки уходит 1-3 дня.

Основополагающими принципами химиотерапии всех злокачественных опухолей человека, в том числе и острых лейкозов [57, 79, 142], являются:

- 1) принцип дозы-интенсивности, то есть необходимости использования адекватных доз цитостатических препаратов в сочетании с четким соблюдением временных межкурсовых интервалов;
- 2) принцип использования комбинаций цитостатических средств с целью получения наибольшего эффекта и уменьшения вероятности развития лекарственной резистентности;
- 3) принцип этапности терапии.

Как в эксперименте, так и в результате клинических исследований было доказано, что снижение дозы препаратов на 20% в программах химиотерапии ведет к уменьшению эффективности лечения на 50% [138]. Также известно, что увеличение дозы в 2 раза при лечении опухолей с высокой фракцией роста сопровождается 10-

кратным увеличением гибели опухолевых клеток. Использование сочетаний цитостатических препаратов еще более повышает процент гибели опухолевых клеток. Например, число детей, излеченных от ОЛЛ, увеличивалось в линейной зависимости по мере изменения числа используемых цитостатических препаратов с 3 до 7. В связи с этим, в настоящее время принцип дозы-интенсивности дополнен таким понятием, как «суммации интенсивности дозы», что отражает влияние множества эффективных и дозоадекватных воздействий на исходы терапии злокачественных опухолей [52, 142].

В одних случаях необходимо применение мощных комплексов цитостатических средств, направленных на искоренение (эрадикацию) лейкоза, в других - профилактика рецидивов с помощью длительного, но слабого цитостатического воздействия, в третьих - ликвидация местного рецидива. Но очень часто борьба за искоренение опухолевого роста становится невозможной, и врач вынужден ограничиваться удерживанием достигнутого частичного эффекта.

Эти принципиальные различия терапевтической тактики легли в основу классификации стадий, которые можно представить следующим образом:

- первый острый период (развернутая стадия болезни),
- полная ремиссия,
- выздоровление,
- неполная ремиссия,
- рецидив с указанием, первый он или повторный, его локализации, терминальная стадия.

Накопленные к настоящему времени сведения о начальной стадии острого лейкоза настолько скудны, что конкретно определить ее пока не удастся. Чаще возможна ретроспективная оценка, когда, например, ограниченная опухоль из бластных клеток (в лимфатическом узле, коже, мозговых оболочках и т. п.) при нормальном составе костного мозга, в дальнейшем обуславливает его обсеменение бластными клетками и выход их в кровь. В связи с этим, изолированную лимфобластную саркому лимфатического узла у ребенка наиболее разумно лечить по обычной программе для лимфобластного лейкоза.

Развернутый период болезни характеризуется выраженным угнетением нормального кроветворения, высоким бластозом костного мозга (кроме малопроцентного лейкоза). Этот период с терапевтических и прогностических позиций неоднороден: первая атака лейкоза принципиально отлична от рецидива; каждый последующий рецидив прогностически более тяжел, чем предыдущий, и часто требует новой комбинации цитостатических средств (хотя чувствитель-

ность лейкозных клеток к ранее применявшимся цитостатикам может вернуться).

К **полной ремиссии** относят состояния, при которых в пунктате костного мозга обнаруживается не более 5% бластных клеток или общее количество лимфоидных клеток менее 30%, из них бластных клеток менее 5%; в крови лейкоцитов не менее $1,5 \times 10^9/\text{л}$, а тромбоцитов - не менее $1 \times 10^9/\text{л}$; внекостномозговые лейкозные пролифераты отсутствуют [Hewlett et al., 1964].

Выздоровлением от острого лейкоза считается полная ремиссия на протяжении 5 лет и более [Holland, Glidewell, 1972].

Неполная ремиссия (правильнее говорить об «улучшении», а не о «ремиссии») представляет собой довольно разнородную группу состояний, которую характеризует или отчетливое гематологическое улучшение (существенное уменьшение процента бластных клеток в костном мозге при увеличении процента нормальных клеток, сочетающееся с улучшением состава крови), или исчезновение бластных клеток из крови при сохранении бластоза костного мозга, или уменьшение количества бластных клеток в спинномозговой жидкости при ликвидации клинических симптомов нейрорлейкемии, или некоторое подавление других очагов лейкемической пролиферации вне костного мозга и т. п.

Рецидив острого лейкоза может быть костномозговым (появление более 5% бластных клеток в пунктате) или местным - внекостномозговым с любой локализацией лейкемической инфильтрации. С чисто гематологических позиций следует выделять лейкемическую (с выходом бластов в кровь) и алейкемическую (без их появления в крови) фазы острого лейкоза.

Независимо от причины, вызвавшей ремиссию, гематологическая и клиническая картина болезни имеет закономерную динамику. Если у больного была лейкемическая фаза болезни, то при эффективной терапии бластные клетки в крови часто теряют характерную структурность ядерного хроматина и превращаются в лимфоцитоподобные клетки - «леченые» клетки. Иногда эта трансформация занимает 1-2 дня, чаще - несколько дней. Если лейкоз сопровождался интоксикацией, геморрагическим синдромом, то, несмотря на отсутствие прироста зрелых нормальных клеток в крови, самочувствие больного при эффективной терапии улучшается, а кровоточивость уменьшается. В дальнейшем уменьшается число лейкоцитов (в результате исчезновения преимущественно патологических клеток), наступает лейкопения различной глубины, а затем увеличивается число зрелых нормальных клеток. При лейкемической фазе болезни этап панцитопении перед восстановлением кроветворения практически обязателен.

Действительную полноту ремиссии на основании только морфологических исследований определить не удастся. Биопсия внутренних органов, предпринятая при спленэктомии, и результаты патологоанатомического исследования (при смерти больного от инфекционных осложнений) показывают, что небольшие пролифераты недифференцированных бластных клеток в селезенке, почках, лимфатических узлах могут сохраниться и в состоянии ремиссии. Хромосомный анализ костного мозга также свидетельствует о возможности сохранения в течение длительной (2 года) ремиссии 0,5-1% анеуплоидных клеток тех же, что были и до ремиссии, хотя миелограмма остается стойко нормальной (собственное наблюдение; анализ хромосом выполнил Е.К. Пяткин). Микроскопия пунктата позволяет в отдельных случаях выявить среди бластов единичные, несомненно, патологические клетки (менее 1%), которые не мешают считать ремиссию полной.

Иногда употребляется понятие «клиническая ремиссия». Под ним понимают улучшение общего состояния больного, исчезновение септических осложнений, геморрагий. Однако гематологическая картина болезни меняется мало. В этих случаях правильнее говорить о клиническом улучшении без ремиссии.

Терминальному обострению лейкоза нередко предшествует частичная ремиссия. Как только патологические клетки становятся менее чувствительными ко всем имеющимся в нашем арсенале цитостатикам, чем нормальные родоначальные клетки костного мозга, иными словами, как только под влиянием цитостатиков гранулоцитопения или тромбоцитопения нарастает быстрее, чем уменьшается содержание бластных клеток, врач вынужден прекратить попытки получить полную гематологическую ремиссию. Начинается борьба за частичный положительный эффект.

Терминальная стадия острого лейкоза на первый взгляд не имеет определенных черт, однако наблюдение за больными показывает, что в развитии лейкоза неизбежно наступает момент, когда все цитостатические средства не только оказываются неэффективными, но процесс прогрессирует и на их фоне нарастают гранулоцитопения, тромбоцитопения, появляются некрозы на слизистых оболочках и спонтанные кровоизлияния. К проявлениям терминальной стадии относится и возникновение очагов саркомного роста в коже, в миокарде, почках. Однако решающая роль в развитии терминальной стадии принадлежит прежде всего полному угнетению нормальных ростков кроветворения, а не органным поражениям, которые

могли быть и раньше и не всегда означали бесперспективность терапии (например, при остром лимфобластном лейкозе специфическая инфильтрация оболочек мозга или яичек обычно ликвидируется при назначении цитостатиков, гамма-терапии или, даже не исчезая, долго не ведет к генерализации процесса).

Понятие о терминальной стадии условное, оно отражает лишь современные терапевтические возможности и incurable этап опухолевой прогрессии лейкоза.

Таким образом, диагноз острого лейкоза с указанием стадии болезни формулируется следующим образом: острый миелобластный (лимфобластный, промиелоцитарный и т. д.) лейкоз (полная ремиссия; первый рецидив - костномозговой или местный с инфильтрацией яичка и др.; нейрорлейкемия при нормализации картины костного мозга; терминальная стадия, улучшение (частичная ремиссия) без исчезновения blastoz в костном мозге).

Любая форма острого лейкоза может сопровождаться первичной глубокой цитопенией. Выделение первичной цитопении в отдельную стадию неправомерно, так как во всех случаях речь идет о развернутом процессе, но протекающем с выраженным угнетением нормального кроветворения. Однако с терапевтических позиций этот феномен заслуживает внимания, так как в ряде случаев первичная цитопения бывает столь глубокой, что цитостатическая терапия по всем формальным признакам кажется противопоказанной, хотя только она в действительности и может привести к ремиссии.

Внекостномозговые поражения при острых лейкозах

Внекостномозговые поражения при острых лейкозах в значительной мере связаны с формой опухолевого процесса: поражение лимфатических узлов с их значительным увеличением обычно имеется при остром лимфобластном лейкозе детей, реже встречается при той же форме лейкоза у взрослых, почти не встречается при других формах острых лейкозов. Однако эти особенности относительно специфичны для первой атаки (развернутая стадия) острого лейкоза. В рецидиве, в терминальной стадии могут встречаться лейкозные разрастания (лейкемиды) в любых органах и системах при всех формах острых лейкозов.

Гистологическая картина этих поражений показывает либо диффузное разрастание клеток с уродливыми полиморфными светлыми ядрами, либо присутствие крупных очагов, внешне и гистологически вполне соответствующих метастазам саркомы [Краевский Н.А., 1982]. Поскольку, как уже говорилось, первая клиническая мани-

фестация лейкоза может застать его на любой стадии прогрессии, вполне понятно, что в отдельных случаях первым симптомом острого лейкоза оказывается внекостномозговой очаговый саркомный рост. Биопсия, цитологическое и гистологическое исследования удаленной опухоли позволяют диагностировать саркому.

При любой биопсии опухолевого узла, где бы он ни располагался, необходимо производить отпечатки (сразу несколько) и делать тонкие мазки для последующего цитологического и гистохимического исследования, которые без труда позволят установить диагноз гемобластоза, уточнить его гистохимическую форму, послужат основанием для исследования костного мозга с целью выявления острого лейкоза. Наиболее типичными внекостномозговыми очагами лейкоэмической инфильтрации являются лимфатические узлы, селезенка, печень, мозговые оболочки, кожа, яички, легкие, почки. Большие трудности и для диагностики, и для терапии представляют поражения средостения, желудочно-кишечного тракта, поражение нервной системы. Метастаз в мозговые оболочки, вещество мозга и нервные стволы может осложнить течение любого гемобластоза, однако чаще он встречается при детском варианте ОЛЛ.

Частота нейролейкемии при ОЛЛ детей, по патологоанатомическим данным, составляет 78 - 83%. По клиническим данным в группе детей, не получавших специфической профилактики, частота нейролейкемии составляет около 65% [Курмашов В.И., Кошель И.В., 1978]. Значительно чаще нейролейкемия встречается у детей моложе 15 лет.

Метастатическая природа нейролейкемии была доказана прямыми методами хромосомного анализа, выявившими в бластных клетках спинномозговой жидкости те же изменения хромосомного набора, что и в клетках костного мозга. Занос и фиксация бластных клеток в мозговых оболочках происходят на самых ранних этапах болезни. Об этом свидетельствует то, что достижение полной гематологической ремиссии в течение первых 3-4 нед. после обнаружения у ребенка ОЛЛ ни в коей мере не препятствует развитию нейролейкемии, попытка отсрочить радикальную профилактику нейролейкемии приведет к ее вспышке, профилактическое введение метотрексата в спинномозговой канал на фоне индукции ремиссии и после нее позволит предупредить появление нейролейкемии. У 50% погибших больных, у которых не было клинических проявлений нейролейкемии, был нормальным ликвор, при морфологическом исследовании выявлялась лейкозная инфильтрация оболочек головного мозга. При миелоидных лейкозах нейролейкемия довольно

редка в дебюте болезни, тем не менее, встречается при миеломоно-монокластных вариантах, особенно при тех формах лейкозов, где находят поломку 16-й хромосомы - inv 16 (у 30% таких больных при отсутствии профилактики возникает нейролейкемия). В последние годы в связи с изменением терапии острого промиелоцитарного лейкоза (включение в программы лечения ОПЛ трансретиноевой кислоты) увеличилась частота нейролейкемии уже на фоне лечения, как впрочем, значительно чаще стали диагностироваться и другие внекостномозговые поражения, ранее определяемые исключительно редко (например кожа, глазное дно).

Нейролейкемия проявляется прежде всего менингеальным синдромом; вначале возникает головная боль, потом тошнота и рвота, или, напротив огромный аппетит. Эти симптомы нарастают медленно, часто принимаются за случайные, связанные с погрешностями в режиме, в диете. В других случаях без появления менингеального синдрома изменяется поведение ребенка: он становится капризным, раздражительным, вялым, необщительным. При исследовании нередко обнаруживается застой на глазном дне, ригидность затылочных мышц, симптом Кернига, нарушение функций черепных нервов.

Следует подчеркнуть, что во всех этих случаях при спинномозговой пункции уже находят высокий бластный цитоз в жидкости, что свидетельствует о далеко зашедшем процессе [Берлинер Г.Б., 1983]. Вместе с тем, ранние (в момент постановки диагноза) и регулярные спинномозговые пункции на фоне ремиссии показали, что изменения в жидкости (бластный цитоз) предшествуют каким бы то ни было клиническим проявлениям процесса. В связи с этим, в нашей клинике была принята формула: «нейролейкемия - это не клиника, а цитоз».

Описанная здесь картина относится к наиболее частой форме нейролейкемии - поражению оболочек. Значительно реже встречаются внутримозговые опухоли: по нашим данным, они чаще развиваются при нелимфобластных формах острого лейкоза и лимфосаркоме. Больной при этом становится вялым, жалуется на головную боль. Очаговая неврологическая симптоматика связана с локализацией опухоли. При внутримозговой опухоли отмечаются застой на глазном дне, повышение белка в спинномозговой жидкости при нормальном цитозе (белково-клеточная диссоциация), патологический очаг на электроэнцефалограмме и смещение М-эхо в сторону, противоположную расположению опухоли, выявление очагового образования в мозгу при ЯМР-томографии.

Довольно редким дебютом нейролейкемии бывает изолированное поражение черепно-

мозговых нервов (глазодвигательных, слухового и зрительного). Неврологические симптомы характеризуются двоением в глазах, нарушением движения глазных яблок, снижением зрения на стороне поражения (вплоть до полной слепоты) и атрофией диска зрительного нерва, наблюдаемые при исследовании глазного дна. Возможно и поражение лицевого нерва с вялым парезом мимической мускулатуры на стороне поражения. При этом состав спинномозговой жидкости может оставаться нормальным, либо в ней находят бластный цитоз, свидетельствующий о вовлечении в процесс оболочек мозга.

Часто терминальная стадия острых лейкозов осложняется корешковым синдромом, обусловленным инфильтрацией соответствующих корешков лейкозными клетками, или компрессией позвонков в результате патологического перелома. Возможна и инфильтрация вещества спинного мозга, дающая подобно типичной спинальной опухоли парапарез нижних конечностей с проводниковыми расстройствами чувствительности и тазовыми нарушениями. В спинномозговой жидкости при этом наряду с повышением белка нередок бластный цитоз.

Клинически такой метастаз, как нейролейкемия, проявляется лишь тогда, когда клетки значительно инфильтрируют нервную ткань. При изучении гистологии нервной ткани в 126 случаях нейролейкемии при остром лимфобластном лейкозе у детей лишь у 70 больных она представлена клинически. Это позволило прийти к выводу, что нейролейкемия - патология прежде всего паутинной оболочки и подпаутинного пространства (рис. 51). Там, где лейкоцитарная инфильтрация поражала поверхностные отделы паутинной оболочки, к которым относятся соединительная ткань и сосуды (т. е. трабекулы) и выстланные мезотелием каналы спинномозговой жидкости, образующие внутриарахноидальное пространство, в 90% случаев не было клинических признаков нейролейкемии. Более того, если целостность трабекул не нарушена лейкоцитарным процессом, то лейкоцитарные клетки не попадают в спинномозговой канал, и его пункция не позволяет диагностировать поражения. Отмечено, что лейкоцитарные инфильтраты достигали вещества мозга лишь при вовлечении в процесс глубоких отделов паутинной оболочки, покрывающей артерии и артериолы, дрена-

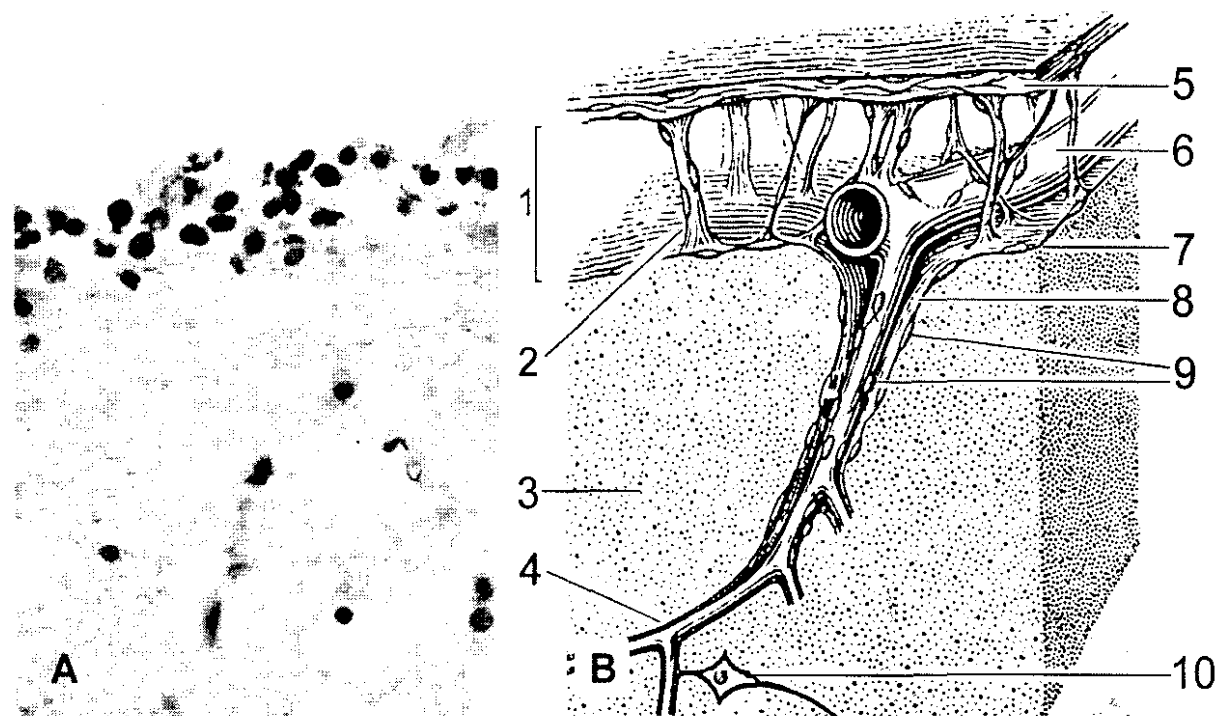


Рис. 51. Инфильтрация мягкой мозговой оболочки лейкозными клетками.

А - лейкоцитарная инфильтрация мягкой мозговой оболочки при ОЛЛ. Об.х20, ок.х15; В - схематическое изображение мозговых оболочек (из Pierse, Jonson, 1973 с изменениями); 1 - подпаутинное пространство; 2 - трабекулы; 3 - кора мозга; 4 - капилляры; 5 - паутинная оболочка; 6 - церебральная вена; 7 - сосудистая оболочка мозга; 8 - периваскулярное пространство; 9 - клетки, выстилающие периваскулярное пространство, 10 - нейрон.

рующие вены, глубокие сосудистые структуры полушарий. Поражение нейролейкемией вещества мозга связано с разрушением мягкой мозговой оболочки или так называемой миаглияльной мембраны, непосредственно покрывающей мозг. Показано, что при инфильтрации глубоких отделов паутинной оболочки и при поражении вещества мозга нейролейкемия всегда проявлялась клинически.

Таким образом, во многих случаях нейролейкемия диагностируется только спинномозговой пункцией, и в то же время даже такой диагностический метод не абсолютно надежен.

Диагноз нейролейкемии устанавливают на основании исследования спинномозговой жидкости: по обнаружению в ней цитоза выше 10 в 1 мкл и обязательно бластных клеток; отсутствие при этом неврологической симптоматики не противоречит диагнозу нейролейкемии.

Инфильтрация печени бластами может быть при любой форме острого лейкоза. Печень при этом увеличивается, край становится плотным; обычно безболезненным. Поскольку изменение размеров печени, как и селезенки, является важным и ничем не дублируемым показателем, свидетельствующим об эффективности проводимого цитостатического лечения, размеры этих органов следует точно определять, пользуясь ординатами Курлова. Перкуторные размеры следует не подменять, а сочетать с определением размеров с помощью ультразвука или компьютерной томографии.

В пункционном исследовании печени необходимость возникает редко, так как изолированное поражение ее паренхимы мало вероятно и клеточный контроль за полнотой ремиссии осуществляют исследованием костного мозга.

Гистологическая картина специфического поражения печени по материалам вскрытия характеризуется диффузной инфильтрацией ткани печени бластными клетками; но инфильтраты могут быть более или менее четко отграничены и локализоваться только в области портальных трактов или в внутри долек и в портальной зоне.

При ОЛЛ, например, инфильтрация бывает четко отграниченной, располагающейся вокруг долек, в области портальных трактов и соединительнотканых перегородок. При остром миелобластном лейкозе инфильтраты из бластных клеток линейного типа находят и внутри долек, и в портальной зоне. Вместе с тем, нарушения функции печени при острых лейкозах часто связаны с токсическим действием цитостатических препаратов, с трансфузионным гепатитом. Реже имеется механическая желтуха, вызванная сдавлением внутрипеченочных желчных ходов разрастаниями лейкозных клеток. Однако дифференцировать эти состояния бывает иногда

трудно. На помощь приходят весь комплекс биохимических исследований, установление последовательности и связанности поражения печени либо с применением цитостатических препаратов, либо с обострением лейкоза.

Лейкемиды кожи при острых лейкозах, особенно при миелобластном, нередко встречаются на поздних этапах болезни; обычно они множественные. Плотные или мягкие, они часто приподнимаются над поверхностью. Цвет их или розовый, или светло-коричневый, хотя бывают плотные лейкемиды кожи без изменения ее окраски. При пункционном исследовании лейкемида обнаруживаются бластные клетки. При гистологическом исследовании отмечается инфильтрация дермы молодыми (светлое ядро и ядрышки) клетками. Лейкозная инфильтрация может захватывать и подкожную клетчатку, образуя плотные, спаянные с кожей узлы.

Поражение яичек встречается при всех острых лейкозах, но преимущественно при лимфобластных у детей. У больного внезапно, нередко на фоне ремиссии, становится плотным и увеличивается одно яичко. Плотность яичка и односторонность поражения наводят на мысль о семиноме. Диагностика лейкозного поражения с помощью биопсии проста. Появление плотной опухоли яичка, его быстрое увеличение у больного с острым лейкозом - надежный признак метастаза лейкозных клеток в яичко. Если специфическая терапия при инфильтрации одного яичка не будет проведена, то почти неизбежно метастазом поражается и другое. Такая закономерность метастазирования довольно обычна для всех парных органов и предопределена появлением специфического клона, способного имплантироваться в ткань данного органа.

Лейкемическая инфильтрация десен чаще всего наблюдается при остром монобластном лейкозе. Десны при этом гиперемизованы, имеют красные участки, напоминающие кровоизлияния, и нависают над зубами; нередко отмечается распад ткани лейкемических инфильтратов, появление гнилостного запаха изо рта.

В почках могут быть как отдельные очаги опухолевого роста, так и диффузная инфильтрация, иногда приводящая к почечной недостаточности вплоть до анурии. Процесс обычно бывает двусторонним, увеличенные почки нередко удается пальпировать. Поскольку локальное облучение почек устраняет лейкозную инфильтрацию, его в сомнительных случаях используют и с диагностической целью. Макроскопически очаги лейкозной инфильтрации выглядят как белесоватый крап или бугорки разного размера под капсулой почки, или на ее разрезе.

Лейкемическая инфильтрация миокарда - о ее развитии свидетельствует появление сер-

дечной недостаточности у больных, причем ей предшествуют глухость сердечных тонов, снижение вольтажа ЭКГ и отрицательные зубцы Т. Размеры сердца при этом обычно увеличиваются. При патологоанатомическом исследовании обнаруживаются неравномерность окраски сердечной мышцы в очаге инфильтрации, белесоватые участки, которые при микроскопии оказываются скоплениями бластных клеток. Лейкозная инфильтрация может поражать и перикард.

Лейкозный пульмонит характеризуется появлением сухого кашля; часто повышением температуры, одышкой; при физикальном исследовании над очагами поражения определяются усиленный выдох, реже - бронхиальное дыхание, скудные локализованные сухие хрипы, крепитация; влажные хрипы выслушиваются редко [Кошель И.В., Герасимов О.И., 1978]. На рентгенограмме обычно имеется локальное усиление легочного рисунка, иногда мелко- или крупноочаговые тени [Федоров А.Б., Гербер М.В., 1973]. Реже встречается специфическая инфильтрация плевры с выпотом в плевральную полость.

Гистологически картина легочного поражения характеризуется инфильтрацией бластными клетками межальвеолярных перегородок или образованием перибронхиолярных муфт; в случаях высокого лейкоцитоза возникают явления лейкостаза. Диагностика лейкозного пульмонита осложняется тем, что в терминальной стадии, как правило, бывает глубокая гранулоцитопения, на фоне которой обычная бактериальная

пневмония протекает атипично из-за отсутствия клеточной инфильтрации в очаге воспаления: скудны физикальные и рентгенологические данные. Поэтому диагностику пневмонии нередко приходится проводить *ex juvantibus*. Существенную помощь в диагностике лейкозного поражения легких может оказать исследование смыва бронхов (лаваж), где обнаруживаются бласты [Галстян Г.М., 1999]. При появлении одышки, цианоза, сухого кашля, интоксикации, даже если надежно локализовать пневмонический очаг не удастся, назначают антибиотики широкого спектра действия. В связи с тем, что лейкозный пульмонит, как правило, развивается на фоне рецидива опухоли, неэффективность антибиотической терапии делает более вероятными бластную инфильтрацию легочной ткани и необходимость смены цитостатического препарата. Нередко лейкозный пульмонит сочетается с бактериальной либо грибковой пневмонией.

В последние годы активная цитостатическая терапия, γ -облучение локальных лейкозных опухолей, применение антибиотиков широкого спектра действия, использование для лечения и профилактики геморрагий тромбоцитарной массы, свежзамороженной плазмы, включение гепарина в терапию ДВС-синдрома существенно изменили клиническую картину лейкоза. Практически исчезли обширные некрозы в полости рта, носа, развивавшиеся на почве распада лейкоэмических пролифератов, стали заметно менее выраженными геморрагии.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Положение о прогностических факторах при острых лейкозах возникло сравнительно недавно - с момента появления адекватной химиотерапии, так как только использование стандартных программ позволяет выделить больных с определенными клиническими, морфологическими, цитогенетическими, иммунофенотипическими и другими характеристиками, у которых удастся или не удастся добиться эффекта. Детальное изучение всех причин неуспеха при использовании стандартных протоколов приводит к формированию групп риска и соответственно созданию новых дифференцированных подходов к лечению этих больных. Прогностические факторы (или факторы благоприятного или неблагоприятного прогноза) могут включать возраст, пол, исходный соматический статус пациента, клинические, морфологические, цитогенетические, иммунологические характеристики лейкоэмических клеток и т. д.

Следует подчеркнуть, что наличие у пациента фактора неблагоприятного прогноза ни в ко-

ем случае не может вести к тактике паллиативной терапии. Все факторы прогноза используются и исследуются только в контексте возможности такого изменения терапии, которое привело бы к успеху у данной категории больных, то есть к исчезновению этих факторов риска при правильном лечении. Таким образом, за определением того или иного фактора прогноза следует необходимость определения адекватной целенаправленной терапии.

Самым первым и принципиальным фактором прогноза или риска для всех больных с любой формой острого лейкоза является адекватная химиотерапия. *Химиотерапия может быть определена как адекватная, когда используются программы и препараты, специально предусмотренные для каждой конкретной формы острого лейкоза, когда дозы цитостатических препаратов в этих программах соответствуют расчетным (на m^2), когда интервалы между курсами и этапами лечения соответствуют, предусмотренным в программе, когда*

проводится необходимая сопроводительная терапия (антибиотикотерапия, заместительная терапия компонентами крови, применение ростовых факторов), когда результаты оцениваются по четким критериям ремиссии, рецидива заболевания и соответственно проводится лечение.

Неадекватная химиотерапия представляет собой тот единственный фактор риска, который не связан с биологическими особенностями острого лейкоза и статусом больного и который, к сожалению, не дает шансов на длительную выживаемость большинству пациентов. Причем, необходимо подчеркнуть, что эффекты от неадекватной предлеченности никогда не могут быть исправлены дальнейшим лечением, каким бы интенсивным оно ни было, поскольку, успех химиотерапии определяется интенсивностью воздействия на лейкоэмический клон на первых этапах лечения. Неадекватная предлеченность злокачественной опухоли, состоящей из разных субклонов, ведет к отбору устойчивых к терапии субклонов и их последующему преимущественному росту.

К тем факторам риска, которые также можно назвать универсальными, относят возраст больного (особенно пожилых больных - старше 60 лет), число лейкоцитов в дебюте заболевания (более или менее $30 \times 10^9/\text{л}$), высокий уровень ЛДГ (более 700 ед), период предшествующей миелодисплазии или наличие трехростковой дисплазии кроветворения в момент диагностики ОНЛЛ. К менее распространенным и подтвержденным не всеми исследователями признакам, определяющим прогноз пациента, принадлежат следующие: наличие очага инфекции до начала химиотерапии, высокие цифры креатинина, тяжелый геморрагический синдром в дебюте, нейрорлейкемия. Также к довольно простым признакам, которые позволяют приблизительно оценить прогноз у данного конкретного больного, относят, конечно, и морфологические варианты ОМЛ. Монобластный, эритробластный, мегакариобластный острые лейкозы достаточно единодушно относят к группе неблагоприятного прогноза.

Стандартная химиотерапия индукции представляет собой классифицирующий фактор - после завершения двух курсов индукции больные естественным образом подразделяются на две группы: больные в полной ремиссии и больные с резистентной формой ОМЛ. Все больные с резистентной формой ОНЛЛ относятся к группе неблагоприятного прогноза. Вероятность появления и развития резистентности при ОМЛ наиболее часто связывают с повышенной экспрессией гена множественной лекарственной резистентности и соответственно белка Р-

гликопротеина [Kartner et al., 1983]. Прогноз у больных, у которых в дебюте заболевания на клетках определяется экспрессия Р-гликопротеина или выявляется повышенная экспрессия *mdr1*-гена, существенно хуже.

Казалось бы, многочисленные факторы прогноза, определяемые довольно просто, могут служить объективной причиной тому, чтобы цитогенетические исследования для определения характерных маркеров лейкоэмических клеток при ОНЛЛ не стали принципиально важными. Тем не менее, в настоящее время наиболее прогностически значимыми и, более того, определяющими дифференцированное лечение определенных вариантов ОНЛЛ стали именно цитогенетические характеристики лейкоза. Многочисленные работы по определению корреляции между цитогенетическими аномалиями, терапией и результатами лечения позволили выделить три основные группы больных ОНЛЛ. Если учитывать стандартизованную и унифицированную терапию ОНЛЛ, то к группе благоприятного прогноза относят больных, у которых определяется *inv 16*-й, *t(8,21)*; промежуточного прогноза - больных с *t(15,17)* и нормальным кариотипом; плохого прогноза - больных со всеми остальными хромосомными аберрациями (особенно трисомией 8, моносомией 5 и 7, делецией 5q и 7q, *t(9;11)*, *t(6;9)* и т.д.). Причем, необходимо учитывать тот факт, что любая аномалия 16-й хромосомы (за исключением ее инверсии) также относится к неблагоприятным вариантам. Промиелоцитарный лейкоз на фоне современной терапии с использованием полностью трансретиноевой кислоты и высоких доз даунорубицина (60 мг/м^2) теперь относят к исключительно благоприятным формам острых миелоидных лейкозов.

Оценивая прогноз заболевания у больного ОНЛЛ по цитогенетическим маркерам, следует подчеркнуть, что значимость этих маркеров утрачивается с течением времени, то есть, если у пациента, у которого кариотип лейкоэмических клеток отнесен к неблагоприятному, достигнута ремиссия, и она сохраняется более года, то данный признак теряет свое прогностическое значение. В этой связи хотелось бы еще раз подчеркнуть, что неблагоприятные прогностические факторы не должны определять пессимистический подход к терапии таких больных, не означают бессмысленность лечения, а, наоборот, предполагают усовершенствование терапии.

При острых лимфобластных лейкозах наиболее значимым фактором прогноза считается число лейкоцитов в момент диагностики. Существует обратная линейная зависимость между числом лейкоцитов в гемограмме и длительно-

стью ремиссии. Результаты лечения больных с лейкоцитозом более $100 \times 10^9/\text{л}$ пессимистичны. Интересно отметить, что, если ремиссия у больного с исходным гиперлейкоцитозом сохраняется более 24 месяцев, то указанный фактор теряет свою прогностическую значимость для долгосрочной выживаемости.

Вторым наиболее важным прогностическим фактором является возраст пациента на момент установления диагноза острого лейкоза. Выживаемость больных в возрасте от 2 до 6 лет практически в полтора раза выше таковой у больных моложе 2 лет и старше 6. У детей моложе одного года исключительно плохой прогноз вследствие сочетания множественных неблагоприятных признаков в данном возрасте - гиперлейкоцитоз, большие экстрамедуллярные очаги лейкемического роста, нейролейкемия, медленный ответ на терапию, определенные хромосомные aberrации. У детей в возрасте от 10 до 20 лет вероятность благоприятного исхода ниже, чем у детей моложе 10 лет, но значительно выше, чем у пациентов старше 20 лет, и особенно у пожилых больных (старше 55-60 лет). Если у взрослых больных в возрасте от 15

до 25 лет полная ремиссия достигается в 92% случаев, в возрасте от 25 до 60 лет - в 77%, то у пожилых больных - лишь в 55%.

Третьим, независимым, важным и легко определяемым в момент диагностики фактором является уровень ЛДГ в сыворотке крови. Плохой прогноз - у пациентов с исходным уровнем ЛДГ, превышающим 1000 ед.

Воспроизводимым практически в каждом исследовании по лечению ОЛЛ фактором риска является время достижения эффекта на химиотерапии. Если полная ремиссия у больных достигается в течение 4 недель индукционного лечения, то долгосрочные результаты у них существенно лучше по сравнению с теми пациентами, у которых ремиссия констатируется позже.

Остальные принципиально важные факторы прогноза при ОЛЛ могут быть определены не только на основании простых клинических признаков, а требуют определенных лабораторных подходов (иммунофенотипирование, цитогенетические исследования, молекулярно-биологические методы) (см. раздел «Острый лимфобластный лейкоз»).

ЭТАПЫ И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Химиотерапия острых лейкозов берет свое начало с 1946 г., когда был синтезирован первый цитостатический препарат - уретан. В 1947 г. появились и стали использоваться в терапии острых лейкозов антагонисты фолиевой кислоты, в 1949 - глюкокортикоиды, в 1953 - 6-меркаптопурин; в 1958 - циклофосфамид, в 1960 - винкристин, в 1966 - цитозин-арабинозид и антрациклины [Creutzig и., 1990].

Монотерапия 6-меркаптопурином позволяла достигать полной ремиссии у 10-20% больных ОМЛ, при использовании цитозин-арабинозида или даунорубицина - у 20-50% больных. Тем не менее, в любом случае длительность этих ремиссий была невелика (в среднем - 8 месяцев). Первая программная химиотерапия предложена для лечения детских лимфобластных лейкозов в начале 60-х годов, и именно это событие можно считать началом современной эры химиотерапии острых лейкозов. Лишь комбинированная химиотерапия при ОЛЛ и ОНЛЛ позволила увеличить и процент достижения полной ремиссии, и ее длительность, и в ряде случаев говорить о выздоровлении от этого заболевания.

За исключением малопроцентного острого лейкоза и острого эритромиелоза установление диагноза острого лейкоза требует немедленной активной цитостатической терапии и только по специальным программам: всякого рода цито-

статические полумеры, создание схем «для данного больного» недопустимы. Целью терапии острых лейкозов является эрадикация лейкемического клона, восстановление нормального кроветворения, достижение длительной безрецидивной выживаемости больных или выздоровление.

Это достигается за счет использования митотоксических противоопухолевых препаратов, которые быстро уменьшают объем опухолевой массы, вызывая глубокую аплазию кроветворения. Но именно в период аплазии возникает так называемое состояние «клональной конкуренции», когда пролиферативное преимущество получают клетки нормального кроветворения, которые и репопулируют костный мозг, восстанавливая здоровое поликлональное кроветворение.

Лечение острого лейкоза представляет собой многоэтапный и многокомпонентный процесс, сопровождающийся большим числом осложнений, связанных непосредственно с самим лечением. Для всех острых лейкозов существует четыре основных этапа терапии - индукция ремиссии, консолидация, поддерживающая терапия и профилактика нейролейкемии. Период начального лечения, целью которого является максимально быстрое и существенное сокращение опухолевой массы и достижение полной ремис-

сии, называется периодом **индукции** ремиссии. Именно в период индукции ремиссии на фоне применения цитостатических средств происходит драматическое уменьшение количества лейкемических клеток (на 99-99,9%, т.е. на 2-3 порядка).

Вторым этапом терапии острых лейкозов является **консолидация** ремиссии (речь идет о полной ремиссии) - закрепление достигнутого противоопухолевого эффекта. В большинстве случаев консолидация является наиболее агрессивным и высокодозным в плане цитостатических препаратов этапом в лечении острых лейкозов. Задачей этого периода является по возможности полное уничтожение лейкемических клеток, остающихся после индукции ремиссии.

После консолидации ремиссии (обычно 1-2 курса) следует период **поддерживающего лечения**. При разных вариантах острых лейкозов существуют разная длительность и интенсивность поддерживающей терапии, но принцип ее одинаков для всех видов острых лейкозов - продолжение цитостатического воздействия в малых дозах на возможно оставшийся опухолевый клон.

Важнейшим элементом в лечении острых лейкозов является **профилактика нейролейкемии**. Этот элемент распределяется на все периоды лечения - индукцию ремиссии, консолидацию и поддерживающее лечение. В период индукции выполняется контрольно-диагностическая пункция, а затем - профилактическое введение цитостатических препаратов интратекально (цитозин-арабинозид, метотрексат, дексаметазон или преднизолон). В ряде программ химиотерапии интратекальное введение препаратов не используется, а профилактика осуществляется за счет многократного увеличения дозы внутривенно вводимых препаратов - метотрексата (до 5 г/м²) и цитозин-арабинозида (до 3 г/м²), которые только в указанных дозировках создают терапевтические концентрации в ликворе. Противоречивым вопросом остается применение облучения головы в качестве профилактики нейролейкемии. У детей практически все исследователи либо отказались от данного способа, либо снизили дозы облучения с 2,4 до 1,8 Гр. От облучения можно отказаться, если полноценно и в полном объеме провести химиопрофилактику, однако, в случае плохой переносимости интратекальных инъекций, оно может стать единственным способом профилактики. Облучение головы является обязательным этапом лечения нейролейкемии. Обычно основной период профилактики нейролейкемии (5 интратекальных введений) при острых лимфобластных лейкозах осуществля-

ется во время проведения первой фазы индукционного лечения, затем в течение 2,5 лет выполняются профилактические пункции 1 раз в 3 месяца на фоне поддерживающей терапии. При ОНЛЛ проводится только основной этап, который обычно осуществляется за период первых 3-4 курсов лечения.

Если у больного после 2 месяцев терапии ремиссия не достигнута, то констатируется **резистентная форма** острого лейкоза. Данная ситуация является проявлением первичной резистентности. Выделяют несколько видов резистентности при острых лейкозах: во-первых, - первичную (отсутствие ремиссии после первичного *адекватного* цитостатического воздействия или ранний рецидив в течение полугода от момента достижения первой ремиссии) и вторичную (возврат болезни после достижения ремиссии - рецидив); и, во-вторых, - в зависимости от механизмов ее развития (фармакокинетическая, цитокинетическая, лекарственная или химическая). Примером фармакокинетической резистентности являются естественные барьеры для проникновения цитостатиков - гематоэнцефалический, в яичках. Цитокинетическая резистентность обусловлена кинетическими характеристиками клеточного цикла опухолевой клетки - быстрый рост лейкемических клеток (например продолжительность клеточного цикла - 16 ч), опережающий пролиферацию нормальных предшественников, после цитостатического воздействия или очень медленная пролиферация опухолевых клеток (клеточный цикл - 238 ч), не позволяющая циклоспецифичным препаратам оказывать свое воздействие [13, 127]. Наиболее сложным и многокомпонентным является феномен лекарственной устойчивости. Приведем некоторые механизмы развития лекарственной резистентности:

1. Нарушение захвата лекарственного препарата клеткой - метотрексата, мельфалана.
2. Усиленное выведение препарата из клетки с помощью Р-гликопротеина - продукта гена множественной лекарственной устойчивости (MDR-ген) - антрациклинов, элиподифлотоксинов, винкристина, актиномицина D.
3. Изменение ферментов, которые опосредуют цитостатические эффекты препаратов - элиподифлотоксины, антрациклины, метотрексат, винкристин.
4. Недостаточная активация цитостатического препарата - цитозин-арабинозид, 6-меркаптопурин.
5. Усиленная инактивация цитостатического препарата - цитозин-арабинозид, алкилирующие агенты.
6. Амплификация генов, ответственных за синтез ферментов, которые ингибируют цитоста-

тические эффекты - метотрексат, цитозин-арабинозид, 2-деоксикоформидин.

7. Усиление репарации ДНК после цитостатического воздействия - цисплатин, алкилирующие агенты, антибиотики.

Развитие лекарственной устойчивости свойственно поведению всех злокачественных опухолей, в том числе и острым лейкозам. В целом механизм изменчивости опухолевых клеток - появление больших аномальных форм, утрата зернистости и т.п. - отражает их повышенную мутабельность, рождение субклонов, отбор которых и ведет к сохранению наиболее автономных элементов. Сейчас стало известно, что в основе повышенной мутабельности и появления субклонов лежит мутация гена, ответственного за синтез белка p53, который определяет гибель мутировавшей нормальной клетки. Если ген p53 сам мутировал, то несущая его клетка при случайной мутации не погибнет, а разделится и даст мутантное потомство - появится субклон. Этот субклон в системе клеток острого лейкоза может обладать устойчивостью ко многим цитостатическим препаратам, а может - и это бывает нередко - обрести устойчивость к какому-то одному цитостатику.

Перечисленные механизмы развития лекарственной устойчивости лишь в небольшой степени отражают всю сложность проблемы, но всем перечисленным ситуациям было найдено клиническое подтверждение. Наиболее широко обсуждаемая причина развития лекарственной резистентности - это экспрессия и функционирование Р-гликопротеина - «белка-помпы», удаляющей из клетки цитостатические препараты. И для ОЛЛ, и для ОНЛЛ доказано, что в случаях, когда определяется повышенная его экспрессия на лейкоэмических клетках, вероятность достижения полной ремиссии низка и ее продолжительность очень невелика. При рецидивах острых лейкозов процент бластных клеток, экспрессирующих этот белок в 2-3 раза выше, чем в дебюте болезни.

Полная клинико-гематологическая ремиссия острого лейкоза констатируется, когда объем опухолевой массы сокращается минимум на 95%, при этом число опухолевых клеток в организме больного продолжает составлять приблизительно 10^{8-10} . С учетом того, что в настоящее время стало возможным исследовать лейкоэмические клетки каждого пациента с помощью иммунофенотипирования, цитогенетического и молекулярно-биологических методов и определять индивидуальные маркеры этих клеток, то, принимая во внимание, что указанные методы обладают высокой разрешающей способностью (обнаруживается 1 лейкоэмическая клетка на 10^{5-6} нормальных гемопоэтических клеток),

можно отслеживать в динамике судьбу лейкоэмического клона. В этой связи появилось понятие минимальной остаточной, или резидуальной, болезни клональной ремиссии и молекулярной ремиссии.

Минимальной остаточной болезнью принято называть остаточную популяцию лейкоэмических клеток, которая может быть выявлена лишь с помощью новых высокочувствительных методов при условии, что имеется картина полной ремиссии. И, по сути дела, вся постремиссионная терапия острых лейкозов (консолидация, поддерживающая терапия) направлена на лечение минимальной болезни.

В табл. 39 указаны несколько современных подходов к детекции минимальной остаточной популяции опухолевых клеток.

Понятие минимальной остаточной болезни определяет такой феномен, как *клональная ремиссия*. При острых лейкозах в момент достижения клинической ремиссии может обнаруживаться два основных типа кроветворения:

1. Восстановление нормального (поликлонального) кроветворения.
2. Сосуществование нормального кроветворения и лейкоэмического (клонального в данной ситуации), что соответствует понятию минимальной остаточной болезни.

Клональные ремиссии были впервые описаны Ph. Fialkow с помощью метода, основанного на случайной инактивации связанного с X-хромосомой гена фермента Г-6-ФДГ [62]. Женщины-мулатки являются гетерозиготами по этому ферменту, поэтому в норме у них существует два типа фермента: 50% клеток несут один тип и 50% - другой. В случае развития у них лейкоза, кроветворные лейкоэмические клетки несут только один из двух типов фермента Г-6-ФДГ. Для изучения клональности возможно использование полиморфизма других генов, связанных с X-хромосомой (ген фосфоглицераткиназы, гипоксантинфосфорибозилтрансферазы и т.д.).

Удивительным является то, что, используя два метода для изучения состояния кроветворения в период клинической ремиссии (детекции клональности с помощью генов, связанных с X-хромосомой, и цитогенетическое исследование лейкоэмических клеток), Ph. Fialkow et al. доказали возможность существования третьего варианта клинической ремиссии, когда кроветворение восстанавливается в рамках лейкоэмического клона, то есть, химиотерапия убирает лейкоэмический быстропролиферирующий клон и позволяет предлейкемическому дифференцироваться до морфологически нормальных кроветворных клеток. Было обнаружено, что у некоторых пациенток в момент констатации полной клинико-гематологической ремиссии исчезали

Методы определения минимальной остаточной болезни

Методы	Число анализируемых клеток	Порог чувствительности, %	Примеры
Проточная цитометрия с определением анеуплоидии	10 000 - 50 000	5	Анеуплоидные клоны при ОЛЛ
Стандартная цитогенетика	20 - 100	1-5	inv(16) при ОНЛЛ
FISH	100 - 1000	1-5	Трисомия 8 при ОНЛЛ
Созерен блот	1 000 000	1-2	Реанжировка гена Т-клеточного рецептора
Иммуноцитохимия (двойная метка)	10 000 - 100 000	0,02	TDT-позитивный ОНЛЛ
Культуральные методы	1 000 000	0,005	Лейкемические колонии в костном мозге перед ауотрансплантацией костного мозга
Мультипараметрическая проточная цитометрия	50 000 - 1 000 000	0,001	Аберрантный иммунофенотип CD13/CD34
ПЦР	1 000 000	< 0.0001	AML1-ETO при М4 зо

Примечание. Обозначения: TDT - терминальная дезоксирибонуклеотидная трансфераза; AML1-ETO - химерный ген, кодирующий ETO-протеин.

цитогенетические маркеры лейкемического клона, но при этом все кроветворение оставалось моноклональным.

С появлением методов молекулярной диагностики клиническая ремиссия стала в ряде случаев определяться и как молекулярная, когда не определяются те молекулярные маркеры (например, белки, синтезирующиеся в результате транслокаций), которые характеризовали лейкемические клетки данного больного в дебюте острого лейкоза.

Современные исследования доказали, что в большинстве случаев, когда в период ремиссии острого лейкоза у больных удается обнаружить в костном мозге минимальную популяцию лейкемических клеток - минимальную остаточную болезнь, наступает рецидив болезни. Например, вероятность развития рецидива у больных в ремиссии ОНЛЛ, у которых после второго курса консолидации продолжают обнаруживаться лейкемические клетки (на проточном цитофлюориметре на основании исходного аберрантного иммунофенотипа), составляет в течение 3 лет 80% по сравнению с 30%, у тех, у кого минимальная резидуальная болезнь не выявлялась ($p < 0,001$) [158]. В ряде случаев трактовать значимость персистенции резидуальной популяции, особенно если речь идет о молекулярных маркерах, очень сложно. Например, в настоящее время доказанным является тот факт,

что химерный белок - следствие транслокации t(8;21) при ОНЛЛ - может определяться у больных в течение длительного периода после окончания терапии (до 10 лет). При этом пациенты формально абсолютно здоровы и не лечатся, и рецидивы у них не возникают.

С другой стороны, определение в период ремиссии острого промиелоцитарного лейкоза или появления после исчезновения маркера транслокации (15;17) - белка PML/RAR α - во всех случаях означает последующий рецидив. Поскольку еще не накоплен достаточный материал по значимости детекции того или иного генетического маркера в период ремиссии острого лейкоза, а также с учетом очень высокой чувствительности этих методов, что может давать ложнопозитивные результаты, факт обнаружения у пациента минимальной остаточной болезни не является пока поводом к изменению тактики лечения, по-прежнему оставаясь лишь научной информацией, и не подлежит передаче больному.

Рецидивом острого лейкоза считается появление более 5% бластных клеток в пунктате костного мозга, сопровождающееся или не сопровождающееся изменениями в анализе периферической крови (тромбоцитопения, или лейкопения, или панцитопения) или внекостномозговое поражение (нейролейкемия, поражение яичек, увеличение селезенки и т.д.). Если у больного

выявляется бластных клеток более 5%, но менее 10%, при абсолютно нормальном анализе крови и нормальном соотношении ростков в пунктате костного мозга, то рецидив не констатируется. Выполняется повторная пункция костного мозга через 1-2 недели. Если бластоз в костном мозге сохраняется выше 5%, то рецидив констатируется. Иногда у больных, находящихся на поддерживающем лечении, обнаруживается увеличение процента бластных клеток до 10-12 (особенно в тех ситуациях, когда костномозговая пункция выполняется в ранние сроки выхода из агранулоцитоза). В этой ситуации также рекомендуется повторить пункцию костного мозга после полного восстановления кроветворения (через 1-2 недели). Бластные клетки в этих ситуациях могут быть так называемыми «клетками выхода», и в таком случае не требуется смена терапии, тогда как за констатацией рецидива чаще всего следует немедленная смена программы лечения на более агрессивные курсы, при которых существует довольно высокий риск гибели больного от самого лечения (15%).

Рецидив острого лейкоза принципиально отличается от дебюта заболевания и должен рассматриваться как появление и пролиферация нового устойчивого к проводимой терапии клона лейкоэмических клеток, то есть развивается вторичная резистентность как следствие опухолевой прогрессии. Внекостномозговые рецидивы (особенно рецидив нейролейкемии) встречаются приблизительно в 10% случаев при ОЛЛ, гораздо реже при ОНЛЛ, и чаще всего (но не всегда) в скором времени бластные клетки обнаруживаются и в костном мозге. Если констатирован изолированный внекостномозговой рецидив, то, кроме локальной терапии (лечение нейролейкемии, облучение яичка, удаление пораженного яичника и т.д.), обязательно проведение и системной индукционной терапии по протоколам, предусмотренным для таких рецидивов.

Во всех случаях констатации рецидива без высокого бластоза в костном мозге - 6-10% - необходима большая осторожность. Во-первых, такой бластоз должен быть *безупречен*: хроматин бластов имеет нежносетчатую структуру, равномерность окраски и калибра нитей. Во-вторых, желательно такой бластоз подтвердить глазами другого врача-лаборанта. В-третьих, поскольку изолированный рост бластов в костном мозге - явление маловероятное без сопутствующего роста процента лимфоидных клеток, надо обратить внимание и на них: при рецидиве их рост превысит прежний - в предыдущих пунктатах уровень достигнет более 20-30%.

Обсуждению цифровых характеристик рецидива подлежат полноценные, а не разбавленные кровью пунктаты, в которых не разбавлен-

ных эритрокариоты не менее 20-30%. В сомнительных случаях констатация рецидива недопустима и надо повторить пункцию через 2-3 недели. Кроме того, необходимо помнить, что бластные клетки рецидива очень похожи друг на друга по структуре ядра и цитоплазмы (в отличие от «клеток выхода») и практически всегда несут черты атипизма. При рецидиве повторные пункции покажут рост бластоза.

Вспомогательная терапия. Применение ростовых гемопоэтических факторов

Основополагающим принципом терапии острых лейкозов является применение цитостатических препаратов в адекватной дозе и за определенный отрезок времени с целью как можно более быстрого и полного уничтожения лейкоэмического клона. Вторым принципиальным положением является необходимость использования полноценной вспомогательной терапии - терапии *выхаживания* больных в период миелотоксического агранулоцитоза, аплазии кроветворения. Вспомогательная терапия подразделяется на два основных эшелона - профилактика осложнений и их лечение. К основным профилактическим мерам относят:

1. Обеспечение адекватного сосудистого доступа.
2. Профилактику синдрома массивного лизиса опухолевых клеток - водная нагрузка, форсированный диурез, аллопуринол.
3. Профилактику флебита, если не используется центральный венозный катетер (обеспечение правильного введения цитостатических и других препаратов).
4. Профилактику тошноты и рвоты.
5. Профилактику геморрагических осложнений с помощью заместительных трансфузий тромбоцитов (их уровень в периферической крови при нормальной температуре должен быть поддерживаем в среднем на цифрах не менее $20 \times 10^9/\text{л}$, при лихорадке - $30 \times 10^9/\text{л}$).
6. Профилактику и лечение анемического синдрома - заместительные трансфузии эритроцитарной массы. Уровень гемоглобина 75-80 г/л без признаков кислородной недостаточности (одышка при нагрузке, выраженная тахикардия, головные боли, головокружения, обморочные состояния) не требует трансфузий эритроцитов.
7. Профилактику электролитных нарушений (особенно на фоне применения калийвыводящих препаратов - амфотерицина В, мочегонных).
8. Профилактику коагуляционных нарушений (викасол - на фоне длительного применения β -лактамных антибиотиков, угнетающих нор-

мальную флору кишечника и изменяющих соответственно метаболизм витамина К, свежемороженая плазма и гепарин при гиперкоагуляционных состояниях).

9. Профилактику инфекционных осложнений - селективную деконтаминацию кишечника, желательного направленного действия в соответствии с результатами посевов флоры кишечника и полости рта, обработка полости рта, санитарно-гигиенические мероприятия.

Лечение осложнений, возникающих в период миелотоксической депрессии кроветворения, требует гораздо больших затрат, нежели их профилактика. К наиболее грозным осложнениям относятся различной степени тяжести инфекции (септицемия, локальная инфекция). Практически у 80-90% больных острыми лейкозами в период индукции ремиссии возникают те или иные инфекционные осложнения. Главный принцип лечения всех инфекций - эмпирическая поэтапная антибиотикотерапия с обязательными предварительными бактериологическими исследованиями для обеспечения возможности дальнейшего изменения спектра используемых антибиотиков уже в соответствии с результатами посевов.

Геморрагический синдром представлял угрозу лишь на первых этапах химиотерапии острых лейкозов. С появлением заместительной терапии тромбоцитами он занимает скромное место - 10-15% - в перечне наиболее серьезных осложнений. К сожалению, в России по результатам многоцентрового исследования по лечению острых миелоидных лейкозов геморрагические осложнения послужили причиной смерти у 50 % больных в период индукции ремиссии [9].

В качестве вспомогательных средств в начале 90-х годов в исследовательские программы химиотерапии острых лейкозов стали включать ростовые гемопозитивные факторы. Предпосылками внедрения биологически активных веществ в терапевтические протоколы при гемобластозах стали следующие свойства цитокинов, которые могут быть использованы в терапии острых лейкозов [13, 57, 135, 155]:

- Сокращение периода нейтропении (G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF).
- Выведение лейкемических клеток в S-фазу (прайминг) (G-CSF, GM-CSF, IL-3).
- Защита нормальных клеток-предшественниц кроветворения от воздействий ARA-C (G-CSF, GM-CSF, IL-3).
- Дифференцирующие эффекты на лейкемические клетки HL-60 линии (G-CSF, GM-CSF, IL-6).
- Прямое ингибирующее действие на лейкемические клетки (IL-6).

- Усиление фагоцитарной активности (*C. albicans*) (G-CSF, GM-CSF, M-CSF).
- Защита нелейкемических клеток от цитотоксических эффектов цитозин-арабинозида (GM-CSF, IL-3).

Большое исследование из Германии, включающее результаты по терапии 521 больного моложе 60 лет с *de novo* ОМЛ, не продемонстрировало увеличения процента ремиссий или ее продолжительности и продолжительности жизни, тем не менее отчетливый эффект получен по сокращению длительности нейтропении, продолжительности лихорадки и дней антибиотикотерапии. G-CSF вводился на 8-й день от начала химиотерапии [82].

В другом исследовании (Германия, 187 пациентов) получено увеличение процента полных ремиссий на фоне применения G-CSF (на 9-й день от начала курса химиотерапии): 60 и 43%, что, однако, не сказалось на ее продолжительности и выживаемости больных. Как и в предыдущих исследованиях, было получено сокращение длительности нейтропении на 5 дней [99].

Самое большое рандомизированное исследование представлено английской группой [73]. Оно включает 803 пациента ОМЛ всех возрастов. G-CSF вводился на 8-й день от начала введения цитостатических препаратов в дозе 5 мкг/кг в день. Пожалуй, это самая критичная работа, так как авторам не удалось получить статистически значимых отличий ни в одном из анализируемых параметров. Они делают заключение, что не получено никаких существенных преимуществ у больных, которым вводился G-CSF; более того, были получены данные о четкой тенденции к увеличению частоты рецидивов у больных, которым вводился G-CSF в период индукции ремиссии. Поэтому, основываясь еще и на экономических расчетах, они полагают, что использование указанного ростового фактора в программах терапии первичных больных ОМЛ нецелесообразно.

Таким образом, большинство исследований по применению G-CSF в программах индукции и консолидации ОНЛЛ демонстрируют достоверное сокращение периода нейтропении, при этом отмечают отсутствие изменений в продолжительности ремиссии и жизни пациентов. В рутинной практике можно не рекомендовать использование G-CSF при лечении острых лейкозов, однако, если речь идет о высокодозных программах, возможно его применение в дозе 5 мкг/кг в день либо сразу после завершения курса, либо с первого дня агранулоцитоза.

Сходное мнение по поводу применения GM-CSF в лечении острых миелоидных лейкозов. В отличие от G-CSF не во всех исследованиях доказано сокращение периода агранулоцитоза, не

были получены эффекты по улучшению процента достижения полных ремиссий и их продолжительности, достоверно больше возникает осложнений от самого препарата [134, 141, 157].

У пожилых больных использование GM-CSF любого происхождения сокращает период нейтропении и, возможно, частоту грибковых инфекций. Влияние на продолжительность жизни и ремиссии не столь однозначно. А, с учетом стоимости и возможных побочных эффектов, по-видимому, не следует применять GM-CSF во время и после химиотерапии у пожилых больных. Может быть, его использование целесообразно у пациентов с предшествующим инфекционным анамнезом (особенно, грибковые инфекции).

Общее заключение по данным о применении GM-CSF сводятся к следующему:

1. Если GM-CSF и сокращал период нейтропении, то лишь при проведении первого курса индукции (на всех последующих не влиял на длительность нейтропении).
2. При повторном его применении увеличивал продолжительность и глубину тромбоцитопении.
3. В случае неоднократного применения у пожилых больных он существенно сокращал продолжительность полной ремиссии и выживаемость больных.
4. По данным ряда исследователей, препарат уменьшал процент достижения ремиссии и ее продолжительность не только у пожилых пациентов и не только при повторном использовании, особенно если вводился после курса химиотерапии до выхода из нейтропении [160].
5. Существенно возрастал процент осложнений на фоне терапии за счет побочных эффектов GM-CSF.

С другой стороны, работы северно-европейской группы, абсолютно идентичные по дизайну группе EORTC, не выявили столь драматических эффектов на частоту достижения

ремиссий и ее продолжительность, на частоту резистентных форм и продолжительность жизни больных.

И в той, и другой группе, в отличие от немецких исследователей, использовался GM-CSF, получаемый из *E. coli*. А именно с этой формой препарата ряд исследователей связывает негативные результаты по применению GM-CSF. По-видимому, необходимо продолжение исследований в этой области, поэтому широкое применение GM-CSF в терапии ОНЛЛ не рекомендуется. Его применение, по всей видимости, может быть эффективным у больных с предшествующими инфекционными осложнениями, особенно грибкового генеза. Возможно, этот препарат займет свое место при создании программ иммунотерапии минимальной остаточной болезни с помощью дендритных клеток, индукция их пролиферации осуществляется только в присутствии GM-CSF (и IL-2, TNF α) и в других программах иммунотерапии [63].

Особого внимания заслуживает тот способ введения препаратов, который называется "прайминг", то есть ростовой гемопозитический фактор вводится за несколько (не более 48 ч) дней до начала курса химиотерапии [35, 57, 101, 160]. Стратегия "прайминга" базируется на способности G-CSF стимулировать пролиферацию лейкемических клеток *in vitro*, увеличивая таким образом процент этих клеток в фазе синтеза, что принципиально важно для осуществления цитостатического воздействия препаратами, активными именно в период S-фазы, изменять метаболизм цитозин-арабинозида, повышая его цитотоксичность и, увеличивая соответственно гибель клеток, принадлежащих к лейкемическому клону.

Этот способ применения ростовых факторов используется лишь в терапии острых миелоидных лейкозов. При ОЛЛ введение ростовых факторов начинается после достижения ремиссии лишь для сокращения периода аплазии.

ОСОБЕННОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ

Острые миелоидные лейкозы

Термин "острые миелоидные лейкозы" (ОМЛ) или «острые нелимфобластные лейкозы» (ОНЛЛ) объединяет группу острых лейкозов, схожих по происхождению из клеток-предшественниц миелопоэза, чаще всего ограниченно дифференцирующихся по миелоидной или моноцитарной линии кроветворения, но отличающихся между собой определенными морфологическими, иммунофенотипическими и цитогенетическими характеристиками. Около 10% ОМЛ имеют эритроидную или мегакариоцитар-

ную направленность. Вместе с тем, ОМЛ или ОНЛЛ - разнородные заболевания, требующие четкого внутреннего дифференцирования, поскольку это определяет как терапевтические подходы, так и исходы лечения.

Они диагностируются в любом возрасте, однако частота их возникновения возрастает по мере старения. Средний возраст, составляет 60-65 лет. В среднем ОНЛЛ заболевает 2 человека на 100 000 населения в год.

Клинические проявления этих лейкозов часто очень неспецифичны. Слабость и недомогание

могут предшествовать диагнозу за много месяцев до его установления. Бледность, головокружение могут служить проявлениями анемического синдрома. Лихорадка и потливость в дебюте болезни отмечаются у 15-20% больных, причем иногда не связаны с каким-либо инфекционным процессом, который также часто определяется в начале заболевания (ангины, пневмонии, и т.д.). Нередким симптомом являются те или иные проявления геморрагического синдрома. Петехиальные высыпания, экхимозы обнаруживаются в момент диагностики у 50% больных. Иногда единственным симптомом болезни может стать кровотечение: маточное или носовое, из желудочно-кишечного тракта, десен, почек и т.д.

Около половины больных отмечают незначительное похудание, у 20% отмечаются оссалгии. Органомегалия не является ярким диагностическим признаком при ОНЛЛ, но в среднем увеличение размеров печени, селезенки, лимфоузлов определяется у 50% пациентов. У 10% наблюдаются специфическая инфильтрация кожи - лейкемиды. Очень характерной чертой является инфильтрация десен у больных с миеломоно- и, особенно, монобластным вариантом ОМЛ. Исходное поражение центральной нервной системы при ОМЛ встречается редко и чаще всего ассоциируется с гиперлейкоцитозом или монобластными вариантами ОНЛЛ.

При лабораторном исследовании выявляются очень разнородные показатели периферической крови в дебюте заболевания. Более чем у половины больных число лейкоцитов повышено, но лейкоцитоз более $100 \times 10^9/\text{л}$ определяется менее, чем у 20% пациентов. Гиперлейкоцитозы при ОНЛЛ, в отличие от ОЛЛ, всегда имеют клинические проявления - лейкостазы возникают в сосудах головного мозга, вызывая неврологическую симптоматику (головную боль, загруженность, невозможность концентрировать внимание), легких, что проявляется дыхательной недостаточностью, в сосудах почек и т.д.

У больных с гиперлейкоцитозом необходимо проведение предфазы лечения (преднизолон + циклофосфан при ОЛЛ, гидроксимочевина при ОНЛЛ, гидроксимочевина может работать и при ОЛЛ), гидратационной терапии и назначение аллопуринола. Возможно проведение лейкофезов, но данный подход по эффектам не отличается от перечисленных выше. Все больные с гиперлейкоцитозом (особенно выше $100 \times 10^9/\text{л}$) требуют профилактики нейролейкемии. Как прогностический критерий чаще всего фигурирует цифра $30 \times 10^9/\text{л}$: если число лейкоцитов в момент диагностики превышает указанную цифру, больные оцениваются как принадлежащие к группе высокого риска.

В 85-90% случаев бластные клетки обнаруживаются в мазке периферической крови, причем их число может колебаться от 2-3% до 90-95%. Обычным явлением в момент диагностики являются нейтропения, анемия, тромбоцитопения различной степени выраженности.

При определенных формах ОНЛЛ, чаще всего при острых промиелоцитарных лейкозах, ярким клиническим признаком является ДВС-синдром. Он обусловливается высвобождением прокоагулянтов из лизосом лейкемических клеток и часто усугубляется при проведении цитостатической терапии за счет разрушения большого числа бластных клеток.

У половины больных ОМЛ встречается гиперурикемия, особенно в период начала химиотерапии и лизиса опухолевых клеток. В ряде случаев при неправильном ведении пациентов возникает острая почечная недостаточность за счет блокады почечных канальцев уратами. С целью профилактики данного состояния назначают массивную гидратацию (3 л на м^2 поверхности тела в сутки) и аллопуринол (от 600 мг в сутки). У больных с монобластным и миеломонобластным острым лейкозом могут выявляться высокие цифры содержания лизоцима в сыворотке крови. Повышенное содержание лизоцима усугубляет повреждение почечных канальцев, служит причиной глубокой гипокалиемии, не связанной с диуретиками и антибиотиками. У ряда больных отмечается увеличение показателей лактатдегидрогеназы в сыворотке крови, причем этот показатель, как и при ОЛЛ, может служить прогностическим фактором: его увеличение в 2 раза выше нормы свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

В костном мозге у всех больных обнаруживаются десятки процентов бластных клеток. Костный мозг в большинстве случаев гиперклеточный, жировая ткань полностью замещена опухолевыми клетками, число мегакариоцитов обычно снижено, и они дистрофичны. У 30% пациентов с первичным ОМЛ отмечаются те или иные признаки дисплазии кроветворения: наиболее часто дизэритропоэз или дизгранулоцитопоз, или дизмегакариоцитопоз, или их сочетания. Эти понятия имеют четкие морфологические характеристики и могут оцениваться в плане прогностических факторов. Дизэритропоэзу свойственно: гипо- или гиперплазия красного ростка, непропорциональное увеличение незрелых форм, мегалобластность, расщепленность ядер, многоядерность, вакуолизация и выросты цитоплазмы, кольцевые сидеробласты и т.д. Дизгрануломоноцитопоз характеризуется гипер- или гипоплазией гранулоцитарного ряда либо моноцитарной гиперплазией, отмечаются псевдопельгеровская аномалия, диссоциация

между зрелостью ядра и цитоплазмы, гиперсегментация ядер, кольцевые ядра, микроформы гранулоцитов, миелоцитов и промиелоцитов, беззернистые промиелоциты, увеличение процента недифференцированных клеток. Дизмегакариотопозз включает в себя следующие черты: гипер- или гипоплазия ростка, увеличение числа микроформ, одно-двух ядерные мегакариоциты, вакуолизация цитоплазмы, большие скопления мегакариоцитов [29, 91].

Феномен нарушения формы клеток, их созревания при острых лейкозах отражает сохранение дифференцировки в опухолевом клоне, которая в дальнейшем исчезает.

Трехростковая дисплазия отмечается в среднем у 5-7% пациентов (причем с возрастом частота данного морфологического феномена увеличивается в 2-3 раза). Считается, что у больных, у которых в момент диагностики острого лейкоза определяется трехростковая дисплазия кроветворения, независимо от варианта ОНЛЛ, отмечается неблагоприятный прогноз в плане долгосрочной выживаемости.

Обсуждаемые выше диагностические признаки и черты ОНЛЛ представляют собой результат рутинного обследования. Не менее важными в настоящее время в плане дифференциальной диагностики и оценки факторов прогноза являются те признаки, которые получают при иммунофенотипировании, цитогенетическом, молекулярно-биологическом обследовании.

Острый миелобластный, монобластный и миеломонобластный лейкозы

Среди нелимфобластных острых лейкозов взрослых миелобластная и миеломонобластная формы составляют около 80-90%, а все нелимфобластные острые лейкозы у взрослых составляют около 85 % всех острых лейкозов. У детей, напротив, около 85% составляют лимфобластные острые лейкозы.

Возрастные пики острого миелобластного и миеломонобластного лейкоза наблюдаются до 1 - 2 лет и после 10-12 лет. По данным Ellison, средний возраст больных острым миелобластным лейкозом - 38 лет, а больных миеломонобластным острым лейкозом - 50 лет.

В настоящее время выделяют некоторые формы миелобластного и миеломонобластного лейкоза. Принципы их выделения различны. Например, выделена форма острого миелобластного лейкоза с транслокацией хромосом - t(8; 21). Эта форма встречается в основном у лиц моложе 50 лет и относится к спонтанным (неиндуцируемым) лейкозам. Миелобластный острый лейкоз с транслокацией t(8; 21) относится к довольно благоприятно текущим. Красный росток

при этой форме нормальный, т. е. нелейкемический.

По кариологическому критерию выделена также форма миеломонобластного острого лейкоза с высокой эозинофилией в крови или только в костном мозге. Почти в 100% случаев у больных с этой формой лейкоза наблюдается инверсия хромосомы 16-й пары [Yunis 1983].

В миеломонобластной форме в настоящее время выделен еще один особый вариант, по морфологии атипичных клеток и по синдрому ДВС подобный острому промиелоцитарному лейкозу. Цитохимическая характеристика клеток, несмотря на обильную азурофильную зернистость, соответствует острой миеломонобластной форме. Клетки этого лейкоза не содержат характерных для промиелоцитарного лейкоза кислых сульфатированных мукополисахаридов. Фибробласты костного мозга при этой форме миеломонобластного лейкоза в противоположность промиелоцитарному лейкозу хорошо растут в монослойной культуре [Домрачева Е. В. и др., 1982]. Терапия данной формы острого миеломонобластного лейкоза наряду с цитозаром и рубомицином должна включать гепаринотерапию, свежзамороженную плазму, тромбоцитарную массу.

Термин **острый миелобластный лейкоз** объединяет несколько подтипов заболевания, которые отличаются друг от друга по степени дифференцированности, зрелости лейкемических клеток - миелобластов. Острый миелобластный недифференцированный лейкоз (M0) составляет приблизительно 5% от всех острых нелимфобластных лейкозов. Как ранее указывалось, данный диагноз может быть установлен лишь при выполнении иммунофенотипирования, поскольку при цитохимическом анализе клетки не могут быть отнесены к какому-либо подтипу. Принципиальным является обнаружение с помощью моноклональных антител или при электронном микрокопировании фермента миелопероксидазы. Клетки при M0 экспрессируют также следующие миелоидные антигены CD13, CD33, CD34. Для этой формы лейкоза не найдены характерные, ассоциированные только с этим подтипом ОМЛ, хромосомные aberrации. Прогноз при стандартном лечении неблагоприятный.

Острый миелобластный лейкоз без признаков созревания клеток (M1) составляет 15% всех ОМЛ. При этой форме ОМЛ определяется минимальная степень миелоидной дифференцировки, то есть определяется менее 3% промиелоцитов, отсутствуют палочки Ауэра. Типичными иммунофенотипическими маркерами являются CD13, 14, 15, 33, 34, HLA-DR. Несколько чаще, чем при других морфологических формах

ОНЛЛ, встречается инверсия 3-й хромосомы - inv(3), что ассоциируется с тромбоцитозом в дебюте болезни; в 3% случаях при M1 обнаруживается t(9;22).

Острый миелобластный лейкоз с признаками созревания (M2) составляет около 25% всех ОМЛ. Характерные иммунофенотипические маркеры - CD13, 15, 33, 34, HLA-DR. В 15-20% всех случаев M2 определяется транслокация (8;21). Указанная транслокация встречается, хотя и очень редко, и при миеломонобластных острых лейкозах.

Для миелобластных лейкозов вообще не характерно увеличение органов, экстрамедуллярные поражения. В случаях с t(8;21) у 25% больных обнаруживаются спленомегалия, у 20% - зеленеющие на разрезе опухоли - хлоромы, описана эозинофилия, морфологические признаки аномального созревания нейтрофилов (гипогранулярность, псевдопельгеровская аномалия). Эта группа ОМЛ в настоящее время рассматривается как отдельный лейкемический клинко-патологический синдром [98]. В результате указанной транслокации в область гена, кодирующего ETO протеин и находящегося на длинном плече 8-й хромосомы, переносится ген AML1, расположенный на длинном плече 21-й хромосомы и кодирующий транскрипционный регуляторный фактор CBF α . Итогом транслокации является химерный ген AML1-ETO и соответственно белок CBF α -ETO. В норме белок CBF α напрямую связывается с молекулой ДНК, к нему присоединяется CBF β , увеличивая аффинность CBF α к ДНК. В результате образования этого белкового комплекса происходит активация транскрипции генов белков, ответственных за миелоидную дифференцировку (IL-3, GM-CSF, миелопероксидаза). Химерный белок не утрачивает способность связываться с ДНК, однако в результате его действия происходит ингибирование транскрипции и соответственно нарушаются механизмы дифференцировки миелоидных клеток. Для острого миелобластного лейкоза с t(8;21) характерен хороший ответ на химиотерапию и хорошие долгосрочные результаты. Клетки данного варианта ОМЛ очень чувствительны к воздействиям цитозинарабинозида, особенно в высоких дозировках, поэтому при применении в программах лечения данного варианта ОМЛ этого препарата в дозах, превышающих 1 г/м², вероятность безрецидивной выживаемости больных возрастает до 70%. При этой форме острого миелобластного лейкоза описан уникальный феномен персистенции в период полной клинко-гематологической ремиссии минимальной остаточной популяции лейкемических клеток. Это определяется с помощью полимеразной цепной реакции, которая

позволяет обнаруживать 1 клетку, несущую указанную транслокацию, среди 10⁵ нормальных. У больных, «снятых» с терапии и находящихся в полной ремиссии длительное время (до 8 лет), в результате проведения ПЦР обнаруживается продукт химерного гена CBF α -ETO вследствие t(8;21) [114]. Этот факт заставляет предположить, что указанная транслокация, хотя и является маркером заболевания, не представляет собой финальный этап лейкозогенеза, то есть требуется дополнительное воздействие для превращения указанного клона в истинно лейкемический.

В группе острых миелобластных лейкозов с определенной степенью дифференцировки (M2) выделяется еще один подтип с характерной цитогенетической аномалией и клинко-лабораторными признаками. Это острый миелобластный лейкоз с базофилией и транслокацией (6;9). Прогноз при данной форме лейкоза крайне неблагоприятный. Базофилия изредка встречается при миеломонобластном лейкозе.

МН Острый миеломонобластный лейкоз диагностируется у 25-30% больных с ОНЛЛ. Нередко у пациентов отмечаются увеличение размеров печени и селезенки, лимфоаденопатия, гипреплазия десен, инфильтрация кожи намного чаще, чем при других миелоидных лейкозах, встречается поражение центральной нервной системы, иногда — клиника ДВС-синдрома. Клетки экспрессируют маркеры как миелоидной, так и моноцитарной линии кроветворения - CD13, 14, 15, 33, 34, HLA-DR. При этом варианте лейкоза встречаются различные цитогенетические аномалии, наиболее частые из которых - t(9;11), трисомия 4, t(1;7), транслокации, связанные с 11q23.

В рамках данной формы заболевания выделен особый вариант, характеризующийся четкими клинко-лабораторными критериями - это миеломонобластный лейкоз с эозинофилией и инверсией либо делецией 16q22 (M4zo). Впервые ассоциация между аномалией 16-й хромосомы и острым миелоидным лейкозом с эозинофилией описана в 1982 г. D.C. Arthur, C.D. Bloomfield et al. [18]. Было представлено описание 5 случаев ОМЛ с эозинофилией и del16(q22). К 1983 г. из 308 случаев цитогенетических исследований при ОНЛЛ у 18 была обнаружена inv 16-й хромосомы, причем в каждом случае был диагностирован миеломонобластный вариант с эозинофилией [97]. Эта форма представляет 5% от всех ОМЛ и характеризуется наличием в пунктате костного мозга более 5% аномальных эозинофилов с ядром моноцитоподобного вида и обилием крупных эозинофильных и базофильных гранул в цитоплазме. Чаще форма диагностируется у больных в возрас-

те 40-45 лет, у 20-25% из них определяются гиперлейкоцитоз (более $100 \times 10^9/\text{л}$), органомегалия, чаще, чем при всех других ОНЛЛ, встречается нейролейкемия (либо в дебюте, либо в рецидиве.)

Молекулярно-генетические исследования позволили определить, что в результате инверсии гена $\text{CBF}\beta$ на q плече (q22) и гена MYH11 на p (p13) плече 16-й хромосомы образуется химерный ген - $\text{CBF}\beta\text{-MYH11}$. Ген $\text{CBF}\beta$ кодирует белок, который представляет собой транскрипционный регуляторный фактор, действующий на процесс активации транскрипции в ассоциации с белком $\text{CBF}\alpha$ в так называемый ДНК-связывающий белковый (транскрипционный) комплекс. Химерный белок не утрачивает способность связываться с белком AML1 и предполагается, что транскрипционный комплекс в этой ситуации функционирует аномально. Также получены данные, что, если один из белков - $\text{CBF}\alpha$ или $\text{CBF}\beta$ - обнаруживается в клетке в избыточном количестве (в норме соотношение данных белков должно составлять 1:1), то процесс транскрипции генов, ответственных за миелоидную дифференцировку, ингибируется. Ген MYH11 кодирует тяжелую цепь миозина гладкомышечных волокон и в норме в гемопоэтических клетках не определяется [14, 98].

Редко inv 16-й хромосомы может встречаться при миелодиспластических синдромах, бластном кризе ХМЛ и других подтипах ОМЛ. При ОЛЛ описано два случая inv 16 [111].

Так же, как и при других формах ОНЛЛ, имеющих молекулярные маркеры, при М4эо проводится мониторинг минимальной остаточной популяции лейкоэмических клеток. Тем не менее, в отличие от промиелоцитарного и миелобластного с t(8;21) острых лейкозов значение обнаружения химерного белка пока четко не определено из-за небольшого числа наблюдений. Так, например, у 4 из 5 пациентов с ОМЛ в полной ремиссии от 4 до 22 месяцев обнаруживался транскрипт $\text{CBF}\beta\text{-MYH11}$, а у 1 больного, у которого ремиссия сохранялась более 60 месяцев, указанный белок не определялся [80]. В другой серии исследований у 3 пациентов в ремиссии через 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев от ее достижения продолжал определяться транскрипт $\text{CBF}\beta\text{-MYH11}$ [123]. Очевидно, что необходимо накопление информации для того, чтобы делать выводы о значимости этих исследований.

Клиническая картина острого миелобластного и миеломонобластного лейкоза обычно обусловлена гематологическими нарушениями. Тяжелое начало болезни с высокой температурой, некрозами в горле характерно для случаев

с глубокой первичной гранулоцитопенией (менее $750\text{-}500$ гранулоцитов в 1 мкл крови).

У взрослых, как правило, при лейкозах вначале нет увеличения лимфатических узлов, печени, селезенки. У детей внекостномозговые поражения бывают несколько чаще. Напротив, при врожденных формах этих лейкозов органы и кожные поражения встречаются достаточно часто.

Нейролейкемия редко бывает в начале болезни, но если не проводится ее профилактика, наблюдается приблизительно в четверти случаев как в ремиссии, так и в рецидиве.

Бластные клетки во внекостномозговых очагах часто утрачивают зернистость при окраске по Романовскому-Гимзе, но сохраняют пероксидазоположительность, выявляемую при цитохимическом исследовании и способность на разрезе давать зеленую окраску, которая в начале века послужила основанием для названия опухоли из таких клеток - хлорома.

Увеличение селезенки при остром миелобластном и миеломонобластном лейкозе умеренное; часто при миелобластном лейкозе вначале селезенку пальпировать не удастся, а лишь при рецидиве она иногда определяется в глубине подреберья. Обычно появление увеличенной селезенки совпадает и с другими признаками прогрессии: уход лейкоза из-под контроля ранее эффективных цитостатических препаратов, значительное угнетение нормальных ростков кроветворения и т.п. В отдельных случаях бывает и резкое увеличение селезенки, она достигает уровня пупка. В печени обычно не обнаруживается значительного увеличения, хотя, как правило, наблюдается инфильтрация ее паренхимы лейкозными клетками.

При остром миелобластном лейкозе опухолевое поражение легких наблюдается в 35% случаев, аналогичная картина имеет место и при других формах острого лейкоза, хотя, как правило, это поражение развивается в терминальной стадии.

Рецидив этих лейкозов характеризуется различными признаками: либо на фоне успешной поддерживающей терапии нарастает цитопения и появляются бластные клетки в периферической крови, либо возникают внекостномозговые очаги роста, определяющие соответствующую клиническую картину (например, боли в спине при инфильтрации нервных корешков, нарастающая почечная недостаточность при инфильтрации почек и т. п.), либо контрольная стерильная пункция обнаруживает рост числа бластных клеток на фоне неизменно хорошего состояния остальных показателей и удовлетворительного самочувствия больного. В связи с этим, больные острым лейкозом в периоде ре-

миссии должны оставаться под непрерывным гематологическим контролем с обязательным исследованием крови не реже 3 раза в месяц и костного мозга не реже 1 раза в 1-3 месяца.

Смерть может наступить на любой стадии процесса, на любом этапе прогрессии: при исключительно костномозговом поражении - от глубокого угнетения кроветворения, при распространении опухолевого роста на разные органы - в результате несовместимых с жизнью нарушений их деятельности. Частой причиной смерти больных становятся септицемия или другие инфекционные осложнения, обусловленные цитостатическим агранулоцитозом, а также геморрагический синдром, обусловленный глубокой тромбоцитопенией.

У детей эти формы могут протекать мягче, чем у взрослых, иногда удается получить несколько ремиссий [Кисляк Н.С. и др., 1981]. Мы наблюдали больную с острым миелобластным лейкозом в течение 6 лет (начало болезни в возрасте 7 лет), у которой первая ремиссия продолжалась около 2 лет, а затем было несколько повторных ремиссий; болезнь закончилась появлением множественных опухолей в коже, почках, молочных железах; состояние девочки было тяжелым лишь на протяжении последнего года болезни, до этого она редко поступала в клинику, училась в школе, получала лечение преимущественно амбулаторно. Однако и у детей острый миелобластный лейкоз дает ремиссии значительно реже, чем лимфобластный.

Картина крови. Гематологическая картина в момент диагностирования процесса может быть различной: умеренная анемия нормо- или слегка гиперхромного типа, лейкоцитоз с бластами в крови или лейкопения с наличием или отсутствием бластов, нормальное количество тромбоцитов или тромбоцитопения различной выраженности. В отдельных случаях данная форма острого лейкоза может начинаться с уже описанной так называемой предлейкемической стадии: парциальная цитопения или панцитопения, длительное отсутствие бластных клеток в крови и невысокое их содержание в костном мозге.

При миелобластном и миеломонобластном лейкозе бластные клетки содержат в цитоплазме азурофильную зернистость (от единичных гранул до десятков), нередко четко видимые в световом и электронном микроскопе палочки (тельца) Ауэра, которые являются прогностически благоприятным признаком - чаще удается достичь ремиссии.

Палочки Ауэра при остром миелобластном лейкозе обычно представлены трубчатыми структурами, ориентированными линейно, реже

гранулярными образованиями [Tulliez, Breton-Gorius, 1979]. При электронной микроскопии можно видеть переходные формы от азурофильных гранул к тельцам Ауэра, содержащим лизосомальные ферменты: кислую фосфатазу и пероксидазу. Присутствие гранул в цитоплазме миелобластов в некоторых случаях может выявляться только цитохимически. Форма ядра бластных клеток чаще круглая, иногда с небольшим вдавлением, или неправильная, но соотношение ядра и цитоплазмы всегда в пользу ядра.

В течение болезни бластные клетки описываемой формы лейкоза претерпевают закономерные изменения: ядро становится не круглым, а неправильным, цитоплазма из узкого ободка делается широкой, и клетки приобретают вместо круглых неправильные очертания. Зернистость, обнаруживаемая в начале болезни в большом проценте клеток, во многих из них становится невидимой в рецидиве, реакция на пероксидазу в миелобластах в этой стадии тоже нередко отрицательна, тогда как в начале болезни она в большинстве случаев положительна, даже в миелобластах без зернистости.

Острый монобластный лейкоз

Среди острых лейкозов монобластная форма наблюдается у 6,3% взрослых (наши данные) и у 2,6% детей [Hagbabin, 1975].

Клиническая картина этой формы лейкоза мало отличается от острого миелобластного лейкоза, хотя чаще выражены интоксикация и гипертермия. Несколько чаще наблюдаются осложнения, связанные с нейтропенией, а среди них - преимущественно некротические изменения слизистой оболочки рта и глотки. Им в известной мере способствует характерная для этой формы острого лейкоза лейкокемическая инфильтрация десен, ведущая к гипертрофии сосочков. Гингивит может быть обусловлен и самой нейтропенией.

При монобластном остром лейкозе процесс локализуется в основном в костном мозге, но отдельные группы лимфатических узлов и селезенка могут быть увеличены. Нередко развивается инфильтрация миндалин и десен, а на поздних этапах прогрессии возможно появление инфильтратов во всех внутренних органах и лейкемидов в коже, на серозных оболочках.

Картина крови. Этот лейкоз представлен крупными бластными клетками, имеющими бобовидное, с неглубоким вдавлением, нежно-структурное ядро с несколькими ядрышками; цитоплазма этих клеток меньше, чем у моноцита, но больше, чем у миелобласта; ее цвет бывает разных оттенков - от серо-голубого до интенсивно синего; она нередко содержит скудную

пылевидную азурофильную зернистость. Иногда такие клетки встречаются только в костном мозге, а в крови имеются более зрелые элементы, напоминающие моноциты, иногда почти ничем не отличимые от них. Встречаются случаи монобластного лейкоза с нейтрофилезом в крови и с «омоложением» лейкограммы до миелоцитов. Количество тромбоцитов обычно снижается.

При монобластном лейкозе в крови и костном мозге могут быть бластные клетки с круглым ядром и узким ободком цитоплазмы, и только цитохимические особенности свидетельствуют об их принадлежности к элементам моноцитарной природы. Особенностью этой формы острого лейкоза является цитохимическая характеристика моноцитарных элементов: они дают положительную реакцию на неспецифическую α НЭ и α НЭ, подавляемую фторидом натрия. Пероксидаза и фосфолипиды в этих клетках скудны. В отдельных случаях монобласты могут содержать ХАЭ и не содержать (или содержать очень мало) α НЭ - это свидетельство незрелости элементов моноцитарного ряда.

В сыворотке и моче больных монобластным и миеломонобластным лейкозами содержится много лизоцима (мурамидазы) - фермента, которым богаты нормальные моноциты [Яворковский Л.И., Гранте, 1971].

В ряде случаев острого монобластного и миеломонобластного лейкоза описано появление парапротеина в сыворотке (Ig G или M); его содержание уменьшалось по мере снижения процента бластных клеток, он исчезал в ремиссии [Allen et al., 1973]. В подобных случаях иммунофлюоресцентным методом было показано, что иммуноглобулины находятся на лейкозных клетках [Law et al., 1976]. Остается неясным, какие клетки продуцируют парапротеин при остром миеломонобластном лейкозе, так как лимфоцитоза и повышения уровня плазматических клеток при этом не наблюдалось; не исключено, что способность синтезировать иммуноглобулин могут приобрести лейкозные миеломонобласты в результате разрепрессирования неактивных генов.

К иммунологическим маркерам опухолевых клеток при ОМоЛ относят общие миелоидные CD13,33 и моноцитоидные CD14. Маркер ранних клеток-предшественниц CD34 определяется лишь при M5(a). Нередко на клетках экспрессируется маркер лимфоидных клеток CD4, но не CD2. К цитогенетическим аномалиям, наиболее часто определяемым при острых монобластных лейкозах, относят патологию 11q23 - транслокации t(9;11), t(10;11), t(11;17). Прогноз при данных вариантах заболевания неблагоприятный.

Частота полных ремиссий при остром монобластном лейкозе в условиях современной те-

рапии такая же, как при остром миелобластном лейкозе, - более 60% [Weinstein et al., 1980].

В последние годы применение блоков интенсивной терапии, в отдельных случаях - трансплантации костного мозга, позволили добиваться длительных ремиссий [T. Buchner]. Однако в целом острый монобластный лейкоз относится к весьма неблагоприятной группе.

Острый промиелоцитарный лейкоз

В 1957 г. Hillestad выделена самостоятельная форма острого лейкоза, для которой характерны особая морфология бластных клеток, содержащих обильную крупную зернистость, тяжелый геморрагический синдром и быстрота течения. Название «промиелоцитарный» лейкоз получил из-за внешнего сходства опухолевых клеток с промиелоцитами: крупная обильная зернистость заполняет цитоплазму и располагается на ядре. Однако ядро этих клеток атипично, и по всем остальным морфологическим особенностям, в частности гистохимическим, они отличаются от промиелоцитов.

В нашей стране острый промиелоцитарный лейкоз впервые описали Е.Б. Владимирская и Л.Б. Юшкевич в 1964 г. У детей этот лейкоз встречается очень редко, у взрослых - в 3,8% случаев [Тихонова Л.Ю., 1978]. Острый промиелоцитарный лейкоз встречается в 10% всех миелоидных лейкозов и представляет собой четко очерченную нозологическую форму с настолько характерными клинико-лабораторными признаками (типичная морфология опухолевых клеток, тяжелый геморрагический синдром - гематомный тип кровоточивости, ДВС-синдром, обычно лейкопения и более молодой возраст больных), что диагноз порой можно установить, основываясь лишь на клинических проявлениях.

Особенности клинической картины острого промиелоцитарного лейкоза заключаются в выраженности геморрагического синдрома (ДВС-синдром), который часто бывает первым признаком болезни. Геморрагии возникают на местах травм; в половине наших наблюдений отмечались маточные, носовые кровотечения, кровоподтеки; они появились у ряда больных на фоне умеренной тромбоцитопении - выше $20 \times 10^9/\text{л}$, а в отдельных случаях - и выше $100 \times 10^9/\text{л}$. Первые признаки кровоточивости нередко возникают за несколько месяцев до появления выраженной клинической картины, а признаки опухолевой интоксикации, слабость и потливость нарастают медленно. Об этом же свидетельствует наблюдение за развитием рецидива.

Масса опухоли, судя по инфильтрации костного мозга, долго остается относительно небольшой. Процент бластных клеток в костном

мозге даже в конце болезни обычно не более 75 - 85, а инфильтрация трубчатых костей бластными клетками нередко отсутствует. Лимфатические узлы практически не вовлекаются, редко увеличиваются селезенка и печень. Все это позволяет отнести острый промиелоцитарный лейкоз к «медленным» лейкозам.

Яркие проявления болезни, которые обычно видит врач, часто представляют собой ее финал на фоне еще относительно умеренного blastoza костного мозга. В патогенезе геморрагического синдрома при этой форме лейкоза решающая роль принадлежит ДВС-синдрому. Иногда этот процесс становится бурным и непрекращающимся и заканчивается молниеносной смертью больных от кровоизлияния в мозг.

Картина крови. Выражен полиморфизм бластных клеток. Многие клетки имеют цитоплазматические выросты, напоминающие псевдоподии. Цитоплазма окрашивается в голубой цвет различных оттенков (по Май-Грюнвальду или Романовскому-Гимзе). Обычно она густо заполнена довольно крупной полиморфной фиолетово-бурой зернистостью, многочисленной и на ядрах. В некоторых клетках имеется два типа гранул: более крупные - темно-фиолетовые и более мелкие - фиолетово-розовые. В цитоплазме лейкозных клеток нередко обнаруживаются тельца Ауэра. Исследование телец Ауэра при остром промиелоцитарном лейкозе методом электронной микроскопии показало, что это трубчатые структуры - скопления микротрубочек диаметром 15 мкм, возможно, производные эндоплазматического ретикулума; при этом лейкозе в отличие от острого миелобластного трубочки ориентированы гексагонально [Tullier, Breton-Gorius, 1978]. Другие азурофильные гранулы при этой форме лейкоза бывают двух видов: одни круглые гомогенные, другие - с редкими миелиновыми фигурами [Breton-Gorius, Houslay, 1973].

По особенностям морфологии лейкозных клеток выделяют два варианта острого промиелоцитарного лейкоза: типичный - макрогранулярный и микрогранулярный, который встречается приблизительно в 20% всех случаев данной формы лейкоза [McKenna et al., 1982]. В типичном варианте основную массу лейкозных клеток составляют элементы, имеющие зернистость, похожую по размерам на зернистость базофилов и тучных клеток, и лишь небольшой процент - элементы с мелкой, иногда пылевидной азурофильной зернистостью. При варианте, определяемом как микрогранулярный, такие мелкозернистые клетки преобладают. Они отличаются, кроме того, небольшими размерами, неправильными контурами, уродливостью ядер, часто дву- или многодольчатых. При микрогра-

нулярном варианте чаще, чем при макрогранулярном, наблюдаются лейкоцитоз в крови и выход лейкозных клеток в кровь.

Начало острого промиелоцитарного лейкоза часто сопровождается нормальными или слегка сниженными показателями красной крови - в половине случаев уровень гемоглобина выше 100 г/л. Содержание тромбоцитов у преобладающего большинства больных значительно снижено. Число лейкоцитов, как правило, также значительно снижено.

Цитохимическая характеристика макрогранулярных и микрогранулярных клеток острого промиелоцитарного лейкоза совпадает: резко положительная реакция на пероксидазу, липиды, высокая активность хлорацетат-эстеразы; реакция на α -нафтил-эстеразу невысокая и не подавляемая фторидом натрия. Реакция на кислые сульфатированные мукополисахариды при микрогранулярном варианте не проверялась, но отдельные клетки с мелкой азурофильной зернистостью при типичной форме острого промиелоцитарного лейкоза, как было отмечено М.И. Бронштейн, дают наиболее яркую реакцию этого типа.

Иммунофенотипически этот тип острого лейкоза характеризуется теми же маркерами, что острые миелобластные лейкозы, но на клетках ОПЛ не обнаруживается экспрессия ранних клеточных маркеров CD34, HLA-DR.

В 1977 г. J.D. Rowley и соавт. было доказано, что практически во всех случаях промиелоцитарного лейкоза обнаруживается транслокация t(15;17)(q22;q12-21) [136]. В результате этой транслокации, как показали дальнейшие исследования, так называемый PML-ген (ген промиелоцитарного лейкоза), расположенный на 15-й хромосоме, переносится на длинное плечо 17-й хромосомы в область, где находится ген рецептора ретиноевой кислоты альфа (RAR α) [68, 76, 77].

Ген RAR α относится к семейству рецепторных генов (гены рецепторов стероидных гормонов, эстрогенов, тиреоидных, витамина Д3), являющихся транскрипционными факторами, которые в присутствии определенных лигандов способны либо активировать, либо подавлять транскрипцию необходимых генов. Лигандом для гена RAR α является ретиноевая кислота. В норме этот ген участвует в регуляции дифференцировки миелоидных клеток [68, 76, 145].

Ген PML считается геном-регулятором роста и играет роль в созревании и активации различных клеток. Белок PML экспрессируется в основном в дифференцированных клетках, в постмитотическом периоде. Наибольшая экспрессия этого белка обнаруживается в клетках эндотелия, эпителиальных клетках и макрофагах.

Продуктом химерного гена PML/RAR α является патологический белок, сохраняющий в себе активные функциональные домены как белка RAR α , так и белка PML. При ОПЛ белок PML/RAR α накапливается в цитоплазме и ядре миелоидных клеток в большем количестве, чем в норме, что приводит к блоку дифференцировки клеток на уровне промиелоцита. Этот блок дифференцировки может быть снят в условиях высоких концентраций ретиноевой кислоты, что достигается при терапии полностью транс-ретиноевой кислотой (ATRA) [76].

Эффекты PML/RAR α -белка связаны не только с блоком дифференцировки, но и с регуляцией апоптоза и роста клеток. Так, *in vitro* клетки, экспрессирующие указанный белок, не подвергаются апоптозу в тех ситуациях, когда удаляются факторы, необходимые для поддержания их жизнеспособности (сыворотка или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), тогда как в контроле (в том случае, если отсутствует экспрессия PML/RAR α) - клетки погибают, то есть этот белок поддерживает жизнеспособность опухолевых клеток, блокируя механизмы апоптоза [76].

В последнее время выделено еще несколько транслокаций, которые обнаруживаются при типичном по морфологии и клинической симптоматике ОПЛ, например, t(11;17) и t(5;17). Вообще описано около 17 видов вариантных транслокаций при типичном ОПЛ, однако вновь следует подчеркнуть, что у подавляющего большинства больных выявляется t(15;17) [76, 145].

Диагностика острого промиелоцитарного лейкоза возможна уже на основании обычного анализа морфологии лейкозных клеток. Цитохимический тест подтверждает диагноз: гранулы патологических клеток содержат кислые сульфатированные мукополисахариды (М.И. Бронштейн). Этот тест специфичен для острого промиелоцитарного лейкоза. Вместе с тем кислые сульфатированные мукополисахариды не являются новым субстратом, свойственным только лейкоэмической клетке; в малом количестве это вещество определяется с помощью включения $^{35}\text{SO}_4$ в миелобласты и промиелоциты нормального костного мозга (Law et al., 1973). Специфична цитогенетика клеток.

Течение острого промиелоцитарного лейкоза до использования средств борьбы с кровоточивостью и современного лечения отличалось необыкновенной злокачественностью: нарастал геморрагический синдром, появлялись некрозы в горле, больных изнуряли проливные поты и лихорадка. Тяжелый токсикоз иногда за несколько дней приводил к шоку. В среднем болезнь продолжалась около 1 месяца; 70 % больных умирали от кровоизлияния в мозг.

В развитии и геморрагий, и токсикоза важная роль принадлежит самим лейкозным клеткам, содержащим и на поверхности, и в цитоплазматических гранулах избыток тромбопластина [Quigley, 1967; Gralnick, Tan, 1974]. Распад этих клеток, выход тканевого тромбопластина и лизосомальных протеаз провоцирует ДВС. О роли лейкозных клеток говорит резкое изменение картины болезни после начала эффективной цитостатической терапии: иногда уже на 2-й день падает температура и прекращается кровоточивость, хотя никакого восстановления кроветворения еще нет, а реализуется лишь цитостатический эффект.

Микрогранулярный вариант острого промиелоцитарного лейкоза приходится дифференцировать с вариантом миеломонобластного лейкоза, характеризующимся сходной морфологией клеток и таким же, как при промиелоцитарном лейкозе, синдромом ДВС. Дифференциальным признаком служат цитохимические особенности клеток: яркая реакция на α -нафтил-эстеразу, подавляемую фторидом натрия, положительна у миеломоноцитарных клеток в отличие от промиелоцитарных. Отличают острый промиелоцитарный от сходного с ним миеломонобластного варианта острого лейкоза - t(15;17).

Особенности роста фибробластов костного мозга в культуре: при остром промиелоцитарном лейкозе они практически не дают роста в монослойной культуре, тогда как фибробласты костного мозга при остром миеломонобластном лейкозе, внешне подобном промиелоцитарному, хорошо растут *in vitro* [Домрачева Е.В. и др., 1982].

Отдельные исследователи [Guatrin, 1973] пытаются отграничить от острого промиелоцитарного лейкоза острый базофильноклеточный лейкоз, опираясь на цитохимические методы. По их данным, этот вариант лейкоза имеет и клинические особенности, отличающие его от промиелоцитарного: течет без выраженного геморрагического синдрома, без ДВС-синдрома. Нам приходилось несколько раз наблюдать острый лейкоз, бластные клетки которого содержали обильную базофильную зернистость. Однако идентифицировать эти клетки как базофилы нам не удалось. От клеток острого промиелоцитарного лейкоза они отличались отрицательной реакцией на кислые сульфатированные мукополисахариды.

Именно с острым промиелоцитарным лейкозом связано одно из самых принципиальных и значительных открытий в области биологии лейкозов за последние 10 лет: обнаружение эффекта дифференцировки бластных клеток промиелоцитарного лейкоза под воздействием

дериватов ретиноевой кислоты - 13-цис-ретиноевой, ATRA, 9-цисретиноевой кислоты. Было доказано, что без химиотерапии только при использовании ATRA достигается полная ремиссия при ОПЛ, быстро купируется геморрагический синдром и ДВС-синдром. Эти работы впервые были опубликованы в середине 80-х годов китайскими исследователями, которые описали 95% вероятность достижения ремиссии при применении только ATRA [89].

Дальнейшие исследования продемонстрировали, тем не менее, что терапия только ретиноевой кислотой всегда и достаточно быстро заканчивается рецидивом (средняя продолжительность ремиссии 3,5 месяца). Лишь сочетание использования дифференцирующего лечения и цитостатического воздействия позволило получить очень хорошие результаты [59].

Маркерная транслокация при ОПЛ представляет возможность проследить судьбу лейкоемического клона в период ремиссии. PML/RAR α транскрипт определяется у всех больных, у которых ремиссия достигнута на терапии трансретиноевой кислотой, также у большинства, которым индукция осуществлялась с помощью только цитостатических препаратов - после первого индукционного курса. Найдена четкая взаимосвязь между негативными результатами ПЦР и вероятностью сохранения полной ремиссии. У 27 из 36 больных, у которых после 4 месяцев индукционной терапии продолжал определяться белок PML/RAR α , развился рецидив болезни. Важен тот факт, что если после ряда негативных результатов по определению PML/RAR α , указанный транскрипт вновь появлялся в повторных анализах, то всегда возникал рецидив [49].

Моноцитарный лейкоз новорожденных (врожденный моноцитарный лейкоз)

Очень редкая форма заболевания, характеризующаяся высоким моноцитозом в крови, увеличением печени, селезенки, медленным течением. На первых порах в крови преобладают зрелые формы, хотя присутствуют и промоноциты, и единичные монобласты. Все клетки обычно несут признаки атипизма.

Принадлежность опухоли к группе острых лейкозов сомнительна, так как заболевание через несколько месяцев или лет заканчивается выраженным бластозом. Более правильным будет отнесение этой опухоли к группе хронических лейкозов. Исходя из этих соображений он подробно описан в разделе "Хронический моноцитарный лейкоз".

Нозологическая чистота этой формы болезни неясна. Возможно, существуют и действительно

врожденные или очень ранние детские самостоятельные острые монобластные лейкозы. Из-за редкости заболеваний большинство вопросов о патогенезе, клинической картине, лечении остается открытым.

Острый эритробластный лейкоз (острый эритромиелоз, болезнь Ди Гульельмо)

Впервые описан в 1917 г. Di Guglielmo. Этот вариант лейкоза встречается менее, чем в 5% случаев миелоидных лейкозов взрослых и 0,6% детей. Нередко диагнозу предшествует довольно длительный предлейкемический период - у больного может определяться снижение гемоглобина, не связанное с дефицитом железа и витамина В₁₂, эритрокарицитоз (более 3-5 клеток на 100 эритроцитов), умеренная лейкопения ($2-4 \times 10^9/\text{л}$), тромбоцитопения $100-160 \times 10^9/\text{л}$ и т.д. В анамнезе больных острым эритромиелозом нередко лучевая или химиотерапия. Эта форма острого лейкоза чаще других описывается в качестве вторичного лейкоза у лиц, больных лимфогранулематозом, миеломной болезнью, эритремией. Среди вторичных лейкозов острому эритромиелозу отводится от 10 до 20%. В большинстве случаев это заболевание людей старше 60 лет.

Клиническая картина. В большинстве случаев начало острого эритромиелоза характеризуется анемическим синдромом, который нарастает медленно, сопровождается легкой иктеричностью. В клинике могут быть артралгии, серозиты, гемолитическая анемия. Анемия обычно умеренно гиперхромная, в крови встречаются эритрокарициты, ретикулоцитов обычно не более 1-3%. Картина крови может быть и алейкемической, но по мере развития болезни нарастает лейкоемизация: в кровь выходят или эритрокарициты, или бласты, или те и другие. Лейкопения, тромбоцитопения нередко наблюдаются уже с самого начала, иногда появляются позже. Билирубин обычно несколько повышен за счет непрямой фракции. При этом варианте острого миелоидного лейкоза может встречаться гипергаммаглобулинемия, положительная проба Кумбса, положительный ревматоидный и антинуклеарный фактор.

Картина крови. В отличие от предыдущих форм острого лейкоза, где диагностика основывается на обнаружении в пунктате костного мозга атипических бластных клеток и, следовательно, не представляет трудностей, при остром эритромиелозе пунктат часто сам по себе становится загадкой. Для этого заболевания характерно резкое увеличение содержания клеток красного ряда в костном мозге. Такая картина встречается при гемолитических и В₁₂-

дефицитной анемиях, при неэффективном эритропозе любой природы, т. е. гемолизе эритрокариоцитов. В отличие от других форм острого лейкоза, при остром эритромиелозе дифференцировка опухолевых клеток красного ряда происходит нередко до стадии полихроматофильных и оксифильных эритрокариоцитов или до эритроцитов. Однако наряду с клетками красного ряда, иногда атипичными, многоядерными, в костном мозге, а позже и в крови появляются бластные элементы, которые и позволяют поставить диагноз.

По морфологии бластных клеток эритромиелоз подразделяется на два варианта: собственно эритромиелоз, при котором субстрат опухоли представлен эритрокариоцитами и недифференцируемыми бластами, и эритролейкоз, при котором наряду с эритрокариоцитами много и миелобластов [Дегтярева М.М., 1974]. При первом варианте происходит постепенный переход к преобладанию недифференцируемых бластов, при втором - к миелобластозу. Клинические различия между этими вариантами неотчетливы.

Если наблюдается выраженное угнетение нормальных ростков кроветворения (лейко-, тромбоцитопения, анемия, содержание ретикулоцитов не более 2-3 %), а в костном мозге - обилие уродливых эритрокариоцитов и много атипичных - недифференцированных бластных клеток или миелобластов, то диагноз острого эритромиелоза становится очевидным. Если морфологически клетки красного ряда мало отличаются от нормальных, а недифференцированных бластных клеток немного (до 10%), при том, что в периферической крови нет отчетливых признаков угнетения нормальных ростков кроветворения, то с определенностью диагностировать острый эритромиелоз не удастся. В таком случае обнаружение в трепанате пролифератов недифференцированных клеток при хромосомном анализе клона свидетельствует в пользу этого диагноза. При остром эритромиелозе (как и любом другом остром лейкозе) в динамике обязательно должен нарастать процент бластных клеток в костном мозге. До установления точного диагноза никакое цитостатическое лечение проводить нельзя; малые дозы преднизолона, симптоматическая терапия - переливание препаратов эритроцитов при глубокой анемии, например, не затрудняют дальнейшую диагностику.

Иммунологически клетки характеризуются следующими маркерами: CD13, 33, 41, 71, гликофорин А. С наибольшей частотой при этой форме острого лейкоза встречаются аномалии, связанные с 5-й и 7-й хромосомами (моносомия 5 и (или) 7, делеция 5q или 7q).

Исследование хромосомного аппарата клеток костного мозга может оказать существенную помощь в диагностике эритромиелоза: при обнаружении в клетках красного ряда анеуплоидного клона диагноз можно считать доказанным. Анеуплоидия (чаще гиподиплоидные наборы хромосом) при этом заболевании встречается приблизительно в 40% случаев. Беспорядочная (без образования клонов) анеуплоидия в красном ростке не является признаком опухолевого роста, так как этот феномен встречается и при гемолитических анемиях, и при пернициозной анемии. Острый эритромиелоз отличается изменениями в хромосомном наборе лейкозных клеток: здесь чаще, чем при других формах лейкозов, встречаются разнообразные структурные изменения хромосом (кольцевые хромосомы, дицентрики).

Цитохимической особенностью эритромиелоза служит PAS-положительная субстанция в цитоплазме ядросодержащих клеток красного ряда, в частности эритроцитов [Quaglino, Hayhoe, 1960], хотя этот признак не специфичен для лейкозного процесса. В эритрокариоцитах может быть обнаружена и α НЭ, обычная для клеток моноцитарного ряда [Hayhoe et al., 1980, Kass, 1982]. Встречаются и острый эритромегакариобластный лейкоз [Di Guglielmo, 1917] и острый эритромонобластный лейкоз [Broun, 1969; собственные наблюдения].

Морфология эритроцитов при эритромиелозе бывает различной. Обычно, как и при других острых лейкозах, несмотря на анемию, нет анизоцитоза, пойкилоцитоза. Если анизоцитоз и есть, то он не бывает столь резким, как при B_{12} -дефицитной анемии, нет также характерной для нее полисегментации нейтрофилов, но гигантизм и уродливость элементов гранулоцитарного ряда возможны. Нередко наблюдается гиперхромия эритроцитов с увеличением цветового показателя до 1,2-1,3.

Если сам острый эритромиелоз осложняется повышенным гемолизом, то установление именно этой формы острого лейкоза возможно при наличии PAS-положительной субстанции в клетках красного ряда и бластах, анеуплоидного клона (или клонов) в клетках красного ряда. Без этих признаков уточнить форму трудно. Какой-либо типичной органной патологии при остром эритромиелозе нет. Лимфатические узлы обычно не увеличены; печень и селезенка, как и при других формах острого лейкоза, могут увеличиваться, но чаще остаются нормальных размеров.

Динамика гематологических показателей может иметь два направления: в одном случае нарастает число бластных клеток как в костном мозге, так и в периферической крови, вплоть до

почти полного вытеснения патологического красного ростка, в других - до самого конца в костном мозге сохраняется высокое содержание элементов красного ряда при умеренном нарастании процента бластных клеток. Однако и в том, и в другом случае закономерно усиливаются гранулоцитопения, тромбоцитопения и анемия. Как и при других формах острого лейкоза, недостаточность кроветворения становится причиной смерти больных. Несмотря на сравнительную редкость полных ремиссий, острый эритромиелоз не отличается быстрым прогрессированием. Средняя продолжительность жизни больных около 6 месяцев, а 20% больных живут около 18 месяцев. Считается, что данному варианту свойственен неблагоприятный прогноз. Однако, возможно, что худшие результаты терапии связаны в большей степени с пожилым возрастом пациентов, менее агрессивной терапией, худшей переносимостью лечения пожилыми больными и тем, что большой процент в группе острого эритромиелоза составляют вторичные лейкозы. Обычно не удается замедлить процесс, получить отчетливое улучшение в составе крови на фоне цитостатической терапии и переливаний эритроцитарной массы.

Острый мегакариобластный лейкоз

К весьма редким формам относится и острый мегакариобластный лейкоз, он чаще диагностируется у детей первого года жизни, составляет 1-3% от всех случаев. Отдельные случаи описаны в литературе [Берман М.А. и др., 1974; Стрелева Т.Н. и др., 1977; Chan et al., 1971]. Для этой формы характерны миелофиброз и остеосклероз, поэтому пунктат костного мозга получить довольно сложно. Могут обнаруживаться литические очаги в костях.

Бластные клетки морфологически могут напоминать таковые при острых лимфобластных лейкозах или острых миелобластных. Бластоз может быть небольшим, но определяется увеличенное количество мегакариобластов: элементы с бластным, но грубоватым и гиперхромным ядром, узким ободком цитоплазмы, имеющей нередко неровный контур из-за своеобразных отростков. При изучении мегакариобластов методом электронной микроскопии с использованием цитохимической окраски на миелопероксидазу в них было обнаружено специфическое расположение фермента [Breton-Gorius et al., 1978]. Точный диагноз может быть установлен лишь при выполнении иммунофенотипирования и обнаружения соответственно характерных маркеров - гликопротеина Ib и CD41 (гликопротеин IIb/IIIa).

В крови и костном мозге при этой форме часто встречаются уродливые мегакариоциты, ос-

колки ядер мегакариоцитов и скопления тромбоцитов (рис. 52). В периферической крови чаще всего описывается панцитопения, тем не менее тромбоцитарный росток бывает сохранен у многих больных - у 30% пациентов уровень тромбоцитов превышает $100 \times 10^9/\text{л}$. У детей моложе одного года этот вариант лейкоза характеризуется гигантской гепатоспленомегалией и нередким определением транслокации $t(1;22)(p13;q13)$. В этой транслокации задействованы N-ras онкоген и ген PDGF- β . К другим цитогенетическим аномалиям, встречающимся при остром мегакариобластном лейкозе, относятся трисомия 8, трисомия 10, трисомия 21, $t(1;4)$, $t(3;3)$, $inv(3q)$, патология 5-й и 7-й хромосом.

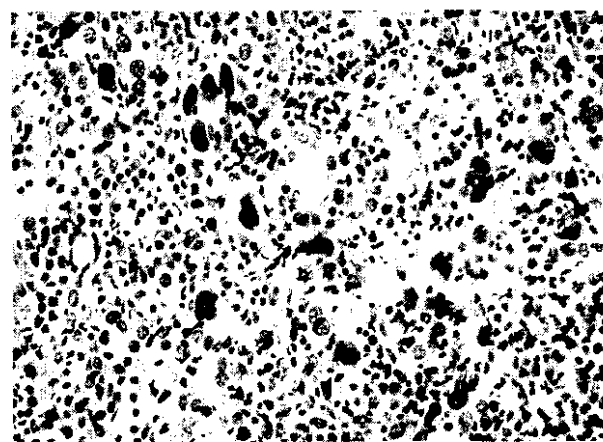


Рис. 52. Трепанат больного острым мегакариобластным лейкозом. В поле зрения видны многочисленные гигантские многоядерные клетки - мегакариоциты (Об. x40).

Клиническая картина острого мегакариобластного лейкоза большей частью лишена специфических особенностей. В исходе болезни наблюдаются подавление нормальных ростков миелопоэза или саркомный рост и другие признаки терминальной стадии. Однако в ряде случаев острый мегакариобластный лейкоз может иметь клинико-гематологическую картину острого малопроцентного лейкоза, а по гистологии костного мозга - картину миелофиброза. Такая форма мегакариобластного лейкоза характеризуется невысоким процентом бластных клеток в костном мозге и крови, полиморфноклеточным составом костного мозга, нередко выраженным мегакариоцитозом в костном мозге и диффузным миелофиброзом, иногда и остеомиелосклерозом. У ряда больных отмечается неинфекционного происхождения фебрильная температура, увеличение селезенки.

В таких случаях только при изучении бластных клеток методом электронной микроскопии удалось обнаружить миелопероксидазу, локали-

зованную по типу, специфическому для тромбоцитов, что позволило отнести этот острый лейкоз к острому мегакариобластному [Sulton et al., 1981, Bain et al., 1981, Kass 1982]. Можно думать, что форма лейкоза, подобного описанному, называемая отдельными авторами острым миелофиброзом, действительно есть острый мегакариобластный лейкоз, так как оказалось, что и в норме потомство мегакариобластов - мегакариоциты и тромбоциты, секретируя ростковый фактор, индуцируют пролиферацию фибробластов [Antoniades et al., 1979, Castro-Malaspina et al., 1981], продуцирующих коллаген и ретикулин; это свойство, по-видимому, сохраняют и лейкозные клетки мегакариоцитарного ряда. Вместе с тем, миелофиброз, как уже отмечалось, может наблюдаться при любой форме острого лейкоза и гемобластоза вообще.

Данную форму острого лейкоза трудно отличить от сублейкемического миелоза с цитопенией и ранним появлением бластных клеток в костном мозге и крови. Миелофиброз и невысокое содержание бластов, медленно нарастающих, следовательно, редко делящихся, затрудняют цитостатическую терапию, необходимую из-за глубокой цитопении. В большинстве случаев цитостатическая терапия не дает хорошего эффекта и даже усугубляет цитопению. Описаны кратковременные эффекты терапии цитозаром и рубомицином, назначаемыми по схеме «7+3» в половинных дозах. В наблюдаемом нами случае в течение полугода удавалось контролировать процесс преднизолоном, а затем винкристином и преднизолоном в сочетании с небольшими дозами рубомицина. Частые гемотрансфузии могут осложниться гемосидерозом, который сам по себе усугубляет цитопению.

Наиболее перспективным и эффективным методом терапии острого мегакариобластного лейкоза с выраженным миелофиброзом является трансплантация костного мозга [Smith et al., 1982, Mehta et al., 1983]. Прогноз - крайне неблагоприятный.

Острый малопроцентный лейкоз

Острый малопроцентный лейкоз, впервые описанный как «Smoulderring leukemia» - тлеющий лейкоз Knopse Gregory в 1971 г., позже стал чаще называться «малопроцентным», «олигобластным» [Лорие Ю.И. и соавт., 1974, Israel et al., 1974]. Это название сначала было присвоено острому лейкозу, как правило миелобластной природы, встречающемуся у лиц старше 60-70 лет, протекающему с невысоким (менее 10-20%) бластозом в костном мозге и с таким же низким (нередко чуть выше, чем в костном мозге) содержанием бластных клеток в крови, в большинстве случаев с упорной нормохромной ане-

мией без ретикулоцитоза или с панцитопенией и с длительным (1-3 года) отсутствием прогрессии лейкоза. Позже острым малопроцентным лейкозом стали называть любой острый лейкоз с невысоким независимо от лечения и медленно нарастающим бластозом в крови и в костном мозге, даже у молодых людей.

По FAB-классификации малопроцентный острый лейкоз включен в число процессов, относимых к миелопозитической дисплазии (рефрактерная анемия с бластозом менее 30%), хотя авторы FAB полагают, что миелопозитическая дисплазия - еще не лейкоз, а только способна трансформироваться в него. Между тем, острый малопроцентный лейкоз, с каким бы малым бластозом и как бы долго он ни протекал, является острым лейкозом.

Опухолевая прогрессия приводит эту форму лейкоза к тотальному бластозу с плохим ответом на цитостатическую терапию, особенно если пытаться с самого начала лечить его цитостатиками. Редкие ремиссии, как правило, оказываются кратковременными.

Нередко трудно отличить острый малопроцентный лейкоз от сублейкемического миелоза с невысоким лейкоцитозом или даже с лейкопенией (фиброз, остеомиелосклероз могут быть или не быть как при остром лейкозе, так и при сублейкемическом миелозе). В дифференцировке этих разных форм лейкоза помогает культура костного мозга: агаровая, характеризующая гранулоцитарно-моноцитарные клетки-предшественницы, и монослойная культура фибробластов костного мозга. Как показали Б.В. Афанасьев (1980), Б.В. Афанасьев с соавт. (1982), при остром малопроцентном лейкозе гранулоцитарно-моноцитарные клетки-предшественницы в агаре дают малое число колоний, т. е. низкую эффективность колониеобразования, тогда как при сублейкемическом миелозе рост агаровых колоний имеет гиперпластический тип - эффективность колониеобразования высокая.

Фибробласты костного мозга [Домрачева Е.В. с соавт., 1981] при остром малопроцентном лейкозе имеют высокую эффективность колониеобразования в культуре, а при сублейкемическом миелозе, как правило, вообще не удается обнаружить роста колоний фибробластов.

О. Milner с соавт. (1977) показали, что острый малопроцентный лейкоз (они пользовались термином «рефрактерная анемия с бластозом») можно отличить от рефрактерной анемии без бластоза, т. е. лейкоз от не лейкоза с помощью метода агаровых колоний: в отличие от малопроцентного острого лейкоза при рефрактерной анемии без бластоза наблюдается высокая эффективность роста гранулоцитарно-макрофагальных колоний в культуре.

Последующие наблюдения показали, что, по-видимому, сам по себе малопроцентный лейкоз хорошо клинически и морфологически очерчен. Его лимфобластные варианты нам не встречались, а возрастные границы нуждаются в расширении: он бывает и у молодых (редко), и у детей (очень редко). Из-за объединения малопроцентного острого лейкоза с другими формами (по FAB-классификации) его в последнее время перестали описывать и изучать.

В терапевтическом плане эта форма лейкоза либо объект для аллогенной трансплантации костного мозга, либо для сдерживающей терапии малыми дозами цитозара. Последний вариант терапии позволяет оттянуть наступление выраженного бластоза, всей клинической картины развернутого острого лейкоза на несколько месяцев, а иногда и лет. Полных ремиссий мы не наблюдали. И до, и во время цитостатической терапии проводится заместительное лечение компонентами крови по общим показаниям - тромбоцитная масса, эритроцитная масса. В последние годы иногда на первых порах, когда бластоз очень невелик и составляет проценты в крови и костном мозге, делаются попытки применять циклоsporин. Результаты обнадеживающие, но материал мал для обобщения.

Вторичные острые нелимфобластные лейкозы

К этой группе относятся индуцированные цитостатиками, радиацией и химическими мутагенами лейкозы, возникшие у больных другими формами гемобластозов, лимфогранулематозом, у лиц с эпителиальными опухолями и с неопухолевыми заболеваниями. По данным Rowley (1983), частота вторичных лейкозов возрастает у людей старше 50 лет, но они могут быть и у молодых людей. В среднем вторичный ОНЛЛ возникает через 2-3 года после химиотерапевтического воздействия. У большинства пациентов находят характерные цитогенетические маркеры: моносомия 5 или 7, del 5q- и 7q-. В последние годы определена взаимосвязь между предшествующей цитостатической терапией эпиподфилотоксинами или алкилирующими препаратами и хромосомными aberrациями, связанными с сегментом q23 11-й хромосомы.

Это всегда острые нелимфобластные лейкозы, чаще миелобластные, миеломонобластные острые лейкозы и эритромиелоз. Они как правило сопровождаются глубокой цитопенией, гипертермией, но без органических изменений. Пункция костного мозга может быть затруднена выраженным фиброзом, связанным с лучевой терапией или с самим острым лейкозом. Характерны кариологические особенности этих форм: отсутствие 5-й, 7-й или обеих этих хромосом

или их короткого плеча, трисомия 8-й хромосомы. Нередко появление клона с такими кариологическими признаками предшествует обнаружению бластных клеток в костном мозге. В крови бластные клетки могут быть единичными.

Кариологическая картина может эволюционировать: например, клетки, в которых отсутствует 5-я хромосома, сменяются клетками, у которых нет 5-й и 7-й хромосом, - это типичный пример повышенной мутабельности и появления субклонов новых атипичных клеток в процессе опухолевой прогрессии.

Вторичные лейкозы, как правило, не дают ремиссий или ремиссии бывают очень короткими. В целом процесс занимает менее полугода.

Нелимфобластные острые лейкозы у пожилых больных

Прежде всего необходимо остановиться на определенных свойствах острых нелимфобластных лейкозов у людей старше 60 лет. Предполагается, что опухолевая трансформация кроветворной клетки происходит на самых ранних этапах миелоидной дифференцировки, на что указывает и значительно более частое обнаружение экспрессии антигена CD34. Это, как известно, относится к неблагоприятным факторам прогноза. У пожилых людей практически в 3 раза чаще определяется предшествующая миелодисплазия, что однозначно связывают с плохим прогнозом заболевания. Существенно выше и процент обнаружения неблагоприятных хромосомных aberrаций (особенно, -5, -7, 5q-, 7q-, +8), при том, что редко встречаются формы заболевания с благоприятным кариотипом. Эти биологические особенности острых миелоидных лейкозов у пожилых пациентов определяют меньшую эффективность химиотерапии у них.

Помимо особенностей самого лейкоэмического процесса, у пожилых больных следует учитывать и те неизбежные функциональные изменения в организме, которые связаны со старением и которые обуславливают худшую переносимость лечения и, как следствие этого, его меньшую эффективность, поскольку приходится уменьшать дозы, увеличивать временные интервалы. Существенную роль играют изменения со стороны сердечно-сосудистой системы, которые выражаются в дистрофии миокарда вследствие атеросклеротического процесса. А в терапии ОМЛ базисными препаратами являются антрациклины (даунорубицин, идарубицин), обладающие кардиотоксичным действием.

Помимо этого, в процессе старения отмечается прогрессирующее снижение функции почек. Величина эффективного почечного кровотока у практически здоровых старых людей снижается более чем в 2 раза и составляет в сред-

нем 42% от его величины у людей молодого возраста. К глубокой старости (80 лет) более, чем в 3 раза сокращается азотовыделительная функция почек [12]. В связи с этим, может меняться клиренс препаратов, за счет чего может увеличиваться их токсическое воздействие. Кроме того, многие лекарственные препараты, необходимые в программах химиотерапии и вспомогательного лечения (цитостатические препараты, антибактериальные, противогрибковые, противовирусные средства), характеризуются отчетливой нефротоксичностью. Главной проблемой при проведении вспомогательной терапии становится сочетанная токсичность - применение многих препаратов, обладающих повреждающим действием на ткань почек.

Обсуждая метаболизм и клиренс цитостатических и других лекарственных средств у пожилых пациентов, следует упомянуть о структурных и функциональных изменениях печени, в основе которых лежит процесс возрастной атрофии клеток паренхимы. Значительно изменяется кровоснабжение печени, снижается ее белковосинтетическая и антитоксическая функции [1, 12].

Возрастные изменения желудочно-кишечного тракта характеризуются нарушением эвакуаторной функции желудка, изменениями кровоснабжения кишечника, уменьшением всасывания, что также может влиять на эффективность терапии лейкоза у пожилых больных. Таким образом, изменения в органах при старении, несомненно, отражаются на эффективности терапии, обуславливая большую токсичность лечения для пожилых больных и худшую его переносимость.

При оценке эффективности терапии ОМЛ в «экспериментальных» группах само по себе исключение из когорты анализируемых больных пациентов старше 70 лет увеличивает процент достигших ремиссии на 15-20% [19, 138]. Лица пожилого возраста реже включаются в рамки каких-либо исследований, которые предполагают жесткое выполнение цитостатического протокола и терапии выхаживания.

Острые нелимфобластные лейкозы и беременность

Развитие острого лейкоза в период беременности - событие довольно редкое, встречающееся менее, чем в 1 случае на 75 000 беременностей. Тем не менее, это исключительно острая и во многом нерешенная проблема. В момент установления диагноза острого лейкоза у беременной женщины возникает ряд не только медицинских, но и этических, и социальных вопросов [75].

ОНЛЛ в большинстве случаев диагностируется во втором и третьем триместре, только 14% случаев лейкоза диагностированы у женщин в первом триместре беременности. Передача острого лейкоза от матери плоду исключительно редкое явление, практически невозможное. Тератогенные эффекты химиотерапии могут возникать лишь в первый триместр. В этой ситуации до начала химиотерапии рекомендуется прерывание беременности. После формирования основных жизненно важных органов плода и завершения формирования плаценты (после 12 недель беременности, во втором триместре), когда возникает естественный биологический барьер для лекарственных препаратов между матерью и плодом, проведение химиотерапии в полном объеме не только возможно, но и необходимо. Химиотерапия осуществляется по стандартным программам лечения ОНЛЛ взрослых без снижения дозировок цитостатических препаратов. Не рекомендуется использовать в индукции/консолидации лишь высокие дозы цитарабина. Результаты лечения беременных по проценту достижения ремиссий и их длительности не отличаются от стандартных показателей.

Решение о сохранении беременности на поздних сроках зависит как от медицинского персонала, принимающего на себя ответственность за ведение беременности во время индукционной терапии со всеми вытекающими из этого возможными осложнениями, так и от беременной и ее родных. Решение последних должно быть непременно оформлено письменно как информированное согласие. С медицинской точки зрения, необходимости досрочного прерывания беременности на поздних сроках (16-28 недель, когда плод нежизнеспособен) нет, более того, риск от этой процедуры (малое кесарево сечение, искусственные роды) превышает риск проведения химиотерапии: вероятность массивного кровотечения, реальный очаг инфекции, отсрочка начала индукционного курса, также этические моменты - гибель плода. Вопрос о родоразрешении до начала курса химиотерапии встает чаще всего в экстренных ситуациях и лишь на поздних сроках (30-38 недель), когда уже существует реальная угроза гибели плода (отслойка плаценты, маточное кровотечение, признаки асфиксии у плода, его внутриутробной гибели и т.д.). Также следует иметь в виду, что после родоразрешения женщине необходим определенный период времени (желательно не меньше 1 месяца) для реабилитации, поскольку проведение химиотерапии в раннем послеродовом периоде сопровождается развитием очень тяжелых токсических и инфекционных осложнений. Из-за этого же с самого

начала индукционной терапии желательно рассчитывать на достижение полной ремиссии до родов, чтобы после родов у пациентки был определенный запас времени.

Принципы терапии острых миелоидных лейкозов

Химиотерапия ОМЛ имеет недолгую историю - около 50 лет, и ее успехи связаны в основном с появлением эффективных цитостатических препаратов, совершенствованием терапии компонентами крови и разработкой новых принципов антибиотической терапии. В середине 60-х годов прошел клинические испытания новый цитостатический препарат - цитозин-арабинозид, впервые синтезированный в 1959 г. E. R. Walwick [153]. С этих пор цитарабин является важнейшим средством лечения острых миелоидных лейкозов. Использование одного цитарабина в дозе 10-30 мг/м² позволяло достигать полной ремиссии у 10-15% больных ОМЛ. Применение более высоких его дозировок (100-200 мг/м²) увеличило вероятность достижения ремиссии до 30% [25]. Очень скоро после введения цитозин-арабинозида в широкую практику Американская Группа Б по изучению рака и острых лейкозов (CALGB) в рандомизированном исследовании продемонстрировала лучшие результаты при использовании цитарабина в сочетании с 6-тиогуанином, чем только цитозин-арабинозида [41].

Даунорубин был добавлен к курсу цитарабин+6-тиогуанин в начале 70-х годов, и этот курс получил общепринятое название DAT. Указанное сочетание оказалось эффективнее предыдущего курса, что доказано в двух рандомизированных исследованиях: процент ремиссий колебался от 50 до 82, в среднем составлял 63 [106, 107]. Дальнейшие исследования по сравнению режимов индукционной терапии DAT и «7+3» (где исключался 6-тиогуанин) показали, что эти программы почти идентичны [125]. Средний процент полных ремиссий при применении «7+3» составил 64 [25]. Последующие усовершенствования двух программ химиотерапии, ставших к концу 70-х годов основными в лечении ОМЛ, основаны на серии клинических исследований по оптимизации доз препаратов, кратности и способов введения, по выбору антрациклинов (даунорубин или доксорубин). Было доказано, что «7+3» эффективнее «5+2», но удлинение сроков введения цитозара до 10 дней не улучшало результатов [25, 44, 125, 133]. Непрерывное введение цитарабина оказалось лишь немного более успешным, чем двукратное болюсное введение [23]. Доза цитарабина 100 мг/м² или 200 мг/м² в программе «7+3» обладала одинаковой эффективностью [25, 106]. Сравне-

ние результатов по применению даунорубина или доксорубина выявило преимущества программы с даунорубином, поскольку адриабластин обладал значительно большим токсическим воздействием на слизистую желудочно-кишечного тракта, за счет чего увеличивался процент ранней летальности [159].

Таким образом, эмпирическим путем были выработаны оптимальные курсы химиотерапии, которые в любом гематологическом центре при использовании их в должных дозировках позволяют получить стандартные результаты. 70-е - начало 80-х могут считаться периодом становления и успешного развития химиотерапии острых миелоидных лейкозов, так как впервые у большинства пациентов удавалось достигать полной ремиссии, и появился довольно весомый процент больных, которые переживали 5 лет без рецидива заболевания, что обычно расценивается как онкологическое выздоровление [5, 7, 9, 14, 25].

В среднем для всех больных острыми миелоидными лейкозами достижение полной ремиссии составляет 60-70%, 10-15% больных погибает в период индукции ремиссии и у 15-20% определяются резистентные формы лейкозов. Пять лет без рецидива переживает около 25-30% больных, у которых достигнута ремиссия [7, 9, 14, 25, 32, 44, 65, 106].

В эти же годы создана идеология проведения многоцентровых рандомизированных исследований для объективной оценки различных подходов к лечению. Унифицированная терапия позволила выделить группы больных ОМЛ с неблагоприятными факторами прогноза в отношении длительной выживаемости. Исследования, направленные на улучшение результатов терапии острых миелоидных лейкозов, проводились и проводятся на всех этапах противоопухолевого лечения: индукции, постремиссионной терапии - консолидации и поддержания. Основная тенденция современных протоколов - это различные варианты интенсификации химиотерапии.

Введение ряда цитостатических препаратов, таких, как L-аспарагиназа, винкристин, преднизолон, 5-азациитидин, этопозид в индукционные программы не изменяет процент полученных ремиссий и не способствует увеличению продолжительности жизни [25, 34, 106]. Использование больших доз цитарабина в индукции несколько увеличило процент достигаемых ремиссий, но не во всех исследованиях увеличило продолжительность ремиссии и жизни, более того рядом исследователей отмечена очень высокая токсичность такой индукционной терапии [22, 25]. По данным других исследователей, высокие дозы цитарабина в индукции, напротив, не

увеличили статистически процент достигаемых ремиссий, но существенно увеличили продолжительность полной ремиссии (45% и 12 месяцев соответственно) и безрецидивную выживаемость (49% и 24 месяцев), тем более, что с годами накопился опыт по выхаживанию таких пациентов и уменьшился процент ранней летальности [14, 26]. Использование высоких доз цитарабина имеет очень веские основания, так как практически все лейкемические клетки при ОНЛЛ чувствительны к его воздействиям, но в различных концентрациях. Высокие дозы цитозин-арабинозида позволяют преодолеть некоторые причины резистентности к стандартным дозам (25, 69):

- большее количество препарата попадает в клетку и преобразуется в активную форму - цитозин-арабинозид трифосфат - с помощью фермента цитидинкиназы;
- большие дозы цитарабина позволяют преодолеть значительную активность цитидиндеаминазы - фермента, ответственного за инактивацию препарата.

Практически одинаковые результаты получены при использовании вместо даунорубина и доксорубина цитостатических препаратов, похожих по механизму действия на антрациклины (амсидил, митоксантрон (новантрон) и новых антрациклиновых антибиотиков (идарубицин). Амсидил в сочетании с цитозаром в стандартных дозах дает возможность добиться ремиссии у 43-47% больных, а в средних и высоких - у 58-60% [16, 90]. Таким образом, данный препарат не имеет преимуществ перед обычно применяемыми антрациклинами. Несколько лучшие результаты получены при использовании в индукции новантрона и идарубина. Для новантрона в сочетании с цитарабином в стандартных дозах в двух рандомизированных исследованиях по сравнению с даунорубином выявлены преимущества по частоте достигаемых ремиссий: 66,7 и 71,4% при использовании новантрона и 53,1 и 45% при использовании даунорубина [17]. Но средняя продолжительность ремиссии при применении новантрона и медиана общей выживаемости существенно не отличались от таковых при использовании даунорубина: 214 и 193 дня, 204 и 203 дня соответственно.

Программа «7+3» с включением идарубина также обладает, по данным нескольких центров, преимуществом по сравнению с даунорубином: ремиссии составляют 80% при лечении идарубином и 58% - даунорубином, у 75% ремиссия достигается после одного индукционного курса с идарубином и у 49% - с даунорубином, выживаемость в течение 2,5 лет выше (50 против 17%). Основным пунктом критики

опубликованных исследований по применению идарубина является неадекватность сравняемой дозы даунорубина - 45 мг/м². Сравнения идарубина с даунорубином в дозе 60 мг/м² до настоящего времени не осуществлены.

Несомненно, традиционные программы «7+3» или DAT до сих пор занимают основное место в индукционных протоколах. В Западной Германии на основе этих двух протоколов создана оригинальная программа TAD-9, основанная на кинетических исследованиях бластных клеток в ходе лечения цитостатическими препаратами. Было доказано, что непрерывная в течение 48 ч инфузия цитарабина увеличивает число бластных клеток в фазе синтеза, и поэтому введение вслед за этим цитозин-арабинозида по обычной схеме, рубомицина и тиогуанина увеличивает их цитостатический эффект [30]. Тем не менее, процент ремиссий при использовании этой программы (64%) и безрецидивная выживаемость (25% в течение 7 лет) существенно не отличаются от средних показателей, получаемых в других центрах [30, 32]. Этой же группой по изучению ОМЛ в Германии с 1985 г. применяется протокол двойной индукции, где второй индукционный курс каждому пациенту проводится строго на 21-й день от начала терапии независимо от глубины цитопении и результатов первого курса [31, 32]. Идея использования этой программы заключается в том, что второй курс назначается в период начинающейся регенерации костного мозга после мощного цитостатического воздействия, в тот момент, когда концентрация эндогенного фактора роста максимальна и есть реальная возможность выведения в пролиферацию покоящихся лейкозных клеток. Процент ремиссий на такой программе - 69-75 и безрецидивная выживаемость в течение 5 лет - 34% [32]. Более того, программа двойной индукции (двойной TAD-9) была интенсифицирована, и второй курс TAD-9 заменен на программу HAM (высокие дозы цитарабина плюс митоксантрон). Применение высоких доз цитарабина в сочетании с новантроном у больных с рефрактерными формами ОМЛ доказало, что указанная программа достоверно увеличивает процент достижения полных ремиссий и их продолжительности [83]. Таким образом, принцип ранней интенсификации, по данным ряда больших исследований, имеет достаточные преимущества перед стандартным индукционным подходом. Он позволяет уменьшить число больных с резистентными формами ОМЛ за счет увеличения мощности цитостатического воздействия. В большинстве случаев интенсификация достигается за счет введения высоких доз цитарабина, когда применяются дозы препарата, превышающие 1 г/м² 2 раза в су-

тки. Как уже отмечалось, анализ влияния дозы и интенсивности дозового режима выявил, что индукционные дозы и цитарабина, и даунорубицина достоверно влияют на длительность ремиссии при ОМЛ [14, 25, 46]. Применение высоких доз цитарабина в индукции или в консолидации стало одним из самых прогрессивных методов терапии ОМЛ [35].

Тем не менее, есть обратная сторона этой проблемы. Во-первых, курсы интенсивной индукционной терапии переносятся значительно хуже, чем, например, такие же курсы, выполняемые в период консолидации. Высокая токсичность индукции может привести к тому, что интенсивная постиндукционная терапия откладывается на более позднее время и соответственно ее эффект становится менее значительным. Известен факт, что применение даже стандартной консолидации после высокодозной индукционной терапии приводит к достоверно большей по глубине и длительности миелосупрессии, чем соответственно интенсивная консолидация после стандартной индукционной программы [25]. Именно эти результаты заставляют с большой осторожностью подходить к комбинированию интенсивной индукции и консолидации. Поскольку интенсивные программы значительно легче переносятся и менее опасны в ремиссии, предполагается, что более эффективно и реально выполнение 3-4 интенсивных консолидирующих программ, нежели одной агрессивной индукции с последующими стандартными курсами постремиссионной терапии. Во-вторых, интенсификация индукционных протоколов привела к улучшению результатов лишь у пациентов моложе 60 лет. В пожилом возрасте применение в индукции высоких доз цитарабина не привело к улучшению результатов, поэтому половине больных ОМЛ (пациенты старше 60 лет) не рекомендуется интенсификация индукции.

Завершая раздел по принципам индукционной терапии, хотелось бы подчеркнуть, что, несмотря на то, по какой программе будет осуществляться индукция ремиссии, необходимо следовать некоторым общим правилам:

- 1) больной должен быть компенсирован по инфекционным осложнениям и геморрагическому синдрому, и у него должен быть хороший венозный доступ;
- 2) с целью профилактики блокады почечных канальцев солями мочевой кислоты на фоне массивного распада опухоли проводится массивная гидратация (3 л/м^2) и применяется аллопуринол (от 600 мг/сутки);
- 3) у больных с гиперлейкоцитозами (особенно выше $100 \times 10^9/\text{л}$) необходимо проведение предфазы - предваряющего основное лечение, рассчитанного на снижение числа лей-

коцитов периферической крови до $50 \times 10^9/\text{л}$ и ниже. Это позволяет уменьшить раннюю летальность больных вследствие развития у них синдрома массивного лизиса опухоли (легочный дистресс-синдром, блокада функции почек). Обычно при ОНЛЛ в качестве предфазы выступает гидроксимочевина в дозе 60-100 мг/кг в день также на фоне гидратационной терапии и приема аллопуринола. Меньшие дозы гидроксимочевины неэффективны. Возможно проведение лейкафереза. Данный подход принципиально по эффектам не отличается от перечисленных выше, однако если лейкоцитоз превышает $150-200 \times 10^9/\text{л}$ и есть симптоматика, связанная с лейкостазами, он может быть полезен в плане уменьшения объема циркулирующих опухолевых клеток. При этом прием гидроксимочевины не отменяется. Все больные с гиперлейкоцитозом (особенно выше $100 \times 10^9/\text{л}$) требуют профилактики нейрорлейкемии.

Необходимость консолидации, даже самой простой, была со всей очевидностью доказана в начале 80-х годов: выживаемость больных, которым был проведен хотя бы один консолидирующий курс, фактически вдвое выше, чем у больных, которым консолидация не проводилась [30]. В настоящее время существует два подхода к данному этапу противоопухолевой терапии: курс консолидации проводится аналогично индукционному или осуществляется интенсивная консолидация с использованием высоких доз цитарабина, митоксантрона и других новых цитостатических препаратов. Считается доказанным факт, что интенсивная консолидация может быть альтернативой обычной консолидирующей терапии с последующим длительным поддержанием [14, 32, 126]. Например, исследование итальянских авторов по изучению роли поддерживающей терапии после интенсивной консолидации четырьмя курсами DAT (с увеличением дозы цитозин-арабинозида в каждом последующем курсе) дает основания полагать, что ни обычная поддерживающая терапия (цитарабин+6-тиогуанин), ни интенсивная постконсолидационная терапия шестью курсами цитозин-арабинозида в полных стандартных дозах в сочетании с вепезидом, 6-тиогуанином, даунорубицином не увеличивают продолжительность жизни больных, у которых достигнута ремиссия и проведено четыре курса DAT [118]. Практически те же выводы об отсутствии существенного влияния поддерживающей терапии после интенсивной индукции отмечены другими авторами [125, 126, 149]. Интенсификация консолидации в большинстве случаев осуществляется высокими дозами цитарабина. В настоящее время доказан избирательный эффект высоких

доз цитарабина, используемого в консолидации, при различных вариантах ОМЛ. Так, например, выживаемость больных ОМЛ, у которых обнаружена транслокация 8;21 или инверсия 16-й хромосомы, увеличивается практически вдвое (70% в течение 5 лет) по сравнению с результатами, получаемыми при использовании стандартных дозировок цитарабина. Имеет значение применение нескольких (более трех), а не одного курса высокодозного цитарабина [27, 28].

Целесообразность длительной поддерживающей терапии всегда подвергалась сомнению, и данные различных центров в отношении ее довольно противоречивы. При оценке эффективности поддерживающего лечения нужно иметь в виду, какая консолидация была проведена - интенсивная или обычная (аналогичная индукции). Если консолидация соответствует индукционной программе, то доказано, что поддерживающая терапия вдвое увеличивает продолжительность ремиссии и существенно безрецидивную выживаемость (24-25% живут 4-5 лет на поддерживающем лечении, 10% без нее) [32, 42, 55]. При сравнении результатов 10 больших многоцентровых исследований также очевидно преимущество тех программ, в которых используется поддерживающая терапия [32]. Но если обсуждается интенсивная консолидационная тактика, то, как уже подчеркивалось, дальнейшая поддерживающая терапия преимуществ не дает. Поддерживающая терапия, и особенно ее продолжительность, имеют принципиальное значение для выживаемости пожилых пациентов с ОМЛ, поскольку результаты по ее использованию оказались существенно лучше тех, которые получены при проведении очень интенсивного, но короткого лечения.

Таким образом, основным принципом современной химиотерапии является интенсификация протоколов индукции/консолидации, что в большинстве исследований достигается за счет применения высоких доз цитарабина (монотерапия или в сочетании с отличными от антрациклинов препаратами - митоксантроном, этопозидом), использования принципа двойной индукции. С другой стороны, как уже отмечалось, любая интенсификация лечения связана с усугублением токсичности. Например, в исследовании CALGB, предполагавшем применение четырех курсов высоких доз цитарабина в консолидации после достижения ремиссии на стандартной программе «7+3», лишь у 56% больных удалось выполнить всю запланированную протоколом программу [107], то есть интенсификация протоколов должна быть настолько разумной и взвешенной, чтобы запланированное лечение могло быть проведено большинству пациентов.

Лечение острого промиелоцитарного лейкоза

До недавнего времени стандартная химиотерапия ОМЛ, включающая в себя даунорубицин и цитозин-арабинозид (Ara-C), позволяла достигать полной ремиссии у 65-70% больных. В период индукции, как ни при каком другом варианте ОМЛ, отмечались тяжелейшие геморрагические осложнения, связанные с нарастанием тяжести ДВС-синдрома, истощением или избыточной активацией фибринолиза на фоне "протеолитического взрыва", обусловленного разрушением опухолевых клеток и поступлением большого количества протеаз вследствие дегрануляции. Кровоизлияние в головной мозг в первые три дня от момента поступления или начала терапии был обычным финалом больных ОПЛ. Летальность в период индукции ремиссии у больных ОПЛ в первые годы использования современных программ химиотерапии составляла 30%-40%. Лишь массивная трансфузиологическая поддержка (свежезамороженная плазма (СЗП) - минимум 1 л, а иногда и 2 л в сутки, уровень тромбоцитов должен поддерживаться с помощью переливания тромбоконцентратов на цифрах не менее $50 \times 10^9/\text{л}$) позволила снизить раннюю летальность до 15-20%.

Большие итоговые работы последних лет по химиотерапии ОПЛ со всей очевидностью продемонстрировали необходимость использования более высоких доз (больше 45 мг/м^2) антрациклинов антибиотиков. Определенный интерес в этом плане представляют данные Юго-Западной Онкологической Группы США (SWOG) по лечению ОПЛ. Авторы ретроспективно проанализировали результаты терапии ОПЛ по протоколам, используемым ими в разные годы [80].

Результаты этого исследования свидетельствуют также о том, что при использовании программы «7+3» в лечении ОПЛ прогностическими факторами являются раса пациента (у больных черной расы процент достижения ремиссии ниже, чем у белых), количество бластных клеток в периферической крови (при наличии их в периферической крови вероятность достижения ремиссии ниже и безрецидивная выживаемость хуже), число лейкоцитов (при числе лейкоцитов более $10 \times 10^9/\text{л}$ общая и безрецидивная выживаемость больных существенно ниже) и тромбоцитов (при глубокой тромбоцитопении вероятность достижения ремиссии ниже).

Важным в лечении ОПЛ является не только доза в курсах индукции, но и длительность его использования в период постремиссионной терапии (консолидация и поддерживающее лечение) [80].

При анализе данных различных авторов вытекает, что использование достаточно высоких доз даунорубицина в индукции позволяет достигать высокого процента ремиссий, но, если препарат не применяется и в ходе постремиссионной терапии, долгосрочные результаты становятся хуже. Таким образом, стандартный химиотерапевтический подход к терапии ОПЛ должен заключаться в использовании программы «7+3» с дозой даунорубицина не менее 60 мг/м² в день. Эта же программа должна быть повторена в консолидации, а затем проводятся еще 2 курса по аналогичной схеме, но доза даунорубицина снижается до 45 мг/м² в день. В качестве альтернативы программе «7+3» может быть применена программа 5-дневного даунорубицина: 2 курса с дозой 60 мг/м² 5 дней (без цитарабина), затем 2 курса с дозой 45 мг/м². При том и другом подходе поддерживающее лечение осуществляется уже без антрациклинов, так как суммарная доза их превысит 650-800 мг/м². Обычно проводятся курсы «7+3» с 6-тиогуанином в дозе 50 мг/м² 2 раза в день 3 дня вместо даунорубицина. Длительность поддерживающего лечения составляет приблизительно 1 год от момента достижения полной ремиссии [11].

По современным данным безрецидивная выживаемость больных ОПЛ, которым проводится только химиотерапия, составляет 50-60% [51, 78]. Применение производных ретиноевой кислоты (в основном ATRA) явилось своеобразным прорывом в терапии острых промиелоцитарных лейкозов [89]. Это до настоящего времени единственный лекарственный препарат, не обладающий цитостатическим эффектом, на фоне приема которого достигаются клинико-гематологические ремиссии при остром лейкозе. Монотерапия трансретиноевой кислотой не позволяет достигать длительной безрецидивной выживаемости, у всех больных развивается рецидив болезни. Поэтому современная терапия предполагает сочетанное использование препаратов ретиноевой кислоты и цитостатических средств.

Наибольшей активностью из препаратов обладает полностью трансретиноевая кислота (ATRA). Изотретиноин (13-цисретиноевая кислота), демонстрируя аналогичное действие на опухолевые клетки в культуре (линия HL-60), менее эффективен у больных ОПЛ, хотя описаны случаи достижения ремиссии и на фоне использования этого деривата [108].

Ретиноиды (синтетические и естественные) являются производными витамина А (ретинола), которые принимают участие во многих физиологических процессах - рост, зрение, репродуктивная функция, дифференцировка эпителиальных

клеток, иммунологические реакции [108, 132, 150]. Пищевым источником ретинола являются каротины овощей и ретиноловые эфиры животных тканей, каждый из которых затем в эпителии кишечника преобразуется в ретинол. Путем внутриклеточного окисления ретинол преобразуется в полностью трансретиноевую кислоту. ATRA содержится в плазме в концентрации 1,5-3 нг/мл. После приема внутрь разовой дозы 45 мг/м² ATRA в плазме регистрируется пиковая концентрация 1 мкг/мл. ATRA быстро выводится из плазмы с периодом полураспада около 45 мин. Через 12 ч после приема 45 мг/м² концентрация ее снижается до естественной, поэтому рекомендуется делить суточную дозу препарата на два приема [96, 150].

Всасывание ретиноидов зависит от приема пищи: лучшее всасывание и более высокая концентрация в плазме определяются, если препарат применяется одновременно с пищей, содержащей большое количество жиров. Всасываясь, ATRA попадает в портальную систему (в отличие от других ретиноидов, которые попадают в лимфатический проток), не накапливается ни в каких тканях, быстро метаболизируется и выводится.

Метаболизируется ATRA путем окисления и затем глюкуронизации в печени. Цитохром P450 принимает участие в метаболизме препарата, что доказывается повышением плазменной концентрации ATRA после использования ингибиторов цитохрома P450 (например, низорал, флуконазол, итраконазол). Внутриклеточно ретиноевая кислота связывается с белками CRABPs (cellular RA-binding proteins - клеточные белки, связывающие ретиноевую кислоту). Метаболит ATRA, связанной с CRABPs, в 7 раз эффективнее свободной ATRA. Цис-дериваты ретиноевой кислоты в 10 раз менее активно связываются с CRABPs [108, 150].

При ежедневном использовании ATRA индуцирует свой метаболизм таким образом, что через 1-2 недели лечения концентрация препарата в плазме снижается в 5 и более раз по сравнению с первой неделей терапии, что является недостаточным для оказания эффекта на лейкоэмические клетки. Механизмы развития этого феномена объясняются следующим образом:

- со временем снижается абсорбция препарата,
- повышается активность цитохрома P450 и липидных гидрокси-perоксидаз,
- увеличивается содержание CRABPs.

После отмены ATRA все механизмы метаболизма препарата восстанавливаются. Феномен приобретенной резистентности, свойственный ATRA на фоне терапии, не развивается при лечении 13-цисретиноевой кислотой [108].

Практически все работы последнего времени, связанные с лечением ОПЛ, посвящены использованию ATRA в сочетании с цитостатическими препаратами. Эта терапия позволяет добиваться очень высокого процента ремиссий (85-96%) без фазы аплазии при быстром купировании ДВС-синдрома. Было доказано, что длительная безрецидивная выживаемость больных ОПЛ, которым проводилась индукция ремиссии с помощью ATRA и цитостатических препаратов, вдвое превышает таковую у тех, у кого использовались лишь цитостатические средства (50 против 80% в течение 1 года; 40 против 78% в течение 5 лет) [51, 59].

Использование ATRA в качестве поддерживающего лечения уже после достижения и консолидации ремиссии с помощью цитостатических препаратов статистически достоверно снижает число рецидивов. Механизм действия трансретиноевой кислоты при уже достигнутой ремиссии остается неясным, однако можно предположить, что препарат вызывает истощающую дифференцировку клеток, составляющих остаточную лейкоэмическую популяцию.

Применение ATRA в индукции должно быть длительным. Так, английская группа в рандомизированном исследовании по лечению ОПЛ доказала, что 5-дневный курс трансретиноевой кислотой существенно хуже, чем длительное, до достижения ремиссии, применение этого препарата: процент ремиссий ниже - 69 против 87, выше ранняя летальность - 23 против 12, чаще регистрируются резистентные формы ОПЛ: 9 против 2%. Также существенно отличаются и 3-летняя безрецидивная выживаемость больных (53 против 74%) и вероятность развития рецидива (35 против 14%) [36].

Важно иметь в виду, что те осложнения, которые возникают при применении ATRA, могут быть фатальными. На фоне терапии ATRA возможно развитие следующих побочных эффектов:

- головная боль, сонливость, могут определяться менингеальные знаки (ригидность затылочных мышц, симптом Кернига), нистагм;
- тошнота, рвота;
- температура, которая может быть как субфебрильной, так и подниматься до 40°C. При отмене ATRA температура нормализуется в среднем через 24 ч. В некоторых случаях, когда есть трудности в дифференциальной диагностике природы лихорадки - инфекционная или на фоне приема ретиноидов, возможна отмена ATRA на 1-2 дня. Фебрильная лихорадка чаще всего сопровождается симптоматикой ATRA-синдрома;
- кожный зуд, сухость кожи и слизистых;
- боли в костях;

- специфические инфильтраты (как лейкоиды) в коже, на глазном дне;
- повышение уровня трансаминаз.

Наиболее грозным осложнением применения ATRA является ретиноидный синдром [50]. Его развитие можно ожидать как в первые дни приема ATRA на фоне увеличения числа лейкоцитов, так и после курса «7+3», если продолжается прием ATRA, на выходе из агранулоцитоза при низких цифрах лейкоцитов (например, менее $2 \times 10^9/\text{л}$). Клиническими симптомами ретиноидного синдрома являются фебрильная лихорадка без признаков инфекции, дыхательная недостаточность, кровохарканье, рентгенологическая картина, похожая на легочный дистресс-синдром, гипотензия, почечная, печеночная недостаточность и т.д. Механизм развития этого синдрома не вполне ясен:

- предполагается участие в его патогенезе ферментов опухолевых клеток, которые высвобождаются в русло в результате терапии ATRA;
- возможно изменяется антигенный состав мембраны опухолевых клеток, и они приобретают способность инфильтрировать легочную ткань;
- вероятно возникает повреждение эндотелия.

При малейших подозрениях на ретиноидный синдром назначается дексаметазон в дозе 20 мг/м² (или по 10 мг 2 раза в день) в сутки в течение 3 дней со снижением дозы до купирования симптомов ретиноидного синдрома, при необходимости осуществляется искусственная вентиляция легких.

Частота развития ATRA-синдрома, по данным различных авторов, составляет 13-45% [45, 50, 60, 146]. Такой разброс в значениях связан с тем, как назначается ATRA - совместно с цитостатическими препаратами или как монотерапия, проводится ли профилактика дексаметазоном или нет.

В настоящее время считается, что предпочтительнее, в любом случае, назначать ATRA одновременно с курсом химиотерапии либо в течение не более 3-5 дней до курса химиотерапии. Длительность приема должна составлять минимум 30 дней (до достижения ремиссии). Можно рекомендовать чередовать курсы поддерживающего лечения полностью трансретиноевой кислотой (7 дней в дозе 25 мг/м²) с курсами химиотерапии. Интервал между ними должен составлять 4 недели. Общая длительность лечения - 1 год от момента достижения ремиссии. Необходимым этапом в лечении ОПЛ программами, включающими полностью трансретиноевую кислоту, особенно у больных с исходным числом лейкоцитов более $10 \times 10^9/\text{л}$ следует считать профилактику нейтролейкемии.

При терапии ATRA возможно развитие экстрамедуллярных поражений, ранее никогда не описываемых при ОПЛ: поражение лимфоузлов, кожи, мозговых оболочек. Это связывают с тем, что лейкоэмические клетки под воздействием ретиноидов изменяют свои антигенные свойства и приобретают способность преодолевать биологические барьеры. Впрочем, не исключено, что больные на фоне успешной терапии стали доживать до этого закономерного для других форм острого лейкоза осложнения. Профилактика нейролейкемии проводится по аналогичной всем острым лейкозам схеме (см далее).

Современное лечение ОПЛ с применением препаратов ATRA позволяет отнести острый промиелоцитарный лейкоз к наиболее благоприятным формам острых лейкозов: практически 70% больных, у которых достигается ремиссия, живут без рецидива более 5 лет.

Профилактика и лечение нейролейкемии у больных острыми нелимфобластными лейкозами

Профилактика нейролейкемии осуществляется при миеломонобластном и монобластном лейкозе, при промиелоцитарном на фоне терапии ATRA, а также при всех формах ОМЛ при исходном лейкоцитозе выше $30 \times 10^9/\text{л}$. Первая диагностическая пункция производится до индукционного курса или в первые дни его проведения до развития цитопении. Если не удается провести первую диагностическую пункцию до начала первого индукционного курса вследствие исходной глубокой цитопении (лейкоциты менее $1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты менее $20 \times 10^9/\text{л}$), то пункция осуществляется после проведения курса индукции и нормализации показателей периферической крови. Техника выполнения люмбальных пункций, а также набор используемых цитостатических препаратов не отличаются от таковых при ОПЛ.

Сроки проведения люмбальных пункций должны приблизительно соответствовать следующей схеме: первая - до первого курса индукции, вторая/третья - перед следующим курсом индукции/консолидации, четвертая/пятая - перед третьим (по счету) курсом терапии, все последующие - 1 раз в 3 месяца. Возможно более компактное проведение профилактических пункций: 4 пункции (по 2 в неделю) перед вторым курсом индукции/консолидации, затем по 1 пункции перед каждым вторым курсом поддерживающего лечения. Пункции проводятся в течение года терапии.

Альтернативой профилактическим интратекальным введениям препаратов у больных, которые тяжело их переносят (развитие менин-

гизма, менингитов, эпилептиформных припадков и т.д.), может стать облучение головы в дозе 2,4 Гр. В этих случаях проводится только облучение головы, и на протяжении дальнейшей терапии профилактические люмбальные пункции не выполняются.

При появлении менингеальной симптоматики или обнаружении в ликворе бластного цитоза более $10/3$ диагностируется нейролейкемия. Лечение нейролейкемии проводится путем введения в спинномозговой канал трех препаратов (цитозин-арабинозида, метотрексата, преднизолона).

После первой диагностической пункции первая и последующие лечебные должны производиться с интервалом в 1-3 дня, то есть на фоне курса химиотерапии и после него, но до развития глубокой цитопении (лейкоцитов менее $1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов менее $20 \times 10^9/\text{л}$). Последующие пункции выполняются после выхода из агранулоцитоза - пункции осуществляются с разрывом в 3 дня перед следующими двумя курсами индукции/консолидации. После нормализации цитоза должно быть сделано минимум три пункции, а затем должны проводиться профилактические введения препаратов 1 раз в 2 месяца в течение всего периода лечения. Необходимым элементом лечения нейролейкемии должно быть краниальное облучение. Оно проводится в суммарной дозе 2,4 Гр после завершения интратекальных введений цитостатических препаратов в перерыве между вторым и третьим или третьим и четвертым курсом консолидации. Облучение занимает 3 недели. Общий перерыв между этими курсами может быть 6 недель. После облучения возобновляется интратекальное введение препаратов, как уже указывалось с частотой 1 раз в 2 месяца.

Если имеются признаки прогрессирования нейролейкемии на фоне интратекальных введений или сохраняется цитоз после 8-10 пункций, то должен быть рассмотрен вопрос о подключении к терапии краниального облучения. Облучение головы в данной ситуации может осуществляться и при нейтропении, когда число лейкоцитов не превышает $1-3 \times 10^9/\text{л}$. После завершения облучения люмбальные пункции должны быть продолжены. При резистентных формах нейролейкемии допустимо назначение таких препаратов, как натулан в дозе 150 мг в день в течение 2 недель, нитрозомочевины 80-100 мг за один прием.

Следует отметить, что когда в индукции и консолидации применяются программы с включением высоких доз цитарабина (более $1 \text{ г}/\text{м}^2$), причем, проводится не один курс, а минимум 2, то нет необходимости использовать интратекальные введения препаратов на этапе выпол-

нения этих программ. Затем, с началом терапии поддержания ремиссии, профилактические интратекальные введения препаратов могут быть возобновлены.

Лечение пожилых больных

Принципиальные подходы к лечению ОМЛ у пожилых больных такие же, как и у лиц более молодого возраста. Тем не менее, имеется ряд особенностей. В настоящее время существует три основных тенденции в терапии пациентов старше 60 лет: использование полноценных курсов химиотерапии, редуцированных программ и применение малых доз цитарабина (монотерапия или в сочетании с какими-либо другими цитостатическими препаратами). Многие исследователи применяют редуцированные дозы антрациклиновых препаратов в период индукции, основанием чему послужили данные, свидетельствующие о высокой токсичности полноценных курсов и о высокой ранней смертности у больных старше 60 лет (27-53%). Тем не менее, по имеющимся данным, увеличение дозы даунорубина с 30 до 60 мг/м² в программе TAD-9 не только не увеличило токсичность программы, а, наоборот, уменьшило процент ранней летальности с 27 до 20%, и при этом существенно увеличился процент достижения полной ремиссии: с 38 до 54 [33]. Аналогичные данные приводятся и другими исследователями. В среднем процент ремиссий у пожилых больных равен 46 при высокой, в среднем, ранней летальности - 35% [19, 148, 152]. В настоящее время существует общая тенденция более интенсивного лечения пожилых пациентов, то есть соотносимого со стандартными программами лечения молодых больных; по крайней мере, стандартные курсы химиотерапии могут использоваться у больных старше 60 лет без редуцирования доз цитостатических препаратов. У пожилых, без сомнения, целесообразно проводить индукцию по стандартной программе «7+3» с дозой даунорубина 45 мг/м². Следует помнить, что пациентам пожилого возраста программы интенсификации с помощью высокодозного цитарабина не показаны в период индукции ремиссии. Рекомендуется после проведения одного стандартного курса индукции выполнение двух курсов консолидации по той же схеме, только со снижением дозы даунорубина до 30 мг/м².

Таким образом, после завершения трех курсов индукции и консолидации по программе «7+3» пожилым проводится программа поддерживающего лечения по следующей схеме: цитарабин 5 дней в дозе 100 мг/м² суммарно в день подкожно в сочетании либо с даунорубином 30 мг/м² в день 2 дня (до общей дозы 650 мг/м²,

затем эти курсы не проводятся), либо с циклофосфаном в дозе 600 мг/м² в 1 день, либо 6-тиогуанином 50 мг/м² 2 раза в день 5 дней. Курсы чередуются с интервалом в 1 месяц. Общая длительность лечения составляет 3 года.

Трансплантация костного мозга при острых нелимфобластных лейкозах

Трансплантация костного мозга (ТКМ) является лишь этапом лечения для определенного числа пациентов, отобранных для ее осуществления, и ни каким образом не заменяет химиотерапию. Трансплантация аллогенного костного мозга может быть применена лишь у 5-10% больных ОМЛ (селекция по возрасту, соматическому статусу, фазе заболевания, наличию или отсутствию донора, информированному согласию).

Трансплантация костного мозга как аллогенная, так и аутологичная, может рассматриваться в качестве альтернативы стандартной современной химиотерапии для больных в первой ремиссии и считаться единственным подходом, который может предоставить возможность определенному проценту больных во второй ремиссии или вне ремиссии пережить 5-летний рубеж. Однако вновь хотелось бы остановиться на вопросах селекции, поскольку речь идет лишь о той категории больных, которым вообще возможно проведение ТКМ (возраст моложе 40 лет, хороший соматический статус).

При анализе данных английского исследования MRC-10 по аутологичной трансплантации костного мозга было доказано, что при ее выполнении достоверно снижается вероятность развития рецидива по сравнению с больными, которым лечение было прекращено: 37 против 53% ($p=0,0007$). Также достоверно отличалась и безрецидивная выживаемость этих больных: 53 против 40% ($p=0,04$). Поскольку летальность при выполнении аутологичной ТКМ составляет 13%, то общая выживаемость в группах достоверно не отличалась - 57 и 46% ($p>0,5$). Исходя из приведенных результатов, можно сделать вывод, что аутологичная ТКМ у больных в первой ремиссии приносит очевидный дополнительный антилейкемический эффект, но летальность от самой процедуры нивелирует отличия по реальной выживаемости пациентов. Именно поэтому однозначных рекомендаций по выполнению аутологичной ТКМ у больных ОМЛ в первой ремиссии быть не может. Только при условии минимальной летальности (не более 8-10%) вследствие самой трансплантации аутологичная ТКМ может быть включена в программы лечения ОНЛЛ [37, 39].

Анализ результатов по применению аллогенной трансплантации костного мозга осуществ-

лен на основании данных по всем больным, у которых было проведено типирование сиблингов, по принципу: «есть HLA-совместимый донор против нет донора»; причем, в группу химиотерапии включены только те больные, у кого сохранялась ремиссия на момент возможного проведения аллогенной ТКМ.

Оказалось, что выживаемость пациентов из группы цитогенетически благоприятного прогноза существенно ухудшается, если им в программу лечения вводится аллогенная ТКМ, то есть им не следует выполнять данный вид ТКМ, после терапии, описанной авторами. И, наоборот, пациенты из группы стандартного риска выигрывают в плане долгосрочной выживаемости, то есть именно больным этой группы риска может быть рекомендовано проведение аллогенной ТКМ. Для группы неблагоприятного прогноза получены одинаковые результаты как на химиотерапии, так и при выполнении аллогенной ТКМ, то есть ее выполнение у больных этой группы не приносит необходимого эффекта [37, 39].

Таким образом, ТКМ - это этап в терапии острых лейкозов. Трансплантация должна проводиться в специализированных центрах, в которых выполняется не менее 10 аллогенных и 10 аутологичных ТКМ в год. Это условие представляется важным, иначе летальность от осложнений самой процедуры будет слишком высока.

Рецидивы ОМЛ

Несмотря на все успехи терапии ОНЛЛ в последние десятилетия, у большинства пациентов (60-70%), развивается рецидив болезни. Ранние рецидивы (продолжительность полной ремиссии 6 и менее месяцев) представляют наиболее неблагоприятную в прогностическом плане группу и могут быть отнесены к феномену «первичной» резистентности. Результаты химиотерапии у этих больных неудовлетворительные. К наиболее перспективным программам химиотерапии, которые могут быть использованы у таких больных, можно отнести программы с включением высоких или средних доз цитарабина в сочетании с новантроном или идарубицином или этопозидом (HAM, VAC), а также новые схемы, основанные на потенцировании эффектов цитарабина флюдарабином - FLAG [61, 128].

Поздние рецидивы ОНЛЛ можно начинать лечить по схемам, используемым в индукции, тем не менее, это в большей степени относится к рецидивам, которые зарегистрированы более, чем через год от момента достижения полной ремиссии. В любом случае, всем этим больным требуется интенсивная терапия. Могут использоваться те же программы с включением высоких или средних доз цитарабина в сочетании с

новантроном, идарубицином, этопозидом. После достижения ремиссии должно быть проведено 2-3 курса консолидации, желательно столь же агрессивные, как и индукционный.

Все больные, у которых диагностирован рецидив и достигнута вторая полная ремиссия, должны рассматриваться как потенциальные кандидаты на выполнение трансплантации костного мозга (аллогенной или аутологичной). Ограничением является возраст пациента (старше 40-45 лет). Тем, у кого нет возможности выполнить ТКМ, в качестве поддерживающего лечения, может быть предложен протокол применения полностью трансретиноевой кислоты и интерферона альфа. Указанное сочетание обладает достаточно высоким антипролиферативным эффектом, причем, препараты потенцируют друг друга. Проводятся 3-дневные курсы терапии 1 раз в месяц в течение года после достижения и интенсивной консолидации второй ремиссии. Интерферон вводится в дозе 3 млн. в день подкожно 1-3-й дни, трансретиноевая кислота в дозе 45 мг/м² в день 1-3-й дни.

Если рецидив ОНЛЛ развился у больного после выполнения аллогенной ТКМ, то в первую очередь в настоящее время пытаются использовать переливание лимфоцитов донора с целью индукции эффекта трансплантат против лейкоза. При ОНЛЛ эффективность этих трансфузий составляет 50-60%, то есть достигается вторая ремиссия без цитостатического воздействия у большинства больных [83].

Острые лимфобластные лейкозы

Острый лимфобластный лейкоз - ОЛЛ чаще поражает детей, его пик приходится на 2-4 года, составляя 30% всех злокачественных опухолей детского возраста. У пациентов моложе 15 лет ОЛЛ диагностируется в 75% случаев всех острых лейкозов; среди взрослых эта форма острого лейкоза встречается у 10-15% больных. По данным Ellison, среди больных старше 49 лет было всего 4% лиц с ОЛЛ; мы наблюдали эту форму у 17% взрослых, причем более половины были старше 60 лет: второй подъем, хотя не столь существенный, отмечается в возрасте 50-60 лет. Частота этого лейкоза в популяции приблизительно 2-3 на 100 000 в год [103, 138].

К моменту диагностирования ОЛЛ опухоль уже достаточно велика и ее масса достигает, как правило, 1×10^{12} клеток на 1 м² поверхности тела и составляет около 3-4% его массы [Fraireich et al., 1968]. Такое число лейкозных клеток может образоваться за 1-3 месяца болезни при удвоении числа лейкозных клеток в костном мозге за 4-10 дней. К моменту наступления ремиссии содержание лейкозных клеток снижается до 1×10^8 - 1×10^9 /м².

Клинические симптомы заболевания очень разнообразны, и болезнь до установления диагноза может протекать месяцами с незначительными проявлениями. С другой стороны, дебют может быть острым и бурным. К наиболее частым симптомам заболевания относят слабость, сонливость, лихорадку, не связанную с инфекцией, оссалгии и артралгии. Инфекционные осложнения встречаются нечасто, и в основном в тех случаях, когда число нейтрофилов не превышает $0,2 \times 10^9/\text{л}$. В некоторых ситуациях единственной жалобой, особенно у детей, являются боли в костях и позвоночнике без лимфоаденопатии, органомегалия и изменения в анализах периферической крови. В этих случаях диагноз ОЛЛ ставится с существенной отсрочкой. В 2% случаев детям диагностируется апластическая анемия. Диагноз ОЛЛ после апластической фазы может быть определен в ряде случаев через несколько месяцев после диагностирования апластической анемии. Другой симптом - похудание - редко бывает значительным. В 1% случаев у пациентов отмечаются головные боли, тошнота, рвота, чаще всего при вовлечении центральной нервной систем.

Характерной особенностью клинической картины является увеличение лимфатических узлов (54%), селезенки (71%) [Кисляк Н.С.]. В зависимости от места преимущественного увеличения лимфатических узлов меняется и клиническая симптоматика. При их локализации в средостении возможны сухой кашель, одышка; увеличенные мезентериальные узлы могут вызывать боли в животе [Тур А.Ф.]. Другой особенностью являются оссалгии, чаще - боли в голених. Это обуславливает диагностические ошибки: боли в ногах, грубый систолический шум (анемической природы) и субфебрилитет толкают на поиски ревматизма. Возможны и описанные выше признаки, связанные с угнетением нормальных ростков кроветворения (анемический синдром, инфекции, геморрагии). Однако начало острого лимфобластного лейкоза у детей нечасто сопровождается глубоким угнетением гемопоэза, обычно отмечаются лишь нормохромная анемия и умеренная лейкопения.

При физикальном обследовании могут обнаруживаться различной степени бледность кожных покровов, петехиальные высыпания, синяки, кровоточивость десен, лихорадка, лимфоаденопатия, в том числе увеличение небных миндалин, спленомегалия, гепатомегалия, увеличение размеров почек, болезненность при поколачивании костей. Вовлечение кожи при ОЛЛ бывает редко, и если диагностируется, то ассоциируется с пре-B иммунофенотипом.

При рентгенологическом исследовании грудной клетки у 5-10% больных выявляется увели-

чение размеров средостения либо за счет вовлечения тимуса (переднее верхнее средостение), либо за счет внутригрудных лимфоузлов. При ультразвуковом исследовании могут определяться увеличенные лимфоузлы всех групп (абдоминальные, забрюшинные). При выполнении диагностической люмбальной пункции у 3-5% больных в ликворе обнаруживаются лейкомиические клетки, что свидетельствует об исходном вовлечении в процесс центральной нервной системы (нейролейкемия).

Картина крови при ОЛЛ такая же, как и при других формах. Клиническое начало болезни может совпадать с алейкемической и лейкомиической фазами. Нередко появляются неспецифические изменения в крови, связанные с нарушением структуры костного мозга: единичные эритрокарициты, миелоциты, промиелоциты - признаки миелемии. Какой бы ни была запутанной клиническая и гематологическая картина начала болезни, пункция костного мозга, обнаруживающая десятки процентов бластов, разрешает все диагностические трудности.

При лабораторном исследовании в 60% случаев выявляются: лейкоцитоз выше $10 \times 10^9/\text{л}$, причем выше $100 \times 10^9/\text{л}$ - в 10%; тромбоцитопения менее $50 \times 10^9/\text{л}$ - у 60% больных в момент диагностики. В большинстве случаев лейкоцитоза свыше $50 \times 10^9/\text{л}$ обнаруживаются и значительная лимфоаденопатия, и гепатоспленомегалия, и чаще всего Т-клеточный иммунофенотип. Гиперлейкоцитоз при ОЛЛ не сопровождается церебральной или легочной недостаточностью, как это бывает при ОМЛ. При анализе пунктата костного мозга в большинстве случаев определяются гиперклеточный костный мозг, тотальная бластная метаплазия, при том, что единичные эритроидные и миелоидные клетки-предшественницы морфологически выглядят нормальными; число мегакариоцитов либо снижено, либо они отсутствуют. По данным биохимических анализов выявляются высокий уровень ЛДГ, гиперурикемия, гиперфосфатемия, гиперкальциемия.

Морфология бластных клеток имеет некоторые особенности (хотя непреложным правилом является установление принадлежности бластов к тому или иному ростку лишь по их гистохимическим и иммунофенотипическим признакам): ядро с нежной сетью хроматина, как у всех бластов, обычно круглое, содержит 1-2 крупных ядрышка во многих ядрах, цитоплазма беззернистая. Как и при всех острых лейкозах, форма ядра в процессе болезни меняется: оно становится неправильным, его размеры растут; также увеличивается и ободок цитоплазмы, клетка может напоминать моноцит при бластной структуре ядра. Специфические гистохимиче-

ские особенности этого лейкоза: бластные клетки не обнаруживают пероксидазы, фосфолипидов, эстераз (или имеются следы неспецифической эстеразы и ХАЭ), а гликоген, выявляемый PAS-реакцией, распределяется в цитоплазме глыбками в виде ожерелья вокруг ядра. При проведении цитогенетического исследования у большинства пациентов (60-70%) выявляются те или иные хромосомные aberrации.

К В-форме острого лимфобластного лейкоза чаще относятся лейкомигрирующие стадии лимфосарком, особенно лимфосаркомы Беркитта, очень редкие бластные кризы хронического лимфолейкоза; случаев собственно В-формы острого лимфобластного лейкоза совсем мало. Лейкозным клеткам при этой форме свойственна высокая плотность IgM на поверхности.

Клинически более четко очерчены особенности Т-формы острого лимфобластного лейкоза. Эта форма чаще встречается у детей старшей группы, средний возраст больных составляет 10 лет, причем среди них преобладают лица мужского пола (соотношение полов составляет 4:1). Т-форма характеризуется повышенной частотой поражения средостения более чем у 50% больных, высокой пролиферативной активностью клеток.

У детей увеличение подчелюстных лимфатических узлов встречается часто из-за хронического тонзиллита, а увеличение селезенки - обычная реакция на инфекцию. Лейкозная инфильтрация лимфатических узлов придает им плотность (узлы обычно безболезненны), чаще увеличиваются надключичные лимфатические узлы, а не подчелюстные, как при тонзиллите. В сомнительных случаях всегда показана пункция органа: особенно это касается селезенки, так как в ней может быть местный рецидив с почти сплошным содержанием бластов в пунктате. Своевременная диагностика острого лимфобластного лейкоза как "быстрого" лейкоза имеет важнейшее значение не только из-за стремительности самого процесса, но и из-за заноса патологических клеток в мозговые оболочки, яички и т. д.

У взрослых начало ОЛЛ может быть еще более неспецифическим, чем у детей, самочувствие дольше остается удовлетворительным при одинаковой распространенности процесса. По клинической картине, способности оставлять сохранными нормальные ростки кроветворения, частоте первой ремиссии острый лимфобластный лейкоз у взрослых похож на детский вариант.

Селезенка и лимфатические узлы при остром лимфобластном лейкозе увеличиваются большей частью одновременно с процессом в костном мозге. В отличие от острого миелобластного

го лейкоза это увеличение при данном лейкозе не есть новый этап прогрессии. Лейкемические клетки, инфильтрирующие лимфатические узлы и селезенку, оказываются, как правило, чувствительными к тем же цитостатическим препаратам, что и клетки в костном мозге.

Дифференциальный диагноз ОЛЛ приходится проводить в первую очередь с лимфосаркомами, которые метастазировали в костный мозг. Довольно трудно провести четкую грань между двумя нозологиями, тем более, что в настоящее время выделяют такие формы болезни, которые как бы объединяют в себе характеристики двух и представляют одну единую форму - лейкоз/лимфома. Это касается таких заболеваний, как В-клеточный лейкоз/лимфома (фенотип зрелых В-клеток), так и Т-клеточный лейкоз/лимфома (фенотип зрелых Т-клеток). При метастазах лимфосаркомы в костный мозг в пунктате встречается среди бластов сравнительно много митозов, которых практически нет при обычном остром лейкозе.

ОЛЛ в ряде случаев необходимо дифференцировать с метастазами в костный мозг нейроblastомы, некоторых раков (мелкоклеточный рак легкого, например). Иногда труден дифференциальный диагноз с инфекционным мононуклеозом. В любом случае диагноз устанавливается только на основании комплексного анализа (морфология, цитохимия, иммунофенотипирование, цитогенетика) бластных клеток.

Без терапии течение ОЛЛ не имеет особенностей: нарастает угнетение нормальных ростков кроветворения, появляются инфекционные осложнения, геморрагии, прогрессирует анемия. До применения 6-меркаптопурина и преднизолона продолжительность жизни больных детей составляла около 2-3 месяцев, взрослых - 2 месяцев. В настоящее время, как правило, ремиссия достигается применением комплекса цитостатических средств. Дальнейшая непрерывная цитостатическая терапия удерживает ремиссию месяцы или годы.

Однако у взрослых (как правило) и у детей (часто) возникает рецидив болезни. Предугадать развитие рецидива обычно не удается. Рецидив может быть либо только местным, например, появление нейролейкемии, инфильтрации нервных корешков или инфильтрации яичка, лейкоэмический эписклерит и т. п., либо костномозговым. Местный рецидив замечен при осмотре (яички обязательно пальпируют при каждом осмотре пациента), определяется при спинномозговой пункции либо по появлению болевого синдрома, обусловленного инфильтрацией корешков. Костномозговой рецидив может не сопровождаться выходом бластных клеток в кровь, поэтому стерильную пункцию следует

проводить регулярно: ежемесячно в первый год ремиссии, а затем - 1 раз в 3 месяца. Кроме того, стерильную пункцию делают при появлении бластов в крови и цитопении, не зависящей от цитостатиков.

Безусловным показанием к исследованию костного мозга должны быть явные клинические признаки рецидива: увеличение лимфатических узлов, появление болей в костях, корешковый синдром, субфебрилитет, просто немотивированное ухудшение общего состояния. Проявления болезни в рецидиве ОЛЛ упорнее, чем при ее первом приступе. Каждый последующий рецидив течет более злокачественно, чем предыдущий, и имеет худший прогноз. Однако заранее никогда нельзя предугадать ответ очередного рецидива на новую комбинацию цитостатиков. Само по себе возникновение рецидива существенно снижает вероятность выздоровления, хотя полная ремиссия и при рецидиве достигается довольно часто, если первая ремиссия была длительной (87% при первом рецидиве).

Метастазирование процесса в яички и мозговые оболочки, наиболее частое при остром лимфобластном лейкозе детей, представляет собой новый этап (следующую ступень опухолевой прогрессии), хотя нередко очень рано возникающий. Внекостномозговые метастазы при этом лейкозе в большинстве случаев имеют значительно лучший прогноз, чем при миелобластном. От момента появления нейролейкемии до смерти больного может пройти несколько лет, в течение которых терапия сохраняет общее состояние вполне удовлетворительным. Облучение опухолевого очага, ликвидируя его, не обязательно сопровождается вспышкой процесса в других местах и костном мозге в первую очередь.

Прогностические факторы

В результате накопленных данных по сопоставлению результатов терапии и иммунофенотипа бластных клеток при ОЛЛ выделено несколько прогностически важных групп, которые у детей и взрослых имеют отличия. В настоящее время к группе благоприятного прогноза у детей относят *common*-ОЛЛ (CD10+ ранний пре-В вариант), неблагоприятного - Т-клеточные варианты. Для взрослых больных Т-клеточный ОЛЛ представляет группу благоприятного прогноза, *common*-ОЛЛ - промежуточного, неблагоприятного - ранний пре-В и В-зрелый (при проведении стандартной, а не блоковой терапии) [84]. Большинство исследователей считает, что экспрессия миелоидных маркеров на клетках лимфобластного лейкоза не влияет на долгосрочные результаты лечения [95, 129].

В настоящее время основное внимание уделяется цитогенетическим характеристикам бластных клеток и специфическим молекулярным маркерам, появляющимся в результате транслокаций. Уже с начала 80-х годов известен факт о благоприятном прогнозе у больных ОЛЛ с гиперплоидным (более 50) набором хромосом. К концу 90-х годов описаны уже десятки транслокаций, ассоциированных с тем или иным вариантом острого лейкоза и его исходом. В представленной далее таблице указаны наиболее часто встречаемые транслокации, их молекулярные маркеры (химерные белки), обладающие определенной клеточной активностью, и все это соотносено с прогнозом и наиболее яркими клиническими характеристиками описываемых форм ОЛЛ [102, 121, 131].

Сейчас к наиболее часто оцениваемым факторам относятся транслокации (9;22) и (4;11). Транслокация (9;22) определяется у 5-10% детей и 25-30% взрослых больных ОЛЛ, а t(4;11) определяется у детей в 2%, а у взрослых - в 5-6% случаев. Обнаружение указанных транслокаций всегда считается крайне неблагоприятным прогностическим признаком независимо от того, имеются ли другие факторы риска или нет. Цитогенетические маркеры при ОЛЛ определяют не только прогноз заболевания, но и позволяют осуществлять мониторинг минимальной остаточной болезни, а также выбирать адекватную терапевтическую тактику. Новый препарат - ингибитор тирозинкиназы, эффективный при ХМЛ, оказался эффективен и при Рн-позитивных острых лейкозах.

Несмотря на очень четкую корреляцию между генотипом лейкоза и результатами лечения, в оценке прогноза для каждого отдельного пациента, тем не менее, продолжают оцениваться и социальные факторы - бедность, недоедание, инфекции в дебюте болезни, а также уже хорошо известные факторы - возраст, болезнь Дауна, которые являютсяотягчающими обстоятельствами.

Принципы терапии острого лимфобластного лейкоза

Оптимистичные результаты терапии ОЛЛ у детей, полученные в конце 60-х годов и позволившие через 20 лет говорить об излечении более 50%, пациентов, несомненно, стали эталоном эффективности химиотерапии злокачественных опухолей вообще [4, 5, 93, 119]. Использование лишь трехкомпонентной терапии у детей из группы благоприятного прогноза (винкристин, преднизолон, Л-аспарагиназа) позволяет достигать полной ремиссии у 85-95% детей, причем, добавление к этим трем препаратам антрациклинов практически удваивает длительную

безрецидивную выживаемость (с 39 увеличивается до 64%). Следует отметить, что эффективность лечения у детей определяется и социальным статусом родителей. У детей с плохим питанием 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 26% в сравнении с 83% у детей с нормальным весом и питанием [100].

Использование у взрослых как протоколов, аналогичных применяемым у детей, так и более агрессивных программ химиотерапии не привело к столь же обнадеживающим результатам. Этому есть, по крайней мере, два объяснения. Во-первых, предполагается, что ОЛЛ детей и ОЛЛ взрослых - это разные, сильно отличающиеся друг от друга по биологическим свойствам заболевания [40, 47, 93, 105]. Например, частота обнаружения таких неблагоприятных хромосомных аберраций, как $t(9;22)$, $t(4;11)$ у взрослых значительно выше, реже определяется ранний пре-B-CD10+ (common) ОЛЛ, чаще диагностируется Т-иммунофенотип, чаще определяются миелоидные антигены на мембране опухолевых клеток, у большего числа больных в дебюте заболевания выявляются гиперлейкоцитоз, большая средостенная опухоль. Также для взрослых доказан иной метаболизм метотрексата, то есть бластные клетки взрослых больных ОЛЛ аккумулируют активный метаболит метотрексата - метотрексата полиглутамат - в значительно более низкой концентрации [72]. Во-вторых, очевидны различные переносимость цитостатических воздействий и частота возникновения токсических эффектов, а соответственно и снижение интенсивности химиотерапии (уменьшение доз цитостатических препаратов и увеличение продолжительности интервалов между курсами) у детей и взрослых, что также определяет худшие результаты лечения ОЛЛ у взрослых [86]. С другой стороны, есть интересные данные о том, что результаты терапии молодых людей в возрасте от 16 до 21 года в педиатрических отделениях значительно лучше, чем в отделениях гематологии для взрослых [112]. Этот факт, по-видимому, объясняется тем, что педиатры меньше боятся агрессивной терапии, более адаптированы к экстремальным ситуациям и полностью выполняют протоколы по дозам и времени введения препаратов.

В настоящее время полная ремиссия достигается у 75-80% взрослых больных ОЛЛ, но лишь 30-40% из них переживают 5-летний рубеж без рецидива, то есть лишь у 20-25% из общего числа заболевших можно говорить об онкологическом выздоровлении [2, 8, 10, 85, 95, 117]. Основные факторы, определяющие эффективность терапии ОЛЛ взрослых [47, 85, 95], - это возраст пациента, число лейкоцитов в дебюте заболевания (менее или более $30 \times 10^9/\text{л}$), имму-

нофенотип лейкоэмических клеток и цитогенетические аномалии (транслокации 9;22, 4;11; 8;14), сроки достижения ремиссии (до и после 1 месяца терапии).

Существует несколько принципиальных положений относительно химиотерапии острых лимфобластных лейкозов:

- 1) это терапия всегда поэтапная (индукция ремиссии, консолидация и поддерживающее лечение) и длительная (за исключением случаев с В-зрелым фенотипом бластных клеток) - 2-3 года;
- 2) базисным препаратом является преднизолон или дексаметазон (доза их всегда должна быть строго рассчитана на площадь поверхности тела), но сама терапия - многокомпонентная, с чередованием различных по механизму действия лекарственных препаратов (от 3 до 8);
- 3) обязательное включение в программу терапии ОЛЛ профилактики нейтролейкемии и, если есть необходимость, ее лечение. И уже в рамках этих правил существует два принципиально различных подхода к лечению больных ОЛЛ: дифференцированный (в зависимости от наличия или отсутствия указанных факторов) и унифицированный.

Если приводить примеры, используя лишь большие кооперированные группы, то наиболее характерным представителем первого подхода является Общегерманская группа по изучению ОЛЛ взрослых (координатор - Д. Хельцер) [86]. Вторым подходом используется американскими исследователями из Группы Б по изучению рака и острых лейкозов (CALGB) и из Научно-исследовательского Центра М.Д. Андерсона по изучению рака [48, 92, 95]. Но, проводя унифицированную программу химиотерапии по оригинальной программе Hyper CVAD, исследователи из Центра М.Д. Андерсона, тем не менее, осуществляют профилактику нейтролейкемии дифференцированно - в зависимости от исходного уровня ЛДГ (более 600 ед.) и пролиферативного индекса бластных клеток (более 14% клеток в S+G2M фазе клеточного цикла), так как эти показатели определяют, по их данным, большую вероятность поражения оболочек головного мозга при ОЛЛ.

Унифицированный подход привлекателен возможностью достаточно адекватного лечения ОЛЛ независимо от его иммунологического варианта и факторов риска. Дифференцированное, соотношенное с факторами риска лечение ОЛЛ представляет собой, по-видимому, более прогрессивный метод терапии. Это доказывается, например, тем, что выживаемость пациентов с неблагоприятными ранними пре-B- и В-вариантами ОЛЛ существенно улучшилась при

включении в стандартные протоколы после 8-недельной индукции ремиссии высокодозной консолидации (высокие дозы метотрексата в сочетании с L-аспарагиназой или высокие дозы цитозин-арабинозида в сочетании с новантроном - для раннего пре-В ОЛЛ) и применении агрессивной импульсной непродолжительной (6 месяцев) терапии, используемой в лечении лимфосарком (6 коротких курсов, включающих высокие дозировки 8 различных препаратов) для В-ОЛЛ [47, 87].

Попытка сократить продолжительность индукции до I фазы и заменить II фазу (4 недели) высокодозной консолидацией в программе 03195 при раннем пре-В ОЛЛ привела к существенному ухудшению долгосрочных результатов (безрецидивная выживаемость снизилась до 20%). Поэтому для больных с ранним пре-В ОЛЛ, которые составляют 10-12% всех пациентов, представляется целесообразным сохранить классический 8-недельный вариант индукционного лечения. Замена II фазы индукции интенсивным блоком консолидации не привела к изменению результатов лечения комбо-ОЛЛ, который всегда относился к стандартной группе риска. Эффективность терапии комбо-ОЛЛ не изменилась за последние 10 лет, несмотря на очень существенную интенсификацию лечения. Это отчасти объясняется авторами очень высокой частотой (около 40% случаев) обнаружения при этой форме заболевания t(9;22) или bcr-abl-транскрипта. Предполагается, что для этого варианта заболевания требуются иные, может быть, принципиально новые подходы к химиотерапии (использование $INF\alpha$, гливек), поскольку даже трансплантация костного мозга не улучшила выживаемость этих пациентов [87].

Все основные программы химиотерапии ОЛЛ изложены в конце раздела.

Профилактика и лечение нейролейкемии при остром лимфобластном лейкозе

Профилактика нейролейкемии представляет собой важнейший и принципиальный этап в лечении ОЛЛ. При его отсутствии у 40-60% больных развивается поражение центральной нервной системы [47, 103]. Необходимость профилактировать это осложнение доказана еще в конце 60-х - начале 70-х годов. А возможность введения метотрексата в спинномозговой канал с оказанием им противолейкемического действия была продемонстрирована еще в конце 50-х годов. Облучение в качестве профилактики нейролейкемии было предложено сначала в небольших дозах - 500 - 1000 рад (5-10 Гр), причем выполнялось краниоспинальное облучение. Однако это оказалось неэффективным, и уже в начале 70-х годов доза облучения была повы-

шена до 2400 рад (24 Гр). При этом вероятность развития поражения центральной нервной системы снизилась с 67 до 4% [120]. Но краниоспинальное облучение оказалось очень токсичным - развивались длительные цитопении, не позволявшие осуществлять дальнейшую комплексную терапию, стали выявляться поздние осложнения как следствие облучения спинного и головного мозга (дети существенно отставали в росте и в развитии, у них наблюдались психические, эндокринные нарушения). С целью уменьшения токсичности данного подхода было предложено сочетание облучения только головы в дозе 2400 рад (24 Гр) и 5-кратного интратекального введения метотрексата в дозе 12,5 мг/м². В дальнейшем рядом исследователей было предложено вообще убрать из программ профилактики нейролейкемии облучение головы, оставив лишь интратекальные введения препаратов, причем увеличить длительность того периода, когда производятся люмбальные пункции - на протяжении всего периода поддерживающего лечения [137]. Было также доказано, что длительное введение метотрексата эндолумбально и в период поддерживающего лечения имеет преимущества и перед коротким курсом профилактики, и перед только облучением головы в дозе 2000-2500 рад (20-25 Гр) [143].

Рядом исследователей было показано, что введение трех препаратов (метотрексат, цитарабин, преднизолон) в спинномозговой канал во время всех этапов лечения ОЛЛ, причем у больных из группы высокого риска, является столь же эффективным для профилактики нейролейкемии, сколь один метотрексат (5 введений) плюс краниальное облучение (2400 рад - 24 Гр) - для больных из группы стандартного риска [144]. В 80-е годы было продемонстрировано, что возможно уменьшение дозы облучения у детей до 1800 рад (18 Гр) без снижения эффективности [113]. В это же время предложены альтернативные облучению подходы к терапии и профилактике нейролейкемии [124], например, внутривенное введение больших доз метотрексата (более 1 г/м²). В нашей стране были разработаны программы профилактики нейролейкемии, основанные на сочетанном применении краниоспинального облучения и интратекального введения трех препаратов, а затем - и только интратекальное введение метотрексата и цитозара [3].

Первая диагностическая люмбальная пункция выполняется в первый день терапии. При первой пункции обычно вводится один метотрексат в дозе 12,5 мг/м² для того, чтобы возможность развития менингизма была минимальной, так как введение двух цитостатических препаратов увеличивает вероятность появления

побочных эффектов. В дальнейшем пункции производятся с введением трех препаратов. Препараты вводятся в разных шприцах. Общий объем вводимой жидкости составляет 10-12 мл. *Для разведения используется дистиллированная вода.* Метотрексат вводится в дозе 12,5 мг/м², максимальная доза препарата составляет 15 мг, поскольку частота возникновения токсического поражения центральной нервной системы с увеличением дозы возрастает. Концентрация его в вводимом растворе - дистиллированная вода - должна составлять 1,5 мг/мл, то есть приблизительно объем вводимой жидкости с метотрексатом равен 6 мл, а при его введении следует дополнительно набрать из спинномозгового канала 2-3 мл жидкости для получения необходимой концентрации, с цитозинарабинозидом - 3 мл (доза препарата 20 мг/м²), преднизолоном - 3 мл (доза препарата 30 мг) или дексаметазона - 3 мл (в дозе 4 мг). Объем спинномозговой жидкости, которая берется для исследования, составляет 1/2 объема вводимых растворов.

Обычно первые 5 пункций осуществляются в период первой фазы индукции, когда вероятность развития глубокой цитопении существенно меньше, чем при выполнении второй фазы индукционного протокола. Также основанием к более раннему проведению первого периода профилактики нейрорлейкемии является то, что именно ранняя профилактика - в первый месяц от начала общей терапии - является наиболее эффективной. После выполнения 5 интратекальных с коротким интервалом пункций профилактическое введение трех препаратов в спинномозговой канал продолжается в дальнейшем с кратностью 1 раз в 3 месяца в течение всего времени терапии (2,5-3 года) ОЛЛ.

Определенные сложности возникают в тех случаях, когда у больных не выявляется цитоз как характерный признак поражения спинномозговых оболочек (нейрорлейкемии), но определяется так называемый интратумор - очаговое поражение вещества головного мозга или лейкомиическая инфильтрация в области выхода черепно-мозговых нервов. В данной ситуации принципиальным является целенаправленное облучение опухолевого очага, причем интратекальные введения препаратов не отменяются.

Рекомендуемая схема лечения: через день после первой же диагностической пункции, выявляющей нейрорлейкемию, производят повторно пункцию с эндолумбальным введением метотрексата в дозе 12,5 мг/м² и одновременно цитозара в дозе 5 мг. С каждой последующей пункцией доза цитозара повышается при хорошей переносимости на 10-15 мг (до 30 мг), а доза одновременно вводимого метотрексата оста-

ется 12,5 мг/м². Интервал между пункциями 2-3 дня.

Желательно выпускать из спинномозгового канала количество жидкости приблизительно *равное количеству вводимого раствора* цитостатического препарата. Введение препаратов в спинномозговой канал прекращают:

- 1) при нормальном составе спинномозговой жидкости при 3 последовательно проведенных пункциях;
- 2) при отчетливом нарастании признаков раздражения мозговых оболочек на фоне введения препаратов (при этом необходимо исключить бактериальный менингит).

В отдельных случаях при неэффективном лечении нейрорлейкемии метотрексатом и цитозаром можно использовать лучевую терапию (24 Гр за 15-18 сеансов). При сочетании нейрорлейкемии с развернутой картиной лейкоза (в отсутствие костномозговой ремиссии) терапия нейрорлейкемии проводится вместе с общим цитостатическим лечением без внутривенного введения метотрексата и без назначения его внутрь (при поддерживающем лечении в ремиссии), контроль за состоянием крови производится при этом не реже 2-3 раз в неделю.

Для лечения внутримозговых опухолей начали использовать внутривенное введение больших доз (от 300-500 мг/м² до 300-500 мг/кг) метотрексата. Препарат вводят в течение 24 ч (первая треть дозы - в течение 2 ч). Поскольку до настоящего времени не известны надежные методы лечения внутримозговых лейкомиических опухолей, в отдельных случаях может потребоваться внутривенное введение больших доз метотрексата. Такое лечение предполагает последующее применение цитроворум-фактора (лейковорин), который предотвращает осложнения, связанные с подавлением редуктазы фолиевой кислоты, вызванным метотрексатом. Цитроворум-фактор вводят внутримышечно или назначают внутрь в дозе 10 мг/м² первый раз через 2 ч, затем каждые 6 ч, 8-12 раз после введения метотрексата. Кроме того, необходимо назначение обильного щелочного питья при введении больших доз метотрексата, который вызывает отложение кальция в канальцах почек.

После лучевой профилактики нейрорлейкемии, после облучения головного мозга, введение с лечебной целью больших доз метотрексата требует особой осторожности, так как проявление его токсического эффекта в подобных случаях более вероятно. В случае лейкомиической инфильтрации спинного мозга эффективными оказываются и локальная лучевая терапия (доза облучения - 25-30 Гр) и эндолумбальное введение метотрексата и цитозара в дозах,

применяемых при поражении оболочек головного мозга.

В последние годы нам не встречались осложнения, обусловленные интратекальным введением метотрексата и цитозара, которые в прошлом - 15-20 лет назад - бывали, хотя и очень редко. Речь идет о параплегии и токсической энцефалопатии.

Параплегия при профилактике нейролейкемии у детей развивалась уже на следующий день после пункции (речь идет не о первой пункции). Доза препаратов была обычной: метотрексат - 15 мг, цитозар - 30 мг. Никакие терапевтические мероприятия не приводили к улучшению. Уровень поражения - ниже Д-8. Одновременно нарушалась и функция тазовых органов. Иными словами речь шла о поперечном миелите. Причина происходящего осталась невыясненной. Возможно, виновником был тромбоз артерии Адамкевича, которая снабжает кровью нижние отделы спинного мозга.

Дважды в 1973 г. мы столкнулись с тяжелой токсической энцефалопатией у детей с уже развившейся нейролейкемией (высокий бластный цитоз, соответствующая клиническая картина), которым по этому поводу вводились метотрексат и цитозар интратекально в обычных дозах. Надо отметить, что лечение было эффективным, цитоз ушел, но после каждого введения препаратов нарастали признаки менингизма, повышалась температура. Последнее из планировавшихся введений препаратов (должен был быть получен третий "чистый" ликвор) закончилось развитием в течение нескольких часов тяжелой энцефалопатии: головная боль, потеря сознания, высокая температура. Один ребенок - мальчик 5 лет - погиб через несколько дней. У другого - девочки 12 лет - развилась картина своеобразной декортикации: она потеряла речь, не узнавала окружающих, в том числе и ухаживающую за ней мать, дефекация и мочеиспускание были произвольными. Температура долгое время держалась фебрильной с последующим длительным периодом снижения и нормализации. Периферические параличи отсутствовали, но несколько недель не было и произвольных движений рук и ног. Примерно через 4 месяца очень медленно начало восстанавливаться сознание. Девочка стала сама кушать, потом научилась говорить. Через год основные проявления токсической энцефалопатии прошли, восстановилась память, она пошла в школу. Хотя учеба давалась с трудом, девочка закончила среднюю школу, затем стала работать. Прошло около 30 лет, рецидива острого лимфобластного лейкоза нет. Поддерживающая цитостатическая терапия не проводилась.

Возможно, в описываемом наблюдении какую-то роль сыграло то обстоятельство, что нейролейкемия у больной была диагностирована во время ее лучевой профилактики - краниального облучения. Интратекальное введение препаратов было начато немедленно. Может быть, причина описанных осложнений кроется в

некачественных препаратах тех первых лет, когда только начиналось их интратекальное введение. Такое объяснение кажется более вероятным, так как за прошедшие 25 лет мы больше не встречались с подобными явлениями.

Оглядываясь назад - программное лечение острого лимфобластного лейкоза детей мы начали в 1972 г [4] - можно поделиться впечатлениями о последствиях того вмешательства, которое выражалось в облучении головы растущих детей, во введении в позвоночный канал двух цитостатических препаратов (специальный анализ не проводился). Возможно, у маленьких детей - 4-6 лет - все-таки остаются некоторые признаки поражения мозга. Все дети учились в школе, получили среднее образование. Но у некоторых отмечалась быстрая утомляемость, плохо концентрировалось внимание, учеба давалась трудно, желания пойти в ВУЗ не возникало. Вместе с тем, одна из больных заболела в 12 лет, нормально занималась в школе на фоне поддерживающей цитостатической терапии, успешно закончила институт кинематографии, стала режиссером. Длительность наблюдения около 25 лет.

Для серьезных выводов о последствиях облучения мозга детей разного возраста, взрослых, о последствиях введения в спинномозговой канал цитостатических препаратов нужна специальная программа психологического и неврологического профиля.

Трансплантация костного мозга

Противоречивой и до сих пор нерешенной остается проблема использования трансплантации костного мозга у больных острыми лимфобластными лейкозами. ТКМ не рекомендуется применять лишь у детей с ОЛЛ из группы стандартного риска в период первой ремиссии. Речь о ТКМ в этой группе может пойти лишь при рецидиве болезни либо при резистентной форме ОЛЛ. Для взрослых с учетом многочисленных факторов риска, и прежде всего в 2 раза худших долгосрочных результатов, отрицательный ответ не столь однозначен. Анализ результатов сравнения эффективности стандартных химиотерапевтических подходов и ТКМ у больных ОЛЛ в первой ремиссии свидетельствует в большей степени в пользу химиотерапии. Аллогенная ТКМ может быть показана больным с неблагоприятными факторами риска ($t(4;11)$, значительный гиперлейкоцитоз).

Безрецидивная выживаемость больных сопоставимых групп - химиотерапия и трансплантация костного мозга - не отличается [64]. Хотя рецидивы возникают значительно реже у больных, которым выполнена аллогенная ТКМ, это нивелируется при оценке выживаемости за счет

летальности, связанной с самой процедурой ТКМ и ее осложнениями. Аналогичные данные получены при анализе результатов исследования двух крупных кооперированных групп по изучению ОЛЛ в Германии и Японии [115].

За период с 1988 по 1995 г. в 188 центрах США [15] проведено 511 аутологичных ТКМ при ОЛЛ, что составляет 2% от всего объема выполненных аутологичных трансплантаций костного мозга. Уже сама эта цифра говорит о том, что, по-видимому, данный подход не определяет основную стратегию терапии острых лимфобластных лейкозов. 5-летняя безрецидивная выживаемость больных в первой полной ремиссии составляет 42% и ничем не отличается от результатов, получаемых только с помощью химиотерапии. Тем не менее, аутологичная ТКМ, выполненная больным во второй и более ремиссии позволяет пережить 5 лет без рецидива 25% больных - показатели, которые ни разу не были достигнуты при выполнении химиотерапии, то есть в данной ситуации - при достижении ремиссии после развития рецидива - аутологичная ТКМ может быть рекомендована пациентам как терапия спасения.

Таким образом, аллогенная трансплантация костного мозга может быть однозначно рекомендована больным ОЛЛ во второй и более ремиссии, а также в первой ремиссии больным из группы с плохим прогнозом. Аутологичная ТКМ может рассматриваться в качестве целесообразного терапевтического подхода лишь у больных во второй и более ремиссии.

Рецидивы острого лимфобластного лейкоза

Большинство рецидивов при острых лейкозах являются результатом пролиферации исходного лейкоемического клона, пережившего цитостатическое воздействие. Рецидивы, возникающие еще на фоне лечения, связаны с очевидной устойчивостью опухолевых клеток к используемым цитостатическим препаратам. Это не касается тех случаев, когда у больного, которому исходно проводилась терапия ОЛЛ, констатируется рецидив, а лейкоемические клетки морфологически и иммунофенотипически относятся к острому миелоидному лейкозу. Указанная ситуация расценивается как индуцированный, вторичный острый лейкоз, который возникает вследствие цитостатического лечения ОЛЛ.

Прогностическая значимость и способы лечения рецидива определяются двумя факторами - временем рецидива (ранний или поздний, то есть длительностью полной первой ремиссии) и местом его возникновения (костномозговой или экстрамедуллярный). В общем, практически у 85-90% детей и 50-70% взрослых боль-

ных удается получить вторую полную ремиссию. Для больных ОЛЛ длительность первой ремиссии менее 18 месяцев определяет плохой прогноз, касающийся эффекта лечения и выживаемости во второй ремиссии. Если длительность первой ремиссии превысила 1,5 года или рецидив возник после снятия с лечения, то результаты противорецидивного лечения становятся вполне оптимистичными. Например, 4-летняя выживаемость детей, у которых рецидив констатирован после снятия с лечения, составила 75% в сравнении с менее 20% у тех, у кого рецидив возник еще на фоне лечения. У взрослых пациентов эти данные гораздо менее оптимистичны: ранние рецидивы не оставляют никаких шансов на длительный успех химиотерапии (нулевая 3-летняя выживаемость), а при поздних рецидивах удается получить 25% выживаемость в течение 3 лет [105].

Ранние рецидивы требуют принципиально новых агрессивных программ химиотерапии, причем в этих ситуациях по достижении второй ремиссии следует обсуждать возможность трансплантации костного мозга, желательно аллогенной. Поздние рецидивы позволяют начинать реиндукционную программу, аналогичную той, на которой была получена первая ремиссия. Тем не менее, у взрослых больных и в этом случае целесообразно рассматривать трансплантацию аллогенного костного мозга как возможный этап противорецидивного лечения.

Изолированные экстрамедуллярные рецидивы диагностируются у 10-15% больных и отличаются более благоприятным прогнозом, тем не менее в каждом случае внекостномозгового рецидива требуется проведение системного реиндукционного лечения, помимо локальной терапии (краниальное или краниоспинальное облучение, если оно не проводилось ранее или применение программ с включением высоких доз метотрексата ($1-3 \text{ г/м}^2$) и цитозин-арабинозида ($1-3 \text{ г/м}^2$), облучение яичек в дозе 2400-3000 рад, удаление опухоли яичников). У детей 5-летняя выживаемость при изолированном рецидиве в центральной нервной системе составляет 60%, в яичках - 45%.

С течением времени появляется все больше пациентов с рецидивами после проведения им аутологичной либо аллогенной ТКМ. Терапия этой категории пациентов довольно сложна, хотя в литературе отмечают вероятность достижения последующих ремиссий у 50-55% больных. Ремиссии обычно короткие.

У больных ОЛЛ с рецидивом после аллогенной ТКМ проводились инфузии лимфоцитов от донора костного мозга с целью индуцировать реакцию "трансплантат против лейкоза". Однако если при ХМЛ у 70-80% больных удается по-

сле выполнения этой процедуры добиться восстановления нормального донорского кроветворения, то при ОЛЛ эффективность данного метода оказалась очень небольшая - 25-20%. Причины этого не ясны. Предполагается что при ОЛЛ существует трудность распознавания опухолевоспецифических антигенов антигенпрезентирующими клетками.

Острый макрофагальный лейкоз

Острый макрофагальный лейкоз относится к группе макрофагальных опухолей. Эти опухоли, представленные клетками макрофагальной природы, чаще начинаются внекостномозговыми поражениями. Острый лейкоз из клеток макрофагальной природы наблюдается реже, чем хронический, и менее труден для диагностики, так как опухолевая природа макрофагальных элементов бластного типа, представляющих острый макрофагальный лейкоз, очевидна. Эти клетки отличаются атипизмом и значительным полиморфизмом бластного ядра и цитоплазмы. Моноцитарно-макрофагальная природа клеток устанавливается цитохимически с помощью тех же реакций, что и природа монобластов и моноцитов. О макрофагальной природе бластов нередко, кроме того, удается судить по косвенным признакам: они обнаруживаются в скоплениях атипичных клеток, включающих уродливые макрофаги, имеющие структурные ядра. Наряду с макрофагальными элементами в костном мозге, в увеличенной селезенке может быть повышен процент лимфоидных клеток, часть из них, как и макрофагальные клетки, дает положительную реакцию на α НЭ, подавляемую фторидом натрия.

В отличие от острого монобластного лейкоза острый макрофагальный лейкоз редко вызывает гиперплазию десен, миндалин, но гепатоспленомегалия может оказаться более частой. Инфильтрация печени при этой форме лейкоза нередко осложняется желтухой. Важнейший и постоянный признак - высокая асептическая лихорадка, иногда с ознобами. Острый макрофагальный лейкоз нередко сопровождается анемией, гранулоцитопенией.

За прошедшие годы после выхода предыдущего издания "Руководства по гематологии" (1985) мы ни разу не поставили диагноз "острый макрофагальный лейкоз". В чем дело? Этот диагноз морфологически очень прост: на фоне выраженной панцитопении в костном мозге - бластный цитоз, при том, что бласты имеют грубые черты атипизма и признаки фагоцитоза. В разделе, посвященном лимфатическим опухолям (том 2) будет сделана попытка проанализировать причины исчезновения некоторых хорошо ранее известных опухолей. Может быть, за-

гадки и нет. Ведь речь идет об очень редкой патологии.

Острый плазмобластный лейкоз

Особенностью этой формы лейкоза является способность образующих его клеток продуцировать патологические иммуноглобулины.

Плазмобластный острый лейкоз представлен в костном мозге и крови преимущественно плазмобластами, нередко атипичными и недифференцируемыми бластами с лишенной базофилии цитоплазмой, возможно, относящимися к клеткам-предшественницам; встречаются плазмциты и в крови, их процент увеличен также в костном мозге. В сыворотке крови больных обнаруживается М-градиент за счет резкого увеличения продукции лейкозными клетками моноклонального иммуноглобулина.

Острый плазмобластный лейкоз протекает с подавлением нормальных ростков гемопоэза, но нередко и с внекостномозговыми очагами лейкоэмического роста, с увеличением селезенки, лимфатических узлов, печени (собственное наблюдение).

В одном случае острого плазмобластного лейкоза мы наблюдали появление в финале болезни лейкомидов в коже, лейкоэмическую инфильтрацию яичек и тяжелое угнетение нормальных ростков кроветворения.

По клиническому развитию и ответу на терапию цитостатическими препаратами, обычно применяемыми при остром лейкозе, данный лейкоз ничем не отличается от других форм острого лейкоза.

Цитогенетически чаще всего обнаруживаются комплексные хромосомные аберрации с вовлечением 1, 7, 8, 11, 14-й и 13-й хромосом [29].

Острый плазмобластный лейкоз, в отличие от миеломной болезни, ее бластной трансформации, в частности, характеризуется следующими чертами. Он встречается у молодых людей и детей. Течение его острое. Характерных для миеломы остеолитических очагов нет. Этот очень редкий лейкоз, возможно, возникает из другого класса плазматических клеток, нежели миелома, которой, как правило, не свойственно давать пролиферацию в селезенке, тем более в лимфоузлах.

Поскольку стандартное лечение с применением одного или двух алкилирующих препаратов (алкеран, циклофосфан) в сочетании с преднизолоном позволяет добиться лишь 13% реальной 5-летней выживаемости больных, терапия данной формы острого лейкоза должна проводиться с использованием программы, рассчитанной для лечения агрессивной множественной миеломы (VAD-протокол), или высоких доз циклофосфана или этопозида. Например,

описано достижение полной ремиссии и ее сохранение в течение 2 лет после применения *высоких доз циклофосфана в качестве монотерапии* с последующей аутологичной ТКМ [129].

За последние годы мы с этим лейкозом не встречались:

Острый неклассифицируемый лейкоз

Необходимость выделения этой формы, которая, как это ясно из названия, не поддается строгой классификации, продиктована *следующими обстоятельствами. Весьма редко встречаются лейкозы, характеризующиеся присутствием в крови и костном мозге уродливых явно атипичных клеток, имеющих омоложенное ядро, но с неправильной структурой хроматина бластов. В то же время цитоплазма этих клеток ли-*

бо не имеет зернистости, либо присутствующие в ней гранулы (в том числе крупные базофильные) лишены специфических для какой-либо формы острого лейкоза особенностей. Иногда эти лейкозы протекают как малопроцентный вариант. Мы наблюдали больного, у которого на фоне панцитопении имелись единичные бласты в крови и костном мозге. Казалось бы, речь идет о малопроцентном остром лейкозе. Вместе с тем, в костном мозге был обнаружен анеуплоидный клон, составлявший основную массу делящихся клеток. Следовательно, клетки острого лейкоза в данном случае созревали нормально. Отнести этот случай к какой-либо известной форме лейкоза не удавалось. Процесс был агрессивным, не контролировался обычными при острых лейкозах цитостатиками.

НОВЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Современная стратегия химиотерапии острых лейкозов, разработанная 20-25 лет назад и претерпевшая определенные изменения в плане интенсификации, казалось бы, уже не может принципиально изменить результаты лечения ни по проценту достигаемых ремиссий, ни по долгосрочной выживаемости. Однако эффективность стандартной химиотерапии может быть повышена за счет усовершенствования тактики выхаживания пациентов после цитостатического воздействия. Вместе с тем, все современные исследования в лейкологии направлены на поиск и внедрение новых, порой не связанных с цитостатическими эффектами, способов воздействия на лейкемические клетки. Основные направления этой работы отражены в табл. 40.

Представленная в таблице информация отражает лишь те новые подходы, которые были испытаны в клинических исследованиях лекарственных препаратов I-II и даже III фазы, причем, некоторые из них уже успели завоевать право называться терапией выбора (например, полностью трансретиневая кислота в терапии острого промиелоцитарного лейкоза, трансфузии донорских лимфоцитов при рецидивах после аллогенной ТКМ).

Безусловно, не перечислены еще многие исследовательские работы и, в основном, те, которые не вышли из рамок поисковых. К ним относится, например, так называемая "вакцинация":

1) введение в организм больного собственных лейкемических клеток (аутологичная клеточная вакцина), в которые с помощью ретровирусов были введены гены определенных молекул (например, B7-1), являющихся мощными коstimуляторами Т-клеточного ответа;

2) коммитирование и культивирование, а затем введение в организм больного собственных дендритных (антигенпрезентирующих) клеток, полученных из лейкемических, с целью усиления иммунного ответа на опухолевые антигены [1, 2].

Традиционным направлением многих исследований является разработка новых цитостатических препаратов. Из перечисленных далее хотелось бы остановиться подробнее на уже сейчас занявших прочную позицию в программах химиотерапии. Чаще всего речь идет об использовании сочетаний новых и давно известных противоопухолевых средств, а не о монотерапии. Так, например, в последние годы широко и эффективно применяется у больных острыми миелоидными лейкозами из группы высокого риска (резистентные формы, рецидивы, трансформация из миелодиспластического синдрома) программа, включающая флударабин, высокие дозы цитарабина и G-CSF - ФЛАГ. Эта программа была создана на основе данных о возможности потенцировать цитостатические эффекты цитарабина с помощью G-CSF и флударабина. Именно указанное сочетание цитостатических препаратов, вводимых с определенной временной последовательностью, позволило достичь полной ремиссии у 81% больных с поздними рецидивами ОМЛ, 30% - с ранними рецидивами (в общей сложности у 50% больных с рецидивами ОМЛ), 56-74% у больных с малопроцентным лейкозом (типа РАИБт) [8, 10, 25].

Нуклеозидные аналоги завоевывают место в программах лечения не только острых миелоидных лейкозов или, тем более, хронических лимфопролиферативных заболеваний, но внушает определенный оптимизм эффективность некоторых из них при острых лимфобластных

лейкозах. Так, арабинозид-метоксигуанин (Ага-С или 506U), вводимый в дозе 40-50 мг/кг в/в 1 раз в день в течение 5 дней, позволил добиться полной ремиссии у 44 и частичной - у 32% больных с рецидивами Т-клеточного ОЛЛ [15].

Ингибиторы топоизомеразы I (топотекан, камптоцетин), аналоги платины (карбоплатин, CI-973) в сочетании с другими препаратами или в качестве монотерапии продемонстрировали незначительную эффективность в лечении

Таблица 40

Новые подходы в терапии острых лейкозов		
Подходы	Препарат	При каких формах ОЛ испытан
Новые цитостатические средства	1. Нуклеозидные аналоги: флюдарабин 506U (Ага-С)	ОМЛ ОЛЛ
	2. Ингибиторы топоизомеразы I: топотекан, камптоцетин	ОМЛ, МДС
	3. Новые формы антрациклинов: липосомальный даунорубин	ОМЛ
	4. Платиновые производные: карбоплатин, CI-973	ОМЛ
	5. Гипометилирующие средства: децитабин, 5-азацитидин	ОМЛ, МДС
Новые нецитостатические средства и их сочетания	1. Дифференцирующие средства: полностью трансретиноевая кислота (весаноид)	ОЛЛ, ОМЛ
	2. Антипролиферативный, антиангиогенный эффекты: трансретиноевая кислота + $INF\alpha$ триоксид мышьяка	ОМЛ ОЛЛ
	3. Химиопротекторы: лизифиллин	ОМЛ
	4. Реверсия MDR1-фенотипа: циклоспорин, PSC 833	ОМЛ
Биологические воздействия	1. Моноклональные антитела: HuM-195 (анти-CD33) CMA-676 (анти-CD33+calicheamicin) M195+ ^{131}I (анти-CD33+ радиактивный йод) ОКТ-3 (анти-CD 3) B43-Генистеин (анти-CD-19)	ОМЛ ОМЛ ОМЛ Т-ОЛЛ В-ОЛЛ
	2. IL-2	ОМЛ
	3. "Антисенсы": OL(1)p53, антисенсы к C-myc	ОМЛ
	1. Принцип интенсификации: трансплантация стволовых клеток периферической крови (ауто, алло)	ОМЛ высокого риска, Ph+ ОЛЛ
	2. "Трансплантат против лейкоза": трансфузии лимфоцитов донора при рецидивах после аллогенной ТКМ минитрансплантация	ОМЛ, ОЛЛ ОМЛ, ОЛЛ

резистентных форм ОМЛ - до 10% ответов [7, 12, 13, 14]. Топотекан, тем не менее, в дозе 2 мг/м² в день постоянной инфузией в 1-5-й дни позволил достичь полной ремиссии у 37% больных МДС, а в сочетании со средними дозами цитарабина - у 63% [3, 4]. Основным проявлением токсичности (помимо миелосупрессии) было поражение слизистой желудочно-кишечного тракта (67% больных). Присоединение к сочетанию цитарабина (1 г/м² в течение 2 ч на 2-6-й дни) с топотеканом (1,5 мг/м² постоянная инфузия на 2-6-й дни) циклофосфана (300 мг/м² 2

раза в день в 1-3-й дни) позволило достичь полной ремиссии у 67% больных ОМЛ, МДС (рефрактерной анемией с избытком бластов - РАИБ - и в трансформации - РАИБТ). Указанное сочетание позволяет избежать применения антрациклиновых антибиотиков, особенно у больных с высокой вероятностью развития кардиальных осложнений [9].

Анализ работ по применению гипометилирующих агентов - 5-азацитидина и 5-аза-деоксицитидина (децитабина) - позволяет сделать заключение о большей эффективности де-

цитабина. Его использование в дозе 50-75 мг/м² в виде постоянной инфузии в 1-3-й дни позволяет получить полную ремиссию у 30-37% больных с ОМЛ или МДС из группы риска [12, 32]. Использование децитабина в сочетании с антрациклинами или амсакрином приводило к полному ответу у 35% больных ОМЛ из группы риска. Хотелось бы подчеркнуть, что клинических исследований по этим препаратам еще очень мало и требуется время, чтобы реально оценить вклад каждого из них. Бесспорным является только тот факт, что эти средства обладают уникальным механизмом действия - помимо гипометилирующих эффектов (а гиперметилирование ДНК является признаком опухолевой устойчивости и прогрессии), они вызывают клеточную дифференцировку, активируют супрессорные гены и могут *in vitro* ингибировать пролиферацию клоногенных лейкоэмических клеток.

Новая лекарственная форма одного из наиболее активных цитостатических препаратов в лечении острого лейкоза - даунорубицина - *даунозом* обладает меньшими кардиотоксическими эффектами, характеризуется высокими и стабильными пиковыми концентрациями, более медленным выведением и существенно большей, чем у даунорубицина свободного, площадью под кривой, что указывает на сохранение терапевтической концентрации лекарственного средства в течение определенного периода времени. Липосомальная форма даунорубицина позволяет применять исключительно высокие дозировки антрациклина - до 150-200 мг/м² 3 дня подряд без существенных побочных эффектов [6]. Еще рано представлять статистические данные по проценту полных ремиссий, так как в основном завершены исследования I фазы как при ОМЛ, так и при ОЛЛ. Но очевидно, что фармакокинетические характеристики даунозома позволяют оценивать этот препарат как перспективный.

Из новых нецитостатических препаратов, безусловно, первостепенное, даже революционное, значение приобрела ATRA, которая радикальным образом изменила ситуацию с терапией ОПЛ. Также в рамках терапии ОПЛ внимания заслуживает *триоксид мышьяка* (As₂O₃), поскольку внутривенное применение указанного препарата, предложенного китайскими учеными, позволяет достигать полных ремиссий у больных с рецидивами ОПЛ, возникших на фоне ATRA. Доза триоксида мышьяка колеблется от 0,06 до 0,2 мг/кг в день (в ампуле содержится 10 мл, по 10 мг в 1 мл). Препарат вводится на 500 мл 5% глюкозы в течение 2-4 ч 1 раз в сутки ежедневно до достижения эффекта. Суммарные дозы мышьяка, на которых были получены полные ремиссии, составили 160-515 мг. По дан-

ным американских исследователей, из 12 пациентов с рецидивом ОПЛ у 11 была констатирована полная ремиссия, причем у 8 из 11 транскрипт PML/RAR α не определялся [30]. Так же, как и ATRA, мышьяк не оказывает цитостатического воздействия на лейкоэмические клетки, но вызывает их терминальную дифференцировку. Удивительным является и то, что, если после терапии ATRA всегда остается характерный PML/RAR α транскрипт, то на терапии мышьяком удается добиваться молекулярных ремиссий. Пока еще не проведены большие рандомизированные исследования по использованию арсеникум триоксида, и требуется еще время для оценки длительности эффектов, получаемых на этом препарате. Тем не менее, возможность без особой токсичности и глубокой миелосупрессии достигать полных ремиссий у больных ОПЛ позволяет надеяться, что в скором времени будут найдены столь же эффективные нецитостатические средства для лечения других форм острых лейкозов.

Исключительно интересным подходом в терапии острых миелоидных лейкозов является использование сочетания INF и производных ретиноевой кислоты. Эта комбинация не рассчитана на радикальные изменения результатов лечения ОМЛ, однако исключительно нетоксичное воздействие этих препаратов может привести дополнительные противолейкемические эффекты. Доказано, что INF α и препараты ретиноевой кислоты (13-цис и ATRA) обладают синергизмом в антипролиферативном, антиангиогенном и дифференцирующем действии на опухолевые клетки при ХМЛ, ОМЛ, раке кожи, молочной железы, шейки матки и других солидных опухолях [21]. Ретиноевая кислота увеличивает в лейкоэмических клетках уровень экспрессии белков, гены которых индуцируются интерфероном и которые являются регуляторами клеточной пролиферации. Одномоментное использование INF и ретиноевой кислоты ведет к потенцирующим эффектам. Ретиноевая кислота стимулирует экспрессию гена интерферонрегулирующего фактора, тем самым индуцирует секрецию клетками самого интерферона [26]. ATRA также увеличивает уровень STAT-протеинов, с активацией которых связан каскад антипролиферативных реакций [17]. Одномоментное использование INF и ATRA изменяет фармакокинетику ретиноевой кислоты таким образом, что ее концентрация в плазме не снижается ниже эффективной через 3-5 дней применения, как это отмечается при монотерапии ATRA [16]. Все эти свойства уже нашли клиническое применение в протоколах американских исследователей из Чикаго [24], которые используют сочетание этих препаратов для ингибиро-

вания феномена "быстрого возвратного роста" опухоли после цитостатического воздействия (regrowth resistance). Используются 3-дневные курсы INF+ATRA (после достижения ремиссии и после курсов химиотерапии с высокими дозами цитарабина) для ингибции преждевременной пролиферации лейкемических клеток после мощного цитостатического воздействия и затем - в качестве поддерживающего антипролиферативного лечения.

Попытки преодолеть лекарственную резистентность опухолевых клеток за счет реверсии MDR-фенотипа (высокая экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости (MDR) и соответственно Р-гликопротеина) начали осуществляться лет 15 назад. В культурах лейкемических клеток было доказано, что верапамил способен блокировать функцию Р-гликопротеина. Но оказалось что больным необходимо было вводить кардиотоксические дозы препарата, чтобы создать необходимую эффективную концентрацию его в плазме. Оптимистичные данные получены в пилотных исследованиях по применению циклоsporина и препарата PSC 833. Тем не менее, открытым остается вопрос, почему получены лучшие результаты у больных, принимавших исследуемые препараты: за счет собственно реверсии MDR-фенотипа или за счет повышения концентрации цитостатических препаратов, вводимых совместно с ними [1].

Проблематичным остается использование так называемых химиопротекторов во время цитостатического лечения острых лейкозов. Лизофиллин, являясь метаболитом пентоксифиллина, в предварительных исследованиях продемонстрировал определенную эффективность в плане уменьшения числа инфекционных осложнений у больных после выполнения аллогенной ТКМ. Небольшое пилотное рандомизированное исследование, выполненное в Центре по изучению рака М.Д. Андерсон, показало, что процент больных с серьезными инфекционными осложнениями снижается (17 против 37%, $p < 0.06$). Однако учащается рвота у больных, получавших лизофиллин, и возрастает количество мукозитов [1]. Создается впечатление, что эти подходы не найдут широкого применения и не изменят эффективность лечения острых лейкозов.

Интересным и новым может быть названо создание и применение моноклональных антител, направленных к наиболее часто встречающимся маркерам лейкемических клеток CD33 при острых миелоидных лейкозах и CD19, CD3 - при острых лимфобластных. Так, например, было продемонстрировано, что гуманизированные анти-CD33 антитела (HuM 195) могут быть использованы в лечении минимальной резидуаль-

ной болезни у больных в ремиссии острого промиелоцитарного лейкоза. После индукционной терапии у 16 из 17 больных ОПЛ обнаруживался транскрипт химерного гена - PML-RAR α . Из них у 6 (37%) после введения моноклональных антител он не определялся [11]. Применение конъюгированного с иммунотоксином (калихеамином) моноклонального анти-CD33 антитела (СМА-676) также по данным пилотного исследования I фазы дало хорошие результаты, 90% связывание с CD33-антигенами достигалось при введении этого антитела в дозе 6-9 мг/м². Терапия проводилась в указанной дозе, препарат вводился внутривенно в течение 2 ч 1 раз в день, в 1-й и 14-й дни. Получены объективные ответы у 20 из 39 больных (уменьшение процента бластных клеток в крови и костном мозге, причем, у 4 - полный ответ). В 100% случаев зафиксирована миелосупрессия [28]. Принципиально схожие результаты получены при использовании анти-CD33 антител, связанных с радиоактивным йодом, то есть у 3 из 24 больных с рецидивами ОПЛ была достигнута полная ремиссия. У всех пациентов развивалась глубокая панцитопения [27].

Значительно меньше клинических исследований проведено по применению моноклональных антител у больных ОЛЛ. Встречаются отдельные описания случаев об эффективности, например, ОКТ3 в лечении рецидива Т-клеточного лимфобластного лейкоза. Проведено одно исследование по использованию анти-CD19 антител, конъюгированных с генистеином, у пациентов с рецидивами В-клеточных ОЛЛ, клетки которых экспрессируют CD19. Из 15 пролеченных больных у 2 получена полная ремиссия, у 2 - частичная (общий ответ - 27%). Рекомендуемая доза препарата составляет 0,32 мг/кг 1 раз в день 10 дней [20]. В фазе доклинических исследований для применения при острых лейкозах находятся препараты моноклональных антител к CD20, [52], которые уже были испытаны в терапии зрелоклеточных лимфатических опухолей. С учетом того, как медленно и с недостаточной эффективностью внедряется данный способ противолейкемического воздействия, можно предположить, что он вряд ли займет принципиальное место в общей стратегии терапии острых лейкозов. Тем не менее, его необходимо рассматривать в качестве второй-третьей линии терапии, которая может предоставить возможность достижения полной ремиссии у ряда больных с рефрактерными формами острых лейкозов, и таким образом создать благоприятные условия для выполнения им более радикальных методов лечения (ТКМ).

В начале 90-х годов было опубликовано исследование о том, что введение IL-2 в высоких

дозах больным с резистентными формами ОМЛ, у которых процент бластных клеток не превышал 30%, позволяло у многих из них (у 8 из 14) достигать полной ремиссии, причем, 3-е или 4-е по счету со средней продолжительностью в 32 месяца. IL-2 вводился внутривенно в виде круглосуточной инфузии в течение 5 дней, причем, доза препарата увеличивалась с каждым днем введения с 8 до 18 млн. ед/м² в день. Затем после 72-часового перерыва 5-дневный курс возобновлялся в максимально переносимой больной дозе (max 18 млн. ед/м² в день). Всего выполнялось 4 таких курса. Затем оценивался эффект, и в случае достижения ремиссии проводились 5-дневные курсы поддерживающего лечения малыми дозами интерлейкина-2 (4-8 млн. ед/м² в день) 1 раз в месяц [19]. Дальнейшие работы, связанные с применением IL-2, были направлены на изучение роли данного цитокина в поддерживающей терапии уже после достижения ремиссии или после выполнения им аутологичной ТКМ. Результаты этих исследований обнадеживающие и свидетельствуют о том, что в одноцентровых пилотных исследованиях IL-2 увеличивал продолжительность достигнутых полных ремиссий по сравнению с таковой в контрольной группе [5, 31]. Тем не менее, пока не получены данные по проводящимся в настоящее время рандомизированным исследованиям III фазы, которые подтвердят или не подтвердят объективность предварительных результатов об эффективности терапии IL-2.

Концепция, на которой основывается терапия так называемыми "антисенсами", состоит в том, что эффекты, связанные с каждым конкретным геном, могут быть блокированы с помощью олигонуклеотидов, последовательность нуклеотидов в которых комплементарна специфической данному гену мРНК. Создание указанных олигонуклеотидов представляет сложную проблему. К настоящему времени было создано и испытано при ОМЛ лишь два "антисенса". Первый представляет собой олигонуклеотид, комплементарный мРНК десятого экзона гена p53 (OL(1)p53). Препарат вводился в виде постоянной инфузии в дозе 0,05-0,25 мг/кг/ч в течение 10 дней. Не было получено ни одного объективного ответа. Второй "антисенс" к гену C-myc вводился 18 больным с бластным кризом ХМЛ и резистентной формой ОМЛ в виде постоянной инфузии в течение 7 дней в дозе 0,3-2,0 мг/кг/день. Как и в предыдущем исследовании, практически не было получено ни одного ответа. В одном случае, правда, зафиксирован возврат к хронической фазе ХМЛ [1]. Описанные работы, очевидно, находятся в самом начале исследовательского пу-

ти, поэтому абсолютно не ясна их будущая роль в терапии острых лейкозов.

Как уже отмечалось, разработка новых подходов к лечению ОЛ связана с созданием не только новых препаратов или их сочетаний, но и с созданием новых терапевтических стратегий. За очень короткий срок такие стратегии, как трансплантация стволовых гемопоэтических клеток периферической крови в качестве консолидации ремиссии при любых вариантах острых лейкозов и трансфузия донорских лимфоцитов больным с рецидивами после аллогенной ТКМ заняли прочное место в арсенале терапевтических подходов при гемобластозах. Феномен "трансплантат против лейкоза", обуславливающий эффективность трансфузий донорских лимфоцитов, стал основой для создания нового метода выполнения трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток, так называемой минитрансплантации. Применение режимов кондиционирования, не связанных с полным уничтожением костного мозга (миелосан 4-8 мг/кг или облучение в дозе 200 рад или циклофосфан 120 мг/кг), но включающих комбинированную иммуносупрессию (флударабин, АТГ, циклоспорин, микофенолат мофетил и другие препараты), позволяет трансплантату прижиться (зафиксирован во всех случаях полный или смешанный химеризм) и реализовать эффекты "трансплантата против лейкоза" [18, 22, 29]. Существенно меньшая токсичность, связанная с процедурой ТКМ, при сохранении противоопухолевой эффективности позволяет применять указанный метод и у пожилых больных в возрасте до 70 лет, и у пациентов с тяжелым соматическим статусом, и в качестве второй аллогенной ТКМ. Не исключено, что в ближайшие годы данный способ выполнения аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток вытеснит классический, особенно, если долгосрочные результаты после его применения будут аналогичны таковым после стандартных режимов кондиционирования.

Все описанные новые подходы в терапии острых лейкозов могут рассматриваться сейчас лишь в качестве одного из этапов общей стратегии противоопухолевой терапии, но не как одного радикального метода лечения. Очевидно, и в будущем потребуется комбинированное - цитостатическое и так называемое биологическое или иммунологическое - воздействие для того, чтобы общая долгосрочная эффективность новой или новых антилейкемических стратегий позволила излечивать большинство, а не одной трети пациентов с острыми лейкозами.

Таким образом, завершая раздел об острых лейкозах, хотелось бы сказать, что современные возможности химиотерапии, транспланта-

логии, иммунотерапии и экспериментальной гематологии позволяют с оптимизмом смотреть в будущее и дают возможность уже в настоящее

время вылечить в общей сложности треть ранее абсолютно безнадежных больных в вселяет надежду на лучшие результаты.

ОСТРЫЙ ЛЕЙКОЗ У ДЕТЕЙ

Острый лейкоз у детей - наиболее частая форма злокачественных новообразований у детей, составляющая около 40% детских новообразований в развитых странах, меньше - в развивающихся. Генетические мутации в гемопоэтических клетках приводят к неконтролируемой пролиферации аномальной, самоподдерживающейся клеточной популяции, имеющей преимущество в росте над нормальным гемопоэзом. Проллиферирующие клетки не только заселяют костный мозг, но и быстро вторгаются в селезенку, печень, лимфатические узлы, висцеральные органы и мягкие оболочки мозга.

Острый лимфобластный лейкоз встречается чаще, чем острый миелобластный лейкоз и имеет тенденцию наиболее часто появляться у детей в возрасте между 2 и 6 годами. ХМЛ и ювенильный хронический миеломоноцитарный лейкоз встречаются относительно редко. За исключением крупноклеточных типов лимфосаркомы у детей являются в действительности острым лейкозом и лечатся так же. Миелодисплазия редка и наиболее часто ассоциируется с хромосомными аномалиями, возможна спонтанная ремиссия.

Причинные связи острого лейкоза ассоциируются с генетическими, вирусными, физическими и химическими факторами. Дети с широко распространенными конституциональными хромосомными нарушениями, в частности синдром Дауна, имеют высокую частоту случаев острого лейкоза, так же, как идентичные близнецы больных острым лейкозом. Ретровирусы ассоциированы с мышинной, кошачьей, бычьей лейкемией и Т-клеточным лейкозом у взрослых, но не идентифицируются с детским лейкозом. Вирус Эпштейна-Барра ассоциируется с В-клеточной лимфомой и лейкозом в Африке, но не в Европе и Северной Америке. Воздействие ионизирующей радиации увеличивает риск острого лейкоза. Ряд таких препаратов, как алкилирующие агенты и эпиподофилотоксины являются лейкозогенными для некоторых больных. Общим путем лейкогенеза является мутагенное событие на стадиях презиготы, зиготы и постзиготы, в результате чего возникает генетически поврежденная гемопоэтическая клетка, которая порождает лейкоз.

Классификация. Острый лейкоз классифицируется с учетом морфологии, цитохимии, клеточных дифференцировочных антигенов, числа и структуры хромосом и их повреждений, моле-

кулярной генетики костномозговых клеток, аспирированных из гребешка подвздошной кости. Полная классификация важна для избирательного лечения так же, как и для оценки возможных осложнений. FAB-классификация часто употребляется для описания морфологических различий, несмотря на некоторые ее недостатки, такие, как требование обнаружения 30% бластов в костном мозге для диагноза острой лейкемии, когда фактически процент часто значительно меньше.

Клинические проявления. Наиболее частые симптомы острого лейкоза - это лихорадка, анорексия, кровоизлияния на слизистых и в кожу, костные и суставные боли, усталость, частые инфекции, шейные и подмышечные опухоли, одышка, нарастающие абдоминальные опухоли и изменения в поведении. При осмотре наблюдается бледность, петехии, экхимозы, спленомегалия, гепатомегалия и увеличенные лимфоузлы. Острый лейкоз может имитировать любые детские болезни, включая ревматическую лихорадку, нефриты, менингиты и даже гиперпаратиреодизм. Лабораторное исследование обычно обнаруживает анемию, лейкопению или лейкоцитоз, нейтропению, тромбоцитопению и лейкемические клетки в мазке крови. Однако Т-клеточные ОЛЛ часто начинаются только с тимомегалии и сужения трахеи. Оба этих проявления и лейкемические папиллиты глаз являются неотложными медицинскими показателями для срочного вмешательства. Очень высокий лейкоцитоз также требует срочного лечения во избежание лейкостаза, особенно при моноцитарном лейкозе.

Лечение острого лейкоза идет наилучшим образом при использовании аккуратно составленных протоколов, которые описывают необходимое обследование и как специфическую, так и поддерживающую терапию. Поскольку по крайней мере одна треть детей с острым лейкозом умирает от болезни, даже при самом лучшем лечении, протоколы обычно усиливаются, стремясь оценить достоинства новаций, не снижая при этом возможности больных быть вылеченными. Дополнительные цели научных программ ведения протоколов - накопление информации о биологии лейкоза и фармакологии лекарств, определение путей снижения риска терапии и ее цены. Конечная цель исследований - это терапия, которая вылечит всех, не причиняя ни непосредственного, ни отдаленного

вреда и при этом так проста и недорога, что может быть обеспечена для больных независимо от места жительства и социально-экономического статуса.

Понятие «полная ремиссия» указывает, что пациент не имеет симптомов и признаков лейкоза, клинический анализ крови в пределах нормы, костный мозг соответствует нормальному гемопоэзу без признаков лейкоза. Больной считается вылеченным, если проявлений лейкемии нет в течение 7 лет, и терапия не проводится в течение 4 лет.

Специфическое лечение. Существует большое количество местных и многоцентровых протоколов лечения лейкоза, употребляемых для лечения во всем мире. Все они имеют четыре общих компонента: индукция ремиссии, консолидация или интенсификация, профилактическая менингеальная терапия и поддерживающая терапия.

Выбор препаратов и их последовательность, дозы и сроки применения варьируют в связи с типом лейкемии.

Основные принципы лечения:

1. Морфология, иммунофенотип, генотип, лекарственный метаболизм являются важными критериями в выборе лечения.
2. Прогностические факторы не определяют летальность. Любой лейкоз смертелен, лечение - это единственный положительный прогностический фактор.
3. Максимально толерантная доза наиболее эффективных синергических или суммирующих комбинаций препаратов приводит к наилучшим результатам излечения. Дозировка контролируется по числу лейкоцитов и тромбоцитов так же, как и по физическому статусу пациента.
4. Продолжительность терапии должна быть соотнесена со скоростью роста лейкоза, как при Slg^+ B-cell ALL и лимфоме.
5. Радиационная терапия, алкилирующие агенты, антрациклины и эпиподофиллотоксины являются наиболее повреждающими агентами в отношении развития вторичных опухолей и других серьезных, жизненно важных поражений.
6. Большинство детей с острым лейкозом могут быть избавлены от большинства побочных эффектов терапии без изменения вероятности выздоровления.
7. Аллогенная ТКМ имеет очень ограниченную роль в детском лейкозе.
8. Достоинство программы лечения зависит от ее простоты, дешевизны, доступности, так же, как и от ее эффективности.
9. Дети с лейкозом должны срочно направляться в региональный гематологический центр

для проведения первичного исследования и планирования лечения.

Для острого лимфобластного лейкоза из В-предшественников (ВР-ALL) индукция ремиссии с преднизолоном, винкристином, аспарагиназой, профилактическая менингеальная терапия с интратекальным метотрексатом и цитарабином, интенсификацией или консолидацией высокими дозами метотрексата и меркаптопурина, и 2-3 года поддерживающей терапии низкими дозами метотрексата и меркаптопурина очень эффективна, особенно когда ОЛЛ гипердиплоидный. При ВР-ALL с псевдодиплоидным $t(1;19)$ набором хромосом для эффективности может быть добавлен цитарабин. Для ВР-ALL с $t(9;20)$ консолидирующая терапия начинается во время индукционной фазы и надо ставить вопрос об аллогенной ТКМ. Для смешанного ВР-ALL/AML с $11q23$ (HRX) реаранжировкой добавляется этопозид и цитарабин.

При Т-клеточной форме ОЛЛ даунорубин добавляют для индукции ремиссии. Для консолидации и интенсификации более важны комбинация циклофосфамида и цитарабина. Используют также даунорубин и цитарабин с ежедневным введением аспарагиназы в течение 6 месяцев. Облучение черепа часто добавляют в качестве профилактической менингеальной терапии, если в начале лейкоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$. Метотрексат и меркаптопурин в обычных дозах не эффективны при Т-клеточном ОЛЛ; употребление очень высоких доз метотрексата внутривенно находится в стадии изучения.

Для В-клеточной формы ОЛЛ ранняя интенсивная химиотерапия с высокими дозами циклофосфамида, цитарабина, метотрексата в добавлении к обычным дозам преднизолона, винкристина и даунорубина ведет к более высокой курбельности. Лечение может быть коротким, 3-6 месяцев, если ремиссия полная. Радиотерапия на область черепа не является необходимой, даже когда менингеальная лейкемия присутствует в диагнозе.

При детском ОМЛ антрациклины, такие, как даунорубин, антипурины (метотрексат или тиогуанин), цитарабин и этопозид наиболее эффективны для индукции и поддержания ремиссии. Для острого промиелоцитарного лейкоза назначение ретиноидов перед цитотоксической терапией редуцирует риск коагулопатии и инфекции. Основной побочный эффект ретиноидов - повышение капиллярной проницаемости - может быть убран дексаметазоном и фуросемидом. При остром мегакариоцитарном лейкозе винкристин и этопозид могут употребляться, так как имеют тенденцию концентрироваться в мегакариоцитах; 4-6 месяцев лечения данного

лейкоза часто достаточно для достижения полной ремиссии. Для детей с миелодисплазией, ассоциированной с моносомией 7 и ювенильным хроническим миеломоноцитарным лейкозом, аллогенная ТКМ является терапией выбора.

В настоящее время изучается роль серийных молекулярных генетических исследований для идентификации минимальной резидуальной лейкемии, в частности, для случаев, когда имеется специфическая реаранжировка генов, такая, как BCR, ABL, выявленная в лейкозных клетках при диагностике.

Поддерживающее лечение. Значительная поддерживающая терапия необходима для профилактики и лечения различных осложнений, связанных с лейкозом. Для предотвращения инфекций необходима хорошая гигиена, особенно мытье рук членами семьи и больничным персоналом. Следует избегать необязательных инструментальных исследований, интубаций, катетеризаций, ректальных исследований, места кожных проколов для инъекций препаратов обрабатываются повидон-йодом, число госпитализаций минимизируется. Эффективна профилактика пневмоцистной пневмонии триметипринсульфаметоксазолом или диапсоном, иммуноглобулин - анти-varicella zoster модифицирует течение герпетической инфекции, если дан в первые 2-3 дня. Исследование зубов важно для определения и удаления возможных источников бактериемии. Частота осмотра больных и назначения лечения для профилактики инфекции принципиально важны, особенно когда у больного отмечаются нейтропения и лимфопения. Трансфузии гранулоцитов приносят мало или вовсе не приносят пользы. Некоторые гемопоэтические ростовые факторы могут укоротить период нейтропении и поднять число гранулоцитов, но их практическая значимость пока не доказана.

Тромбоцитопенические кровотечения обычно контролируются трансфузиями тромбоцитов, но употребление тромбоцитов имеет обратную сторону, потому что есть опасность сенсibilизации и инфекции. Переливание эритроцитов назначается при симптоматической нормоцитарной анемии. Употребляется обедненная лейкоцитами кровь, лучше облученная. Компенсация коагулопатий проводится замороженной

плазмой и концентратами тромбоцитов чаще, чем гепарином.

Для больных, у которых, кроме лейкоцитоза, имеются выраженная висцеральная инфильтрация (Т-клеточная или В-клеточная формы ОЛЛ), массивное поражение почек и при гормон-секретирующем лейкозе, метаболические проблемы становятся особенно важными. Помогают высокие объемы интравенозной жидкости без натрия, одновременно с бикарбонатом натрия и аллопуринолом, если наблюдается гиперурикемия или молочнокислый ацидоз. Сульфонат полистрена натрия употребляется при гиперкалиемии, гидроксид алюминия - при гиперфосфатемии, глюконат кальция - при гипокальциемии, преднизолон и фуросемид - при гиперкальциемии. Некоторые больные при необходимости подвергаются диализу.

Средства, употребляемые для индукционной терапии, могут вызвать метаболические нарушения. Например, преднизолон и аспаргиназа могут способствовать появлению гипергликемии, требующей инсулинотерапии. Винкристин может иногда препятствовать секреции антидиуретического гормона с гипернатриемией, что ведет к нарушению выделения жидкостей и солей. Хорошее питание важно для повышения толерантности пациента к химиотерапии и поддержания процесса роста ребенка в течение болезни. Следует избегать жирной, острой, соленой пищи, а также грубой с острыми краями. Могут быть нужны пищевые добавки.

Наконец, что не менее важно, дети нуждаются в терапии играми и помощи для интеграции в среду сверстников, в частности в школу, и семья нуждается в социальной помощи в соответствии с экономическими и местными проблемами, вызываемыми лейкозом.

Честность во взаимоотношениях с ребенком и семьей - это самое важное для того, чтобы добиться доверия и кооперации помощи. Каждый больной нуждается в районном терапевте, который руководит медицинской командой и поддерживает тесный контакт с больным и семьей. Когда смерть неизбежна, обычно лучше, чтобы больной был дома, окруженный заботой домашних и медицинской службой под руководством врача.

ПРОГРАММЫ ХИМИОТЕРАПИИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Программа	Препараты, дозы и схемы введения
1	2
CALGB (терапия без учета иммунофенотипа бластных клеток и групп риска)	Курс I: Индукция (4 недели) Циклофосфан 1200 мг/м² в/в в 1-й день (800 мг/м² для больных старше 60 лет) Даунорубицин 45 мг/м² в/в 1-й, 2-й, 3-й дни (30 мг/м² для больных старше 60 лет) Винкристин 2 мг, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Преднизолон 60 мг/м² внутрь, дни 1-21-й (1-7-й дни для больных старше 60 лет) L-аспарагиназа 6000 IU/м² подкожно, 1-й, 8-й, 11-й, 15-й, 18-й, 22-й дни Курс II: Ранняя интенсификация (4 недели, повторить 1 раз) Инtrateкально метотрексат 15 мг в 1-й день Циклофосфан 1000 мг/м² в/в в 1-й день 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь, 1-14-й дни Цитарабин 75 мг/м² подкожно, 1-4-й, 8-11-й дни Винкристин 2 мг в/в 15-й, 22-й дни L-авпарагиназа 6000 IU/м² подкожно, 15-й, 18-й, 22-й, 25-й дни Курс III: Профилактика нейролейкемии и межкурсовая поддерживающая терапия (12 недель) Краниальное облучение 2400 рад, 1-12-й дни Инtrateкально метотрексат 15 мг, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й, 29-й дни 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь, 1-70-й дни Метотрексат 20 мг/м² внутрь, 36-й, 43-й, 50-й, 57-й, 64-й дни Курс IV: Поздняя интенсификация (8 недель) Доксорубицин 30 мг/м² в/в, 1-й, 8-й, 15-й дни Винкристин 2 мг в/в, 1-й, 8-й, 15-й дни Дексаметазон 10 мг/м² внутрь, 1-14-й дни Циклофосфан 1000 мг/м² в/в, 29-й день 6-Тиогуанин 60 мг/м² внутрь, 29-42-й дни Цитарабин 75 мг/м² подкожно, 29-32-й, 36-39-й дни Курс V: Длительная поддерживающая терапия (до 24 мес от момента установления диагноза) Винкристин 2 мг в/в, в 1-й день каждой 4-й недели Преднизолон 60 мг/м² внутрь в 1-5-й дни каждой 4-й недели 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь, 1-28-й дни Метотрексат 20 мг/м² внутрь, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни
04/89 BMFT (D. Hoelzer)	I. Группа стандартного риска (общий-ОЛЛ, возраст 15-35 лет, лейкоциты менее 30x10⁹/л, ремиссия на 4-й неделе, возраст 51-65 лет) Индукция, I фаза (1-4-я недели терапии) Инtrateкально метотрексат 15 мг в 1-й день Даунорубицин 45 мг/м² в/в, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Винкристин 2 мг, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Преднизолон 60 мг/м² внутрь, 1-28-й дни (снижение на 5-й неделе) L-аспарагиназа 5000 IU/м² в/в, 15-28-й дни Индукция, II фаза (5-8-я недели терапии) Циклофосфан 650 мг/м² в/в в 1-й, 15-й, 28-й дни Цитарабин 75 мг/м² в/в, 3-6-й, 10-13-й, 17-20-й, 24-27-й дни 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь, 1-28-й дни Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Краниальное облучение 2400 рад, 1-22-й дни Ранняя консолидация (13-я, 17-я недели) Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день каждой указанной недели Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни указанных недель Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни указанных недель

Продолжение таблицы

1	2
	Реиндукция (21-26-я недели) Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг, 1-й и 28-й дни Доксорубин 25 мг/м² в/в, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Винкристин 2 мг, 1-й, 8-й, 15-й, 22-й дни Преднизолон 60 мг/м² внутрь, 1-28-й дни (снижение на 5-й неделе) Циклофосфан 650 мг/м² в/в, 28-й день Цитарабин 75 мг/м² в/в, 30-33-й, 37-42-й дни 6-Тиогуанин 60 мг/м² внутрь, 28-42-й дни Поздняя консолидация (31, 35-я недели) Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день каждой указанной недели Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни указанных недель Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни указанных недель Длительная поддерживающая терапия (до 142 недель от момента установления диагноза) 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь ежедневно Метотрексат 20 мг/м² внутрь или в/в 1 раз в неделю Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг 1 раз в 2 мес., всего 12 раз II. Группа высокого риска (ранний пре В-ОЛЛ, Ph-позитивный или bcr-abl-позитивный ОЛЛ, а если общий ОЛЛ, то возраст 36-50 лет, лейкоциты более 30x10⁹/л, ремиссия позже 4-й недели) От программы терапии больных из группы стандартного риска отличается лишь программой ранней консолидации Ранняя консолидация (13-я или 13-я, 15-я, 17-я недели в зависимости от варианта А или В) А Цитарабин 1г/м² в/в, 1-4-й дни 13-й недели Митоксантрон 10 мг/м² в/в, 2-5-й дни 13-й недели В Метотрексат 1,5 г/м² в/в, 1-й день 13-й, 15-й, 17-й недели L-аспарагиназа 10000 IU/м² во 2-й день 13-й, 15-й, 17-й недели
05/93 BMFT (D. Hoelzer)	I. Группа стандартного риска (Общий-ОЛЛ, возраст 15-35 лет, лейкоциты менее 30x10⁹/л, ремиссия на 4-й неделе, Ph- и bcr-abl негативность) Индукция (I и II фазы- 1-8-я недели) Аналогична предыдущей программе 04/89, но увеличена доза циклофосфана во II фазе до 1000 мг/м² Ранняя консолидация (13, 15, 17-я недели) Метотрексат 1,5 г/м² в/в, 1-й день 13-й, 15-й недели L-аспарагиназа 10000 IU/м² во 2-й день 13-й, 15-й недели Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни 17-й недели Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни 17-й недели Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день 13-й и 17-й недели Реиндукция (21-26-я недели) Аналогична предыдущей программе 04/89, но доза циклофосфана во II фазе увеличена до 1000 мг/м²

1	2
	Поздняя консолидация (33-я, 35-я, 39-я, 45-я, 47-я, 51-я недели) Метотрексат 1,5 г/м² в/в в 1-й день 33-й, 35-й, 45-й, 47-й недели L-аспарагиназа 10000 IU/м² во 2-й день 33-й, 35-й, 45-й, 47-й недели Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни 39-й и 51-й недели Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни 39-й и 51-й недели Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день 33-й, 39-й, 45-й, 51-й недели Длительная поддерживающая терапия (до 31-го мес. от момента установления диагноза) А 6-Меркаптопурин 60 мг/м² внутрь ежедневно Метотрексат 20 мг/м² внутрь или в/в 1 раз в неделю Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30-го мес. В Также как А-вариант, но перерывы на последней неделе 14, 16, 20, 22, 26, 28-го мес., снижение дозы 6-Меркаптопурина до 25 мг/м² и без введения метотрексата 18, 24, и 30-го мес. Циклофосфан 1000 мг/м² в 1-й день 14, 20, 26-го мес. Цитарабин 500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й день 14, 20, 26-го мес. Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни 16, 22, 28-го мес. Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни 16, 22, 28-го мес. Метотрексат 1,5 г/м² в/в, 15-й день 18, 24, 30-го мес. L-аспарагиназа 10000 IU/м² во 2-й, 16-й день 8, 24, 30-го мес. 6-Меркаптопурин 25 мг/м² внутрь, 1-5-й, 15-19-й дни 18, 24, 30-го мес. II. Группа высокого риска (общий-ОЛП при возрасте старше 35 лет, моложе 55 лет, лейкоциты более 30x10⁹/л, ремиссия на 8-й неделе, ранний пре-B, Ph- и bcr-abl позитивность) Индукция (I фаза- 1-4-я недели) Аналогична таковой в программе 04/89 Индукция (II фаза - курс НАМ - 5-я неделя) Цитарабин 3 г/м² 2 раза в день 30 мин в/в инфузия в 1-4-й дни 5-й недели Митоксантрон 10 мг/м² в/в 1 раз в день 3-5-й дни Ранняя консолидация (13-я, 15-я и 17-я недели) Метотрексат 1500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й день 13-й, 15-й недели Лейковорин: 1 введение 30 мг/м² через 18 ч после метотрексата, далее 15 мг/м² через 6 и 12 ч после первого введения L-аспарагиназа 10000 ед/м² в/в, 2-й день 13-й, 15-й недели 6-Меркаптопурин 25 мг/м² внутрь, 1-5-й дни 13-й, 15-й недели Циклофосфан 1000 мг/м² в/в в 1-й день 17-й недели Цитарабин 500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й день Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день 17-й недели Реиндукция (21-26-й недели) Аналогична таковой в для группы стандартного риска Поздняя консолидация (33-я, 39-я, 45-я, 51-я недели) Цитарабин 3 г/м² 2 раза в день 30 мин в/в инфузия в 1-4-й дни 33-й недели Митоксантрон 10 мг/м² в/в 1 раз в день, 3-5-й дни 33-й недели Метотрексат 1500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й, 15-й дни 39-й недели Лейковорин: 1 введение 30 мг/м² через 18 ч после метотрексата, далее 15 мг/м² через 6 и 12 ч после первого введения L-аспарагиназа 10000 ед/м² в/в, 2-й, 16-й дни курса 6-Меркаптопурин 25 мг/м² внутрь, 1-5-й, 15-19-й дни курса Циклофосфан 1000 мг/м² в/в в 1-й день 45-й недели Цитарабин 500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й день Тенипозид 100 мг/м² в/в 1 ч, 1-5-й дни 51-й недели Цитарабин 150 мг/м² в/в 1 ч, 1-5-й дни 51-й недели

Продолжение таблицы

1	2
	Длительная поддерживающая терапия (до 31-го месяца от момента установления диагноза) Аналогична таковой для группы стандартного риска III. Терапия Т-клеточных острых лейкозов Аналогична программе для группы стандартного риска за исключением: 1) во вторую фазу индукции (5-8-я недели) включено облучение средостения в дозе 24 Гр 2) Ранняя консолидация (13-я, 17-я, 19-я недели) Цитарабин 3 г/м² 2 раза в день 30 мин в/в инфузия, 1-4-й дни 13-й недели Митоксантрон 10 мг/м² в/в 1 раз в день 3-5-й дни 13-й недели Метотрексат 1,5 г/м² в/в в 1-й день 17, 19-й недели L-аспарагиназа 10000 IU/м² во 2-й день 17, 19-й недели 3) Поздняя консолидация (33-я, 39-я, 45-я, 51-я недели) Циклофосфан 1000 мг/м² в/в в 1-й день 33-й, 45-й недели Цитарабин 500 мг/м² 24-часовая инфузия в 1-й день 33-й, 45-й недели Цитарабин 75 мг/м² в/в, 1-5-й дни 39-й и 51-й недели Тенипозид 60 мг/м² в/в, 1-5-й дни 39-й и 51-й недели Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг в 1-й день 33-й, 39-й, 45-й, 51-й недели IV. Терапия В-зрелоклеточных острых лейкозов Терапия основывается на программах лечения В-зрелоклеточных лейкозов / лимфом у детей ALL/NHL-BFM 90 Предфаза (1-я неделя) Циклофосфан 200 мг/м² в/в, 1 ч, 1-5-й дни Преднизолон 60 мг/м² внутрь, 1-5-й дни Блок А (2-я, 8-я, 14-я недели) Винкристин 2 мг в/в 1-й день Метотрексат 3 г/м² в/в, 24-часовая инфузия (лейковорин вводится по схеме, описанной выше) в 1-й день Ифосфамид 800 мг/м² в/в 1 ч, 1-5-й дни Тенипозид 100 мг/м² в/в 1 ч, 4-й, 5-й дни Цитарабин 150 мг/м² 2 раза в день 1 ч, 4-й, 5-й дни Дексаметазон 10 мг/м² внутрь, 1-5-й дни Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг, 1-й и 5-й дни Блок В (5-я, 11-я, 17-я недели) Винкристин 2 мг в/в в 1-й день Метотрексат 3 г/м² в/в 24-часовая инфузия в 1-й день (лейковорин вводится по схеме, описанной выше) Циклофосфамид 200 мг/м² в/в 1 ч, 1-5-й дни Адриамицин (доксорубицин) 25 мг/м² в/в, 4-й, 5-й дни Дексаметазон 10 мг/м² внутрь, 1-5-й дни Инtrateкально: Метотрексат 15 мг + Цитарабин 40 мг + Дексаметазон 4 мг, 1 и 5-й дни При завершении 6 блоков больные снимаются с терапии. В случае отсутствия ремиссии после проведения А, Б, А (трех в общей сложности) блоков, выполняется программа блока С (2 раза для оценки эффекта). При достижении ремиссии на этой терапии блок с повторяется еще 2-4 раза. Эти больные являются кандидатами на выполнение аутологичной ТКМ. Блок С Виндезин 3 мг в/в в 1-й день Цитарабин 2 г/м² 3-часовая инфузия 2 раза в день, 1-й, 2-й дни Тенипозид 150 мг/м² в/в, 3-й, 4-й, 5-й дни Дексаметазон 10 мг/м² внутрь, 1-5-й дни Инtrateкельные введения не возобновляются

1	2
Hyper - CVAD (M.D. Anderson Cancer Research Center) ПР - 38-40% Медиана продолжительности ремиссии составляет 1 год (у первичных ПР в 90%, 3-летняя безрецидивная выживаемость 57%)	Программа терапии рецидивов и резистентных форм ОЛЛ (может быть использована для первичных больных) Проводится 8 курсов химиотерапии, чередующихся между собой. Длительность лечения - 6 месяцев Курсы I, III, V, VII Циклофосфамид 300 мг/м² в/в 2 раза в день, 1-3-й дни Винкристин 2 мг в/в, 4-й, 11-й дни Доксорубин 50 мг/м² в/в в 4-й день Дексаметазон 40 мг в день внутрь 1-4-й и 11-14-й дни Курсы II, IV, VI, VIII Начинается сразу после завершения I, III, V, VII, если нет депрессии кроветворения. Если есть цитопения, то с первого дня перерыва после I, III, V, VII курсов начинается введение Г-КСФ Метотрексат 1 г/м² 24-часовая инфузия в 1-й день Лейворин 15 мг/м² через 12, 18, 24 ч после метотрексата Цитарабин 3 г/м² 2 раза в день 3 ч во 2-й и 3-й дни На 4-й день начинается введение G-CSF в дозе 5 мкг/кг до восстановления показателей периферической крови (нейтрофилов более 1х10⁹/л). После нормализации анализов периферической крови возобновляется терапия - проводится курс III или V, или VII Выполнение программы без ростовых факторов сопряжено с очень высоким риском развития тяжелых осложнений
RACOP (ГНЦ РАМН) Полная ремиссия 40% 3-летняя выживаемость 10%	Программа терапии рецидивов и рефрактерных форм ОЛЛ (может быть использована в качестве консолидации у больных из группы риска) Даунорубин 45 мг/м² в/в в 1-3-й дни Цитарабин 100 мг/м² 2 раза в день 1-7-й дни Циклофосфамид 400 мг/м² 1 раз в день 1-7-й дни Винкристин 2 мг в/в, 1-й, 7-й дни Преднизолон 60 мг/м² внутрь, 1-7-й дни После проведения двух полнодозных курсов, выполняется один курс с дозой циклофосфана 200 мг/м² и одним введением винкристина, затем выполняется программа поддержания ремиссии по схеме чередования курсов 5 дневного RACOP - COAP - COMP, проводимых с интервалом в 1 месяц в течение 3 лет от момента начала терапии 5-дневный RACOP Даунорубин 45 мг/м² в/в, 1-й, 2-й дни Цитарабин 100 мг/м² 2 раза в день 1-5-й дни Циклофосфамид 200 мг/м² 1 раз в день, 1-5-й дни Винкристин 2 мг в/в в 1-й день Преднизолон 60 мг/м² внутрь, 1-5-й дни COAP Циклофосфан 400 мг м² в/в в 1-й день Винкристин 2 мг в/в в 1-й день Цитарабин 60 мг/м² 2 раза в день в/в, 1-5-й дни Преднизолон 40 мг внутрь, 1-5-й дни COMP Циклофосфан 1000 мг/м² в/в в 1-й день Винкристин 2 мг в/в в 1-й день Метотрексат 12,5 мг/м² в/в, 3-й, 4-й дни Преднизолон 100 мг внутрь, 1-5-й дни

Продолжение таблицы

1	2
HiDexa (ГНЦ РАМН) Полная ремиссия 45-48% 3-летняя безрецидивная выживаемость 30%	Программа терапии рецидивов и рефрактерных форм ОЛЛ Адриабластин (доксорубицин) 25 мг/м², 1-й, 8-й, 15-й дни Винкристин 2 мг, 1-й, 8-й, 15-й дни L-Аспарагиназа 15 тыс ед/м², 1-й, 8-й, 15-й дни Дексаметазон 50 мг/м² в/в, 1-7-й дни, затем 25 мг/м² в/в, 8-15-й дни со снижением в течение недели Если достигается ремиссия, программа повторяется 2 раза (доза дексаметазона в первую неделю 25 мг/м², во вторую - 10 мг/м²), затем начинается терапия поддержания ремиссии по программам СОАР - COMP, в которых преднизолон заменен на дексаметазон в дозе 10 мг/м² Все больные с резистентными формами и рецидивами ОЛЛ, у которых достигнута ремиссия, являются потенциальными кандидатами на выполнение ТКМ (аллогенного или аутологичного)
VAD Высокие дозы циклофосфана	Программы терапии острого плазмобластного лейкоза Винкристин 0,4 мг в день в/в 24-часовая инфузия, 1-4-й дни Адриабластин 10 мг/м² в день в/в 24-часовая инфузия 1-4-й дни Дексаметазон 40 мг в день внутрь, 1-4-й дни, 11-14-й дни Курсы повторяются по мере восстановления показателей периферической крови. Если достигнута ремиссия, терапия может продолжаться 1 год и более Циклофосфан 7 г/м² с последующим введением G-CSF в дозе 5 мкг/кг (2 курса) После проведения двух курсов ВДЦ возможно осуществление трансплантации аутологичных стволовых клеток периферической крови с последующей поддерживающей терапией интерфероном-альфа в дозе 3 млн. ед. в день подкожно через день в течение 3 лет

ПРОГРАММЫ ХИМИОТЕРАПИИ ОСТРЫХ НЕЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

1. Индукция

Программа	Препараты, дозы, схемы введения
DAT	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-7-й дни Даунорубицин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни 6-Тиогуанин 100 мг внутрь 2 раза в день, 1-7-й дни
7+3	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-7-й дни Даунорубицин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни или - Даунорубицин 60 мг/м² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни или - Митоксантрон 10 мг/м² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни или - Идарубицин 12 мг/м² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни
7+3 + VP-16	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-7-й дни Даунорубицин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни Этопозид 120 мг/м ² в/в 1 раз в день, 17-21-й дни
ADE	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-10-й дни Даунорубицин 50 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни Этопозид 100 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-5-й дни
7-3-7	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-7-й дни Даунорубицин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни Этопозид 75 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-7-й дни
TAD 9	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² круглосуточно в/в, 1-2-й дни Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 3-8-й дни Даунорубицин 60 мг/м ² в/в 1 раз в день, 3-5-й дни 6-Тиогуанин 100 мг/м ² внутрь 2 раза в день, 3-9-й дни
HiDAC-3-7	Цитозин-арабинозид 3 г/м ² в/в 2 раза в день, 1-й, 3-й, 5-й, 7-й дни Даунорубицин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни Этопозид 75 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-7-й дни

2. Консолидация

Программа	Препараты, дозы, схемы введения
MACE	Амсакрин 100 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-5-й дни Цитозин-арабинозид 200 мг/м ² в/в круглосуточно, 1-5-й дни Этопозид 100 мг/м ² внутрь 2 раза в день, 3-9-й дни
MidAC	Цитозин-арабинозид 1 г/м ² в/в 2 раза в день, 1-3-й дни Митоксантрон 10 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-5-й дни
HAM	Цитозин-арабинозид 3г/м ² в/в 2 раза в день, 1-3-й дни Митоксантрон 10 мг/м ² в/в 1 раз в день, 3-5-й дни
S-HAM	Цитозин-арабинозид 1 г/м ² в/в 2 раза в день 1-й, 3-й и 8-й, 9-й дни Митоксантрон 10 мг/м ² в/в 1 раз в день, 3-й, 4-й и 10-й, 11-й дни
HD-ARA-C	Цитарабин 3г/м ² 2 раза в день, 1-й, 3-й, 5-й, 7-й дни
DidAC	Цитозин-арабинозид 1 г/м ² в/в 2 раза в день, 1-5-й дни Даунорубин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-3-й дни

3. Поддерживающая терапия

Программа	Препараты, дозы, схемы введения
5+2	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-5-й дни, или 50 мг/м ² подкожно 2 раза в день, 1-5-й дни Даунорубин 45 мг/м ² в/в 1 раз в день, 1-2-й дни
5 + ЦФ	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-5-й дни, или 50 мг/м ² подкожно 2 раза в день, 1-5-й дни Циклофосфан 650 мг/м ² в 1-й день
5 + 6-МП	Цитозин-арабинозид 100 мг/м ² в/в 2 раза в день, 1-5-й дни, или 50 мг/м ² подкожно 2 раза в день, 1-5-й дни 6-Меркаптопурин 60 мг/м ² 2 раза в день внутрь, 1-5-й дни или 6-Тиогуанин 50 мг/м ² 2 раза в день внутрь, 1-5-й дни

Протоколы химиотерапии, связанные с ТКМ (не указываются этапы)

Исследовательская группа	Протокол
CALGB	Индукция: 7+3 (1 курс) Консолидация: HD-ARA-C (4 курса) Поддерживающая терапия: 5+2 (4 курса)
AML CG	Индукция: TAD /HAM (1 курс) Курс HAM начинается в программе двойной индукции на 21-й день от начала TAD Консолидация: 1) TAD(1 курс), S-HAM (1 курс) и снятие с лечения 2) TAD (1 курс) и поддерживающее лечение Поддерживающая терапия: чередование курсов 5+2, 5+ЦФ, 5+6+МП Поддерживающее лечение осуществляется в течение 3 лет от момента достижения ремиссии
MRC-10	Индукция: ADE (2 курса) или DAT (2 курса) Консолидация: MACE (1 курс), MidAC (1 курс) и снятие с лечения
ALSG	Индукция: 1) HidAC-3-7 (1-2 курса) 2) 7-3-7 (1-2 курса) Консолидация 1) 5-2-5 (2 курса) 2) 5-2-5 (2 курса) Поддерживающее лечение в течение 2 лет по программе цитарабин 5 дней + 6-тиогуанином
ГНЦ РАМН (01/99)	Индукция 7+3 (даунорубин 60 мг/м ²) (2 курса) Консолидация: 1) DidAC (2 курса) и снятие с лечения 2) 7+3 (даунорубин 45 мг/м ²) (2 курса) с проведением в дальнейшем поддерживающего лечения Поддерживающая терапия: 7+3 с интервалом в 6 недель, где вместо даунорубина используется 6-тиогуанин в дозе 60 мг/м ² 2 раза в день 1-3-й дни. Лечение осуществляется до 1 года от момента достижения ремиссии

Лечение рефрактерных ОНЛЛ осуществляется в зависимости от формы резистентности, из которых выделяют следующие:

- 1) резистентная форма ОНЛЛ,
- 2) ранний рецидив (продолжительность полной ремиссии менее 6 месяцев),
- 3) поздний рецидив.

Лечение поздних рецидивов может осуществляться по программам индукции используемым в лечении первичных ОНЛЛ.

Лечение резистентных форм и ранних рецидивов ОНЛЛ осуществляется по следующим программам:

- «7+3» с идарубицином (процент достижения ремиссии 40-45, продолжительность полной ремиссии составляет 6 мес.),
 - «7+3» с новантроном (процент достижения ремиссии - 40-45, продолжительность полной ремиссии у этой категории больных на фоне проведения поддерживающего лечения с этим же препаратом по программе «7+3» или «5+2» существенно (в 2 раза) превышает таковую на идарубицине).
- Используются также программы, применяемые в консолидации (с высокодозным цитарабином, новантроном, этопозидом).

Новые программы, используемые в лечении рецидивов и рефрактерных форм

Программа	Препараты
FLAG Процент достижения ремиссии: ранние рецидивы, резистентные ОМЛ - 30 поздние рецидивы 80 РАИБт - 60	Флударабин 30 мг/м ² 30-минутная инфузия 1-5-й день Цитарабин 2 г/м ² 4-часовая инфузия через 4 ч после флударабина, 1-5-й дни За день до начала курса начинается введение G-CSF в дозе 5 мкг/кг ежедневно до дня восстановления показателей периферической крови. Дальнейшая терапия может включать либо проведение аналогичного курса, либо выполнение другого курса по схеме: идарубицин 10 мг/м ² , 1-2-й дни цитарабин 2г/м ² , 1-2-й дни. Все пациенты с указанными формами ОНЛЛ, у которых достигнута ремиссия, должны рассматриваться как потенциальные кандидаты на выполнение трансплантации костного мозга (аллогенного или аутологичного)
VAC	Этопозид (Вепезид) 100 мг/м ² , 1-3-й дни Цитарабин 500 мг/м ² 1-часовая инфузия 2 раза в день, 1-3-й день Карбоплатин 150 мг/м ² в день постоянная инфузия, 1-3-й дни. Курс повторяется на 8-10 день перерыва (принцип "двойной индукции"), затем продолжается лечение в течение 1 года по схеме: Вепезид 50 мг/м ² внутрь, 1-7-й день Цитарабин 50 мг/м ² подкожно 2 раза в день, 1-7-й дни Карбоплатина 150 мг/м ² 1-часовая инфузия, 1-й день

МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ОПУХОЛИ

Под этим собирательным названием понимается группа опухолей системы крови - хронических лейкозов, которые возникают на уровне ранних предшественников миелопоэза, все потомство которых гранулоциты, моноциты, эритрокариоциты, мегакариоциты (но не лимфоциты) принадлежат к опухолевому клону. Вместе с тем при этих лейкозах в большинстве случаев безграничная пролиферация касается преимущественно какого-нибудь одного или двух

ростков, хотя при некоторых заболеваниях этой группы отмечается и трехростковая пролиферация (в таких случаях говорят о панмиелозе).

Основным заболеванием в этой группе лейкозов являются хронический миелолейкоз, сублейкемический миелоз, эритремия, хронический моноцитарный лейкоз. Они, в свою очередь, подразделяются на ряд форм, близких по патогенезу и клиническим проявлениям.

ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) является наиболее хорошо изученной молекулярной моделью лейкоза. Это опухоль, которая возникает из ранних клеток-предшественниц миелопоэза, дифференцирующихся до зрелых форм. Кле-

точный субстрат лейкоза представляют преимущественно гранулоциты, в основном нейтрофилы.

Заболевание закономерно проходит 2 стадии: развернутую доброкачественную (монокло-

новую) и терминальную злокачественную (поликлоновую).

Эпидемиология. Заболеваемость ХМЛ приблизительно одинакова во всем мире - 1,0-1,5 на 100 000 человек в год, что составляет 7-15% среди всех лейкозов взрослых. Мужчины болеют несколько чаще, чем женщины. Он редко встречается у лиц моложе 20 лет; средний возраст - 40-50 лет. У детей составляет 1,5-3% всех детских лейкозов.

Цитогенетика. Форма с филадельфийской (Ph) хромосомой ХМЛ - первая опухоль, при которой выявлена постоянная приобретенная хромосомная аномалия - Ph-хромосома.

Филадельфийская хромосома выявляется в 95% случаев ХМЛ. Она присутствует почти во всех клетках-предшественниках гранулоцитарного ряда, а также в гранулоцитах, моноцитах, эритрокариоцитах и мегакариоцитах. В 80-е годы появились сообщения о наличии Ph-хромосомы в отдельных В- и Т-лимфоцитах [Schur, 1990, Martin, 1994]. Истинной начальной стадии ХМЛ, когда только небольшая часть клеток костного мозга оказалась бы с Ph-хромосомой, а значительный процент составляли бы клетки без с Ph-хромосомы, практически обнаружить не удастся. Имеются лишь единичные сообщения [Флейшман Е.В., Волкова М.А., 1970; Brandt et al., 1976; Wayne, 1979] и собственные наблюдения [Домрачева Е.В., неопубликованные данные] о подобном малом содержании лейкозных клеток в костном мозге больных ХМЛ. Следовательно, болезнь, как правило, диагностируется на стадии тотальной генерализации опухоли по костному мозгу с обширной пролиферацией опухолевых клеток в селезенке, а часто и в печени, т.е. в *развернутой хронической стадии*. Попытка выделить начальную стадию по клиническим признакам (самочувствие больных, уровень лейкоцитоза, размеры селезенки) оказывается несостоятельной из-за ненадежности этих показателей и отсутствия их связи с прогнозом. Несмотря на то, что, казалось бы, лейкозными являются все три ростка костного мозга, безграничный рост в развернутой стадии ХМЛ, как правило, касается только одного ростка - гранулоцитарного. Реже бывает и повышенная продукция мегакариоцитов.

Развернутая стадия ХМЛ характеризуется *моноклональностью миелоидных клеток*, элементы нормального кроветворения практически вытеснены: процент клеток с Ph-хромосомой в костном мозге составляет около 98-100 [Пяткин Е.К., 1967; Флейшман Е.В., 1973]. Однако через несколько лет хромосомный анализ обнаружит единичные анеуплоидные клетки (чаще - гипердиплоидные), которые могут стать источником

новых субклонов, начинающих терминальную стадию процесса. Ph-хромосома во всех новых *кариологических клеточных вариантах* всегда сохраняется [Юргутис Р.П., 1968; Lielleyman et al., 1978]. Значительно реже встречаются случаи ХМЛ с частичным, иногда значительным сохранением нормального кроветворения, а клетки с Ph-хромосомой составляют не более 20-50%. Такой процесс развивается сравнительно медленно, с медленным нарастанием лейкоцитоза [Домрачева Е.В.]. Эффекты интерферонотерапии заставили выделять в развернутой хронической стадии раннюю хроническую - первые 12 месяцев болезни - и позднюю хроническую - до терминальной.

Картина крови в развернутой стадии характеризуется нейтрофильным лейкоцитозом, со сдвигом до миелоцитов и промиелоцитов, которые представлены единицами процентов. Красная кровь в начале болезни существенно не меняется; иногда в крови присутствуют единичные эритрокариоциты. Количество тромбоцитов в отдельных случаях может быть снижено, чаще оно нормально. В 20-30% случаев с самого начала отмечается тромбоцитоз, который может достигать высоких цифр: $1500-2000 \times 10^9/\text{л}$ и более. Без лечения лейкоцитоз неуклонно растет, количество тромбоцитов либо стабильно, либо медленно увеличивается.

Костный мозг в развернутой стадии очень богат клеточными элементами. В трепанате костного мозга отмечается почти полное вытеснение жира преимущественно гранулоцитарными клетками. При высоком тромбоцитозе много мегакариоцитов. В мазке костного мозга преобладают гранулоциты: соотношение лейко/эритро достигает 10:1, 20:1 и более в результате увеличения гранулоцитов.

Морфология клеток крови и костного мозга в развернутой стадии существенно не отличается от нормы, лишь в гранулоцитах обычно бывает скудность зернистости.

Патологический характер созревания клеток гранулоцитарного ростка в развернутой стадии хронического миелолейкоза проявляется изменением содержания азурофильных и специфических гранул, иногда их отсутствием, низким содержанием миелопероксидазы в промиелоцитах, миелоцитах и в зрелых нейтрофилах [Kass, 1982], в ряде случаев присутствием в гранулоцитах наряду с ферментами гранулоцитарного ряда ферментов моноцитарного ряда [Тихонова Л.Ю., 1981]. Снижение содержания ЩФ в зрелых нейтрофилах (иногда до нуля) является специфическим признаком ХМЛ.

В лейкоцитарной формуле, кроме омоложения состава гранулоцитов, может быть увеличен процент базофилов или эозинофилов, редко и

тех и других одновременно ("базофильно-эозинофильная ассоциация"). Кроме того, в крови могут быть единичные бластные клетки, без признаков атипии.

Культуральное изучение ХМЛ показало ряд свойственных ему регуляторных нарушений [Broxmeyer et al., 1978]. При ХМЛ очень высок уровень гистамина в сыворотке; он выше, чем при любой другой форме хронического лейкоза, происходящего из клетки-предшественницы миелопоэза [Gingold, 1978].

Одна из особенностей ХМЛ - повышенное содержание витамина B_{12} в сыворотке крови и высокая витамин B_{12} -связывающая способность сыворотки. Это повышенное содержание витамина B_{12} в сыворотке объясняют высоким уровнем транскобаламина I, одного из транспортных белков, который секретируют клетки гранулоцитарного ряда.

В пунктате увеличенной селезенки в развернутой стадии обнаруживается преобладание миелоидных клеток [Дульцин М.С., 1965].

Патологическая анатомия развернутой стадии ХМЛ характеризуется разрастанием миелоидной ткани в костном мозге с почти полным вытеснением жира в плоских костях, появлением костномозгового кроветворения в трубчатых костях (эпифиз, диафиз), разрастанием миелоидной ткани в селезенке, печени. Везде есть трехростковая пролиферация, резко преобладает гранулоцитарный росток. В костном мозге обычно несколько увеличено содержание мегакариоцитов; они встречаются и в селезенке. Лимфатические узлы в развернутой стадии болезни обычно не поражены лейкозным процессом. В отдельных случаях в костном мозге может развиваться миелофиброз, однако это чаще бывает после длительной терапии миелосаном. Терапия миелосаном довольно быстро приводит женщин к аменорее; отмечаются гипоплазия матки, атрофия ее слизистой оболочки, гипоплазия яичников. Кожа больных, особенно женщин, длительно принимавших миелосан, имеет серовато-коричневый оттенок (выраженная меланодермия). Как следствие длительной терапии миелосаном возможен пневмосклероз.

Клинически начальную стадию болезни определить не удается. Первым симптомом является нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом до миелоцитов и промиелоцитов при нормальном самочувствии больного. С нарастанием лейкоцитоза возникают потливость, слабость, повышенная утомляемость. Эти признаки обычно появляются уже при лейкоцитозе, превышающем $20-30 \times 10^9/\text{л}$. Правда, приходилось наблюдать больных, которые и при уровне лейкоцитов выше $200 \times 10^9/\text{л}$ не отмечали каких-либо неприятных ощущений, но это бывает редко.

Иногда первыми симптомами служат тяжесть и небольшая боль в левом подреберье в связи с увеличением селезенки. В прошлом ХМЛ называли "селезеночной лейкемией" (термин Вирхова), подчеркивая тем самым важнейший симптом болезни - спленомегалию. Современная ранняя диагностика лейкоза показала, что увеличение селезенки (при компьютерной томографии или эхолакации) есть почти всегда, но нередко многие месяцы и годы ее пальпировать не удается. В основе спленомегалии лежит миелоидная метаплазия в селезенке.

В развернутой стадии ХМЛ, в первую очередь, отмечается астенический синдром (слабость, утомляемость и т.п.), обусловленный повышенным клеточным распадом, который в отдельных случаях может сопровождаться ростом содержания мочевой кислоты в крови (гиперурикемия), появлением камней в почках, но может быть обусловлен и особенностями продукции гранулоцитов, например гистаминемией. При очень высоком лейкоцитозе, достигающем $500 \times 10^9/\text{л}$ и более, возможно нарушение кровообращения в первую очередь в головном мозге в связи со стазами лейкоцитов (в желудочно-кишечном тракте такие стазы могут осложниться кровотечением в связи с последующим развитием ДВС-синдрома).

В последние десятилетия в связи с успехами химиотерапии с подобными уровнями лейкоцитов при хроническом миелолейкозе встречаться почти не приходится. В развернутой стадии процесса выраженной анемии обычно нет. Также нечасто в этой стадии процесса наблюдается и тромбоцитопения. Генез этих цитопенических ситуаций не ясен. Наименее вероятен цитоллиз, так как ретикулоцитоза, увеличения числа эритрокариоцитов в костном мозге, повышения билирубина в крови или появления гемосидерина в моче при этом не наблюдается.

Если цитостатическая терапия не проводится, то болезнь постепенно прогрессирует: нарастает лейкоцитоз, увеличиваются селезенка, печень, ухудшается самочувствие (слабость, утомляемость, потливость).

Спонтанное течение хронического миелолейкоза без цитостатического лечения в последние годы практически не наблюдается. Нелеченные больные с огромной селезенкой и высоким лейкоцитозом встречаются редко.

Постепенно процесс прогрессирует. Это выражается в медленном, но неуклонном увеличении селезенки, в постепенном нарастании лейкоцитоза, требующего увеличения дозы цитостатиков, в некотором снижении показателей красной крови и тромбоцитов.

Нередко в течение хронического миелолейкоза выявляется промежуточная (переходная,

стадия акселерации), клинически характеризующаяся снижением эффективности ранее используемых препаратов, ростом лейкоцитоза, увеличением в формуле миелоцитов и промиелоцитов ("миелоцитарная деформация формулы"). В этот период хромосомный анализ выявляет появление Ph-позитивных анеуплоидных клеток, которые начинают образовывать субклон - 2-3 одинаковых типа анеуплоидии. Строго говоря, эта переходная стадия начинает формироваться с самого начала болезни, но ее выраженность нарастает постепенно, именно поэтому радикальные методы лечения требуют раннего начала.

На каком-то непредсказуемом этапе монотонно развивающаяся доброкачественная опухоль превращается в опухоль поликлоновую, злокачественную, т.е. процесс вступает в терминальную стадию. Клинически это проявляется внезапным изменением всей картины болезни: либо начинает быстро расти селезенка и в ней появляются инфаркты, либо без видимой причины повышается температура, либо появляются сильные боли в костях, либо развиваются плотные очаги саркомного роста в лимфатических узлах и т.п. Эти проявления болезни связаны с возникновением новых мутантных субклонов в рамках основного опухолевого клона, не способных к дифференцировке, но непрерывно пролиферирующих, вытесняющих исходный дифференцирующийся клон клеток. Изредка болезнь дебютирует с терминальной стадией.

Развитие терминальной стадии меняет всю клиническую и гематологическую картину болезни. Какого-либо одного обязательного симптома терминальной стадии нет, равно как нет и обязательных сочетаний признаков. Она характеризуется качественными изменениями процесса. Становятся яркими признаки опухолевой прогрессии, отсутствовавшие прежде. Обычно наступает тромбоцитопения, в ряде случаев наблюдается глубокая лейкопения, а бластоза крови еще нет. Чаще бластозу предшествует своеобразная деформация лейкоцитарной формулы - процент сегментов и палочкоядерных нейтрофилов уменьшается, но увеличивается процент миелоцитов, промиелоцитов и бластных клеток (составляющих по-прежнему единицы процентов).

Гематологические изменения в терминальной стадии чаще проявляются *бластным кризом*. Какого-то определенного уровня бластов, несомненно соответствующего терминальной стадии, нет: в очень редких случаях и в развернутой стадии содержание их может быть 5-10% и даже 15% процентов (собственное наблюдение) и сохраняться на протяжении ряда лет без каких-либо признаков изменения качества бо-

лезни. Бластный криз характеризуется нарастанием содержания бластов в костном мозге и крови. Морфология их в терминальной стадии меняется по сравнению с той, что была в развернутой стадии: появляются атипичные формы с широкой цитоплазмой, с неправильными контурами ядра и цитоплазмы.

Морфология клеток при бластном кризе отличается большим разнообразием. Они могут быть преимущественно миелобластными или лимфобластными, или миеломонобластными, или монобластными, или эритробластными (картина острого эритромиелоза), или мегакариобластными. Цитохимический анализ, как правило, позволяет идентифицировать бластные клетки, которыми представлен криз.

Бластные клетки могут содержать ферменты ранних стадий созревания гранулоцитарного ряда и одновременно ферменты моноцитарного ряда, что свидетельствует об их принадлежности к раннему потомству колониеобразующей клетки культуры (КОЕ-ГМ) до ее дифференцировки на миелобласты и монобласты [Тихонова Л.Ю., 1981]. Эритробластическую природу бластного криза можно подтвердить и морфологически, и с помощью сочетания цитогенетического анализа с цитохимическим (окраска на сидеробласты). Вместе с бластными клетками, имеющими четкие цитохимические признаки родоначальников того или иного ряда, в крови и костном мозге находят и недифференцируемые бластные элементы.

Наряду с теми случаями, когда бластный криз проходит несколько морфологических этапов, дифференцируясь из миелобластного в морфологически недифференцируемый, есть и такие, когда уже при первом появлении в терминальной стадии бластные клетки оказываются морфологически и цитохимически неидентифицируемыми.

Именно морфологически и цитохимически неидентифицируемые бласты дали основание для трактовки соответствующих случаев бластного криза как криза лимфобластоидного. Культивирование подобных лейкозных клеток в агаре и в диффузионной камере позволило установить, что в большом проценте случаев такие неидентифицируемые бласты растут в агаре и отвечают на CSF как миелоидные клетки или даже дифференцируются до более зрелых клеток гранулоцитарного ряда [Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., 1978].

В терминальной стадии иногда резко возрастает процент базофилов; они представлены преимущественно зрелыми формами или молодыми вплоть до бластных форм с зернистостью, как у базофилов. Довольно редким вариантом является моноцитарный криз - появление и на-

растание числа зрелых, молодых и атипичных моноцитов в крови и костном мозге.

В связи с нарушением костномозговых барьеров в терминальной стадии обнаруживают в крови осколки ядер мегакариоцитов (в развернутой стадии они появляются крайне редко, лишь при очень высоком уровне тромбоцитов) и много эритрокариоцитов - миелемия. Важнейшим элементом терминальной стадии независимо от ее морфологической картины является угнетение нормального кроветворения. Именно гранулоцитопения, тромбоцитопения и анемия непосредственно отягощают состояние больных.

В ряде случаев начало ее сопровождается быстрым увеличением селезенки. Ее пункция обнаруживает высокий процент бластов. Если имеется диссоциация между бластозом в селезенке и костном мозге, где содержание бластов может быть и нормальным, то обсуждаются показания к спленэктомии. В крови при этом может быть высокий бластоз результате выхода этих клеток из селезенки. Нередко симптомом терминальной стадии становится увеличение печени с развитием в ней омоложенной миелоидной ткани.

Одно из проявлений терминальной стадии - возникновение лейкемидов в коже. Как правило они представлены бластными клетками, однако встречаются (довольно редко) лейкемиды и из более зрелых гранулоцитов - промиелоцитов, миелоцитов, вплоть до сегментоядерных. Лейкемиды кожи выглядят слегка приподнимающимися над поверхностью пятнами коричневатого или розового цвета (лейкемиды из зрелых миелоидных клеток не меняют цвет кожи). Лейкемиды обычно плотной консистенции, на ощупь безболезненны. Само по себе появление лейкемидов уже определяет терминальную стадию, так как отражает появление нового субклона клеток, лишенных тканевой специфичности. Вместе с тем, зрелоклеточные лейкемиды могут долго не трансформироваться в бластные, эта трансформация вообще не обязательна. Появившиеся в одном месте бластные лейкемиды склонны к метастазированию по коже, а затем и в другие органы и системы.

В последнее время в связи с продлением жизни больных в терминальной стадии стала сравнительно часто встречаться нейрорлейкемия, клинически ни чем не отличающаяся от таковой при острых лейкозах.

Другим очагом роста клеток являются лимфатические узлы, где развиваются солидные опухоли типа сарком, в клетках которых (бластах) обнаружена Ph-хромосома. Появление саркомного лимфатического узла при ХМЛ всегда означает наступление терминальной стадии.

Очаги саркомного роста в этой стадии хронического миелолейкоза могут возникать в любом органе, вызывая нарушения его функции, а также в костной ткани.

Когда терминальная стадия начинается с развития бластов вне костного мозга, в ряде случаев удается подавить этот какое-то время локальный процесс или химиотерапией, или лучевой терапией, или спленэктомией (при изолированной локализации бластов в селезенке) и получить ремиссию, иногда длительную. Однако это не означает, что опухолевая прогрессия при ХМЛ связана с селезенкой.

Важнейшим и ранним признаком терминальной стадии и приближающегося бластного криза является развитие рефрактерности к цитостатикам. Нередко в начале они снижают количество лейкоцитов, однако остается увеличенной или даже растет селезенка или печень. В этом случае уже появляется разнокачественность лейкоцитов: одни подавляются цитостатиком, другие к нему рефрактерны. Такая своеобразная "парциальная" рефрактерность к тому или иному препарату иногда развивается до отчетливых признаков бластного криза.

В 90% случаев в терминальной стадии ХМЛ обнаруживается анеуплоидия; преобладают гипердиплоидные клоны. Терминальная стадия ХМЛ характеризуется повышенной мутабельностью лейкозных клеток, в частности, обусловленной мутацией гена P53, в норме, отправляющего мутировавшие клетки в апоптоз. В клетках развернутой стадии ХМЛ ген P53 функционирует нормально. Поэтому возникающие в лейкозном (Ph-позитивном) клоне мутации не могут привести к появлению субклона, т.к. мутировавшие клетки гибнут. По-видимому, сама по себе терминальная стадия со всеми своими особенностями является следствием мутации в родоначальной лейкозной клетке гена P53 (или функционально сходных генов, в норме контролирующих нормальный митоз, отправляющих в апоптоз - "убивающих" мутантные клетки).

Формы ХМЛ. Следует выделить ХМЛ с Ph-хромосомой у лиц старше 60 лет. Нередко он развивается медленно, больные живут долго. Неблагоприятный прогноз имеет ХМЛ с Ph-хромосомой, протекающий с тенденцией к тромбоцитопении уже в развернутой стадии или с высоким содержанием миелоцитов или базофильных клеток в периферической крови (при умеренном повышении уровня лейкоцитов). Форма ХМЛ без Ph-хромосомы встречается у детей и взрослых больных [Whang-Peng, 1968, Bousser, 1973]. Она отличается неблагоприятным течением и малой средней продолжительностью жизни больных.

ХМЛ у детей подразделяют на 2 формы - инфантильную, которая преобладает у детей моложе 3 лет, и ювенильную, встречающуюся чаще после 5 лет. Инфантильная форма ХМЛ отличается от ХМЛ взрослых рядом особенностей: отсутствует Рh-хромосома, хотя возможны иные неспецифические хромосомные аномалии, в эритроцитах значительно повышено содержание фетального гемоглобина: его уровень достигает 100% (при норме менее 2%).

В крови при инфантильной форме ХМЛ отмечаются тенденция к тромбоцитопении уже в развернутой стадии болезни, нередко моноцитоз и эритрокариоцитоз, повышение процента незрелых форм. В сыворотке и моче нередко увеличено содержание лизоцима. В клинической картине при инфантильной форме наблюдаются лимфаденопатия, тогда как селезенка нередко лишь умеренно увеличена, высыпания на лице, повышается восприимчивость к инфекции. Инфантильная форма ХМЛ течет неблагоприятно, средняя продолжительность жизни не превышает 8 месяцев.

Ювенильная форма характеризуется наличием Рh-хромосомы в миелоидных клетках; она мало отличается от ХМЛ взрослых, хотя у детей и при этой форме нередко в развернутой стадии обнаруживаются лимфаденопатия и увеличение не только селезенки, но и печени.

Лечение хронического миелолейкоза

Принципы лечения больных с вновь выявленным ХМЛ значительно изменились за последние 10 лет. До начала 80-х годов миелосан был наиболее широко используемым препаратом в лечении ХМЛ. В 60-70 % случаев удавалось добиться нормализации клеточного состава крови. Лечение позволяло уменьшить массу опухоли, улучшить качество жизни, однако её продолжительность обычно ограничивалась 3-4,5 годами. Миелосан вызывает ряд серьезных побочных эффектов, таких, как быстрое развитие климакса, легочный и костномозговой фиброз, развитие гиперпигментации, длительные миелосупрессии. В последние годы миелосан уступает место гидроксимочевине (гидреа, литалир) как препарату, обладающему наименьшим числом побочных эффектов. Назначение гидреа предпочтительно у молодых больных, которые являются кандидатами на трансплантацию костного мозга (предшествующее лечение миелосаном ухудшает результаты ТКМ). Препарат обеспечивает нормализацию клеточного состава крови в 70-80 % случаев в развернутой стадии. Однако это псевдоремиссии, поскольку Рh-хромосома обнаруживается более, чем в 90 % метафаз. Монотерапия гидреа обеспечивает эффективный контроль заболевания,

вызывает меньше побочных эффектов, чем миелосан, способствует увеличению длительности жизни. Эффективность лечения гидреа уступает эффективности $INF\alpha$, и достоверно превышает эффект миелосанотерапии. Медиана продолжительности жизни на фоне интерферонотерапии 66 месяцев, гидроксимочевинной - 56, миелосаном - 45 [Helmann et al., 1994].

Доза гидреа определяется с учетом лейкоцитоза и веса больного. При лейкоцитозе более $100 \times 10^9/\text{л}$ препарат назначается в дозе 50 мг/кг массы тела ежедневно. В дальнейшем при снижении количества лейкоцитов в крови дозу гидреа уменьшают: при лейкоцитозе $40-100 \times 10^9/\text{л}$ назначают 40 мг/кг ежедневно, при лейкоцитозе $20-40 \times 10^9/\text{л}$ - 30 мг/кг ежедневно, при лейкоцитозе $15-20 \times 10^9/\text{л}$ - 20 мг/кг ежедневно, при уровне лейкоцитов $5-15 \times 10^9/\text{л}$ - 20 мг/кг ежедневно. Прием препарата должен быть регулярным, так как при его отмене уровень лейкоцитов вновь быстро увеличивается. Исходя из предпосылки сохранения минимальной опухолевой массы, количество лейкоцитов в крови целесообразно поддерживать на уровне $3-7 \times 10^9/\text{л}$; при этом целесообразно продолжать поддерживающее лечение гидреа в дозе 10 мг/кг ежедневно (т.е. 1-2 капсулы в день).

Аллогенная ТКМ является методом, позволяющим добиваться излечения. В неконтролируемых исследованиях сообщается о длительной «безсобытийной» выживаемости у больных ХМЛ, получивших аллогенную ТКМ от HLA-идентичного донора. Пока еще остается высокой вероятность ранней летальности от осложнений ТКМ, которая составляет 20-40 %; у 15 % пациентов развивается рецидив. Как правило возраст больных ХМЛ, подлежащих ТКМ, не превышает 45-50 лет. Поскольку у 70% пациентов нет гистосовместимого донора, то только у 12-20% может быть проведена аллогенная ТКМ.

Выбор метода лечения в ранней хронической стадии ХМЛ производится непосредственно после установления диагноза. В настоящее время имеется два метода лечения, которые способствуют значительному увеличению продолжительности жизни больных. Это аллогенная ТКМ и терапия препаратами $INF\alpha$. Рандомизированных исследований по сравнительной эффективности этих двух методов нет. Алгоритм выбора лечебной тактики ХМЛ складывается из анализа преимуществ, которые обеспечивает аллогенная ТКМ и возможных осложнений, обуславливающих раннюю летальность. Результаты 5-летней выживаемости при этих двух методах лечения существенно не отличаются и составляют 60-70 % (при проведении химиотерапии 5-летняя выживаемость составляет 20-30 %). Результаты 10-летней выживаемости после ТКМ

лучше в группе больных, моложе 32 лет. У пациентов старше 32 лет результаты 10-летней выживаемости после ТКМ существенно не отличаются от результатов лечения $INF\alpha$ [Tura, 1999]. ТКМ не имеет преимуществ перед терапией препаратами $INF\alpha$ и в группе низкого риска прогрессирования заболевания. С другой стороны, у больных с промежуточным и высоким риском прогрессирования ХМЛ после 5 лет наблюдения результаты выживаемости при ТКМ достоверно лучше, чем после терапии препаратами $INF\alpha$.

При невозможности интерферонотерапии назначение цитостатической терапии целесообразно проводить с учетом категории риска: низкого, промежуточного, высокого. При низком показателе риска рекомендовано использование миелосана или гидроксимочевины. Интенсификация лечения показана при выявлении признаков прогрессирования заболевания. Лечение больных, принадлежащих к группам средней и особенно высокой категории риска, должно проводиться более интенсивными методами, в частности полихимиотерапией (AVAMP, «7+3») [Хорошко Н.Д., 1993].

Курсы полихимиотерапии (1-2) назначаются в момент установления диагноза, и затем 3-4 раза в год. В перерывах между курсами используется монохимиотерапия. Установлено, что полихимиотерапия оказывает более глубокое влияние на лейкоэмический гранулопоэз, чем монохимиотерапия. Целесообразность более интенсивных видов лечения в группе высокого риска очевидна при сравнении продолжительности заболевания у больных, которым проводилась полихимиотерапия ($Me=34,7\pm 3,8$ мес), с больными, которым применялась монохимиотерапия ($Me=20,8\pm 2,4$ мес). Преимущества более интенсивных видов лечения обнаружены в группе лиц моложе 20 лет. Больные старше 60 лет плохо переносят программы полихимиотерапии, и поэтому к ним требуется индивидуальный подход при назначении интенсивных режимов лечения.

Механизм действия $INF\alpha$ при хроническом миелолейкозе до конца не выяснен, хотя имеется ряд публикаций, посвященных его влиянию на отдельные звенья лейкозного процесса. В частности, *in vitro* показано его воздействие на клетку-предшественницу миелопоэза, что объясняет сочетанный ответ на введение препарата миелоидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения [Dowding. et al., 1991]. Предполагается не только прямое, но и опосредованное действие INF путем мобилизации иммунного ответа через Т-клетки, натуральные киллеры, макрофагальную систему и антицитотоксические антитела [Fuch E.J. et al., 1995]. Терапевтический эффект, который достигается на фоне

гранулоцитопении у больных миелолейкозом при лечении цитостатическими препаратами, отличается от такового при $INF\alpha$. Показано, что одним из механизмов воздействия $INF\alpha$ является восстановление межклеточного взаимодействия [Bhatia R. et al., 1994].

Критерии оценки эффективности терапии ХМЛ препаратами $INF\alpha$ приведены Talraz M. (1987). Так называемая гематологическая ремиссия оценивается по числу лейкоцитов периферической крови и выраженности органомегалии. Она подразделяется на полную и частичную.

Полная ремиссия характеризуется отсутствием признаков и симптомов заболевания, спленомегалии, число лейкоцитов не превышает $9 \times 10^9/\text{л}$, полная нормализация лейкоцитарной формулы, тромбоцитоз менее $350 \times 10^9/\text{л}$.

При *частичной ремиссии* уровень лейкоцитов менее $20 \times 10^9/\text{л}$, отмечается персистирующая спленомегалия. Отсутствие ремиссии характеризуется лейкоцитозом более $20 \times 10^9/\text{л}$ и/или наличием спленомегалии.

Цитогенетический ответ определяется по проценту выявляемых Ph-позитивных клеток в костном мозге. *Полный цитогенетический ответ* - отсутствие Ph-позитивных клеток; *частичный цитогенетический ответ* - процент Ph-позитивных клеток менее 35; *малый цитогенетический ответ* - число Ph-позитивных клеток колеблется от 35 до 95%; *отсутствие цитогенетического ответа* - все клетки являются Ph-позитивными.

Как показывают результаты многоцентровых исследований, проведенных в Европе и Америке, достижение большого цитогенетического ответа, т.е. снижение числа Ph-позитивных клеток менее 35% имеет определяющее значение для увеличения выживаемости. По данным Американского Центра по исследованию рака (Хьюстон), достижение большого цитогенетического ответа ассоциируется с увеличением группы больных долгожителей: 80% больных ХМЛ, у которых он достигнут к 12 месяцам переживают 10 лет [Kantarjian H.M. et al., 1998].

Анализ факторов, имеющих значение для достижения большого цитогенетического ответа и увеличения выживаемости, продемонстрировал, что результаты терапии препаратами $INF\alpha$ определяются в значительной степени характеристикой лейкоэмического процесса (стадией заболевания и распространенностью процесса), временем начала терапии, режимом введения и дозой.

Как свидетельствуют результаты многоцентровых исследований, чем раньше начато лечение $INF\alpha$, тем больше шанс добиться восстановления Ph-негативного гемопоэза. Если лече-

ние начато в развернутой стадии, в первые 12 месяцев после установления диагноза, то у 86% больных удается добиться полной гематологической ремиссии и у 84% отмечается цитогенетический ответ. При начале лечения через год и более после установления диагноза ХМЛ, цитогенетический ответ удается получить только у 10-20% пациентов. Лечение в терминальной стадии миелолейкоза препаратами $INF\alpha$ мало эффективно.

Наличие у больных таких прогностически неблагоприятных признаков, как увеличение размеров селезенки, снижение уровня гемоглобина, повышение процента бластных клеток в крови и/или в костном мозге ассоциируется с худшим ответом на лечение $INF\alpha$. У пациентов, не имеющих этих признаков и принадлежащих к категории низкого риска, значительно выше шанс для получения большого цитогенетического ответа (50%), что коррелирует с увеличением медианы выживаемости до 102 месяцев. В группе с промежуточным и высоким риском прогрессирования ХМЛ процент больных с большим цитогенетическим ответом на фоне монотерапии $INF\alpha$ составляет 30 и 20 соответственно. Включение малых доз цитозара позволяет улучшить эти показатели.

Результаты кооперированных исследований свидетельствуют, что максимальное подавление Ph-позитивных клеток клона в костном мозге отмечается при назначении $INF\alpha$ в дозе 5 МЕ/м² ежедневно. Большой цитогенетический ответ был получен у 38% больных. Ожидаемая медиана выживаемости составляет 89 месяцев [Kantarjian H.M. et al., 1998].

Опыт ГНЦ РАМН по использованию различных доз $INF\alpha$ в первый год развернутой стадии показал, что применение низких доз (3-5 МЕ через день) в сочетании с химиотерапией позволяет получить минимальный цитогенетический ответ у 33% больных и большой цитогенетический ответ у 5-7% больных. При назначении стандартной дозы $INF\alpha$ (5-10 МЕ в день) малый цитогенетический ответ отмечен у 84%, а большой - у 28% больных. Следует отметить, что в связи с высокой токсичностью у половины пациентов дозы $INF\alpha$ были снижены до 3-6 МЕ в день, что, однако, сопровождалось выраженным подавлением Ph-позитивного гемопоэза. Вероятно, это также может быть обусловлено ежедневным режимом введения $INF\alpha$. Таким образом, обсуждая дозы $INF\alpha$, необходимо отметить, что, планируемая доза составляет 5 МЕ/м² т.е. 7-10 МЕ в день. Реальная доза необходимая данному человеку, устанавливается в процессе терапии и является максимально переносимой. У отдельных больных реальные до-

зы $INF\alpha$ широко варьируют (от 3 до 10 МЕ в день) и в среднем составляют 5-6 МЕ в день.

Медиана предполагаемого ответа на терапию INF составляет приблизительно 9 месяцев. Лечение должно продолжаться столько, сколько сохраняется гематологическое улучшение и особенно цитогенетический ответ. Если цитогенетический ответ достигнут, то цитогенетические исследования необходимо проводить для уточнения его длительности. При сохранении цитогенетического ответа доза может быть снижена, но необходимо продолжать тщательное наблюдение за больными.

Обсуждается вопрос о целесообразности перехода на поддерживающее лечение через год или прекращения лечения через 2 года при сохраняющемся полном цитогенетическом ответе. Однако общепринятых обоснованных рекомендаций пока нет. Решение каждый раз принимается с учетом результатов лечения и переносимости. Наш опыт показывает, что быстрое снижение дозы (сразу после получения полного цитогенетического ответа) сопровождается увеличением процента Ph-позитивных клеток в костном мозге. Продолжение лечения позволяет поддерживать Ph-негативный гемопоэз длительно. Следует подчеркнуть, что в отличие от химиотерапии, при которой отмечалось уменьшение процента Ph-клеток в отдельные случаи на короткий промежуток времени, медиана восстановления Ph-негативного гемопоэза составляет 88 месяцев (от 6 месяцев до 11 лет). Именно выраженное подавление Ph-позитивного гемопоэза к 12 месяцам, имеет наибольшее значение для увеличения выживаемости.

Особый интерес представляют результаты наблюдения за 30 больными с полным цитогенетическим ответом, у которых лечение $INF\alpha$ было отменено через 2 года терапии после получения полного цитогенетического ответа. Оказалось, что у 20 человек определить Ph-хромосому не удавалось, однако у 10 развился гематологический или цитогенетический рецидив. Возобновление лечения позволило восстановить Ph-негативный гемопоэз у половины из этих больных. M. Talpaz (1999) высказал предположение, что около 10 % больных ХМЛ может быть излечено с помощью препаратов $INF\alpha$.

При развитии тяжелых токсических осложнений 3-4-й степени лечение $INF\alpha$ должно быть прервано; после купирования этих осложнений, лечение целесообразно возобновить, но дозу $INF\alpha$ снизить на 50 % [H. Kantarjian et al 1996]. При наличии у больного хронических токсических эффектов 2-й степени необходимо уменьшение дозы на 25%. В большинстве исследований отмечается, что лечение необходимо продолжать до лейкопении 2×10^9 /л и менее и тром-

боцитопении $50 \times 10^9/\text{л}$ и менее. После купирования миелосупрессии и повышения количества лейкоцитов более $5 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов более $100 \times 10^9/\text{л}$ лечение необходимо возобновить.

Надо ли продолжать терапию препаратами $\text{INF}\alpha$ у больных ХМЛ при отсутствии цитогенетического ответа? На сегодня нет общепринятого ответа на этот вопрос. Опыт, накопленный в ГНЦ РАМН, и результаты наблюдений немецкой группы исследователей позволяет утверждать о целесообразности включения низких доз $\text{INF}\alpha$ в сочетании с цитостатическими препаратами в комплекс лечения пациентов с ХМЛ. Следует отметить, что при этом продолжительность жизни увеличивается приблизительно на 12 месяцев. Отсутствие цитогенетического ответа в течение 12 месяцев на фоне лечения $\text{INF}\alpha$ может быть показанием к интенсификации лечения (ТКМ) или переходу к экспериментальным режимам терапии (хомохартонин, STI-571 и др.).

Для улучшения результатов лечения, полученных при использовании препаратов $\text{INF}\alpha$ предпринимались попытки комбинировать его с другими средствами (миелосаном, гидреа, циклической интенсивной химиотерапией, низкими дозами цитозара). Сочетание $\text{INF}\alpha$ с миелосаном было затруднительным из-за кумулятивного действия последнего. Комбинация $\text{INF}\alpha$ и гидреа привлекательна в клинической практике из-за удобства назначения. Этот режим обуславливает быстрый терапевтический эффект, меньшее количество побочных гиперметаболических осложнений, связанным с распадом лейкоцитов (температура, боли в мышцах, озноб), большее количество полных гематологических ремиссий, более длительный контроль заболевания.

Использование $\text{INF}\alpha$ в сочетании с низкими дозами цитозара было основано на результатах экспериментальных исследований, показавших синергизм их действия *in vitro* [Sokal J. et al., 1988]. В поздней хронической стадии ХМЛ использование малых доз цитозара в сочетании с терапией $\text{INF}\alpha$ сопровождается более высоким уровнем полных гематологических ремиссий по сравнению с монотерапией одним $\text{INF}\alpha$, с тенденцией к лучшему цитогенетическому ответу и со значительно более длительной выживаемостью. Так, по данным Kantarjian H.M. et al. (1996) использование комбинации малых доз цитозара и $\text{INF}\alpha$ в поздней хронической стадии ХМЛ позволило добиться полной гематологической ремиссии у 56 против 38% при использовании монотерапии и $\text{INF}\alpha$. Трехлетняя выживаемость составила 76 и 35% ($p < 0,01$) соответственно.

Опыт F. Guilhot и соавт. (1997), касающийся наблюдения за 721 больным ХМЛ свидетельствует, что комбинированное применение $\text{INF}\alpha$ и малых доз Ara-C способствует более выраженному по сравнению с монокимиотерапией $\text{INF}\alpha$ подавлению Ph-позитивных клеток в костном мозге у пациентов в ранней хронической стадии ХМЛ (41 против 24% при монотерапии $\text{INF}\alpha$) и сопровождается достоверным увеличением 3-летней выживаемости. Следует подчеркнуть, что комбинация $\text{INF}\alpha$ и малых доз Ara-C была наиболее эффективна в группе промежуточного риска. У больных этой группы показано увеличение частоты большого цитогенетического ответа в 3 раза (с 13 до 39%). Вместе с тем, комбинированное лечение $\text{INF}\alpha$ и Ara-C в группе пациентов низкого риска усиливало эффективность лечения по сравнению с монотерапией $\text{INF}\alpha$ лишь у небольшой группы больных (47 и 40% соответственно, $p < 0,001$). Это свидетельствует о том, что в группе больных с низким риском прогрессирования заболевания только у части пациентов целесообразно усиливать терапию. С другой стороны, в группе высокого риска прогрессирования ХМЛ комбинированное назначение $\text{INF}\alpha$ и Ara-C способствовало достоверному увеличению частоты цитогенетического ответа только на 7% (19 против 12% соответственно, $p < 0,001$).

Основываясь на ранних исследованиях Sokal и соавт., которые показали выраженное уменьшение Ph-клона при использовании длительных инфузий Ara-C $20 \text{ мг}/\text{м}^2$, предполагалось, что доза Ara-C $15 \text{ мг}/\text{м}^2$ 2 раза в день создаст такую же концентрацию препарата в крови. Однако в дальнейшем утверждение это было опровергнуто и в дальнейшем была использована доза $10 \text{ мг}/\text{м}^2$ 2 раза в день по протоколу CALGB и $20 \text{ мг}/\text{м}^2$ 1 раз в день во Французском протоколе. Интермиттирующее назначение цитозара по 10-15 дней в месяц во Французском протоколе позволяет восстановиться нормальному гемопоэзу.

Побочные эффекты $\text{INF}\alpha$ терапии условно можно разделить на ранние, к которым относятся гриппоподобный синдром (лихорадка, озноб, мышечные боли, головная боль, анорексия, тошнота, боли в пояснице, в мышцах и суставах) и поздние, возникающие при длительном лечении (различные типы нейропатии, изменение сознания, нарушение функциональных проб печени, алопеция).

Для уменьшения гиперметаболических побочных эффектов на ранних этапах лечения рекомендуется первоначально снизить количество лейкоцитов с помощью гидреа (1-3 г в день) до $10-20 \times 10^9/\text{л}$, а затем начинать терапию $\text{INF}\alpha$.

Это позволяет избежать побочных эффектов, связанных с лейколизом. Необходимо объяснить больным, что гриппоподобный синдром не опасен и обычно купируется через 7-10 дней лечения; его интенсивность можно уменьшить, назначая препарат в ночное время вместе с приемом парацетамола. Следует отметить, что пожилые люди, как правило, хуже переносят интерферонотерапию, что вызывает необходимость уменьшения дозы.

При длительном лечении $INF\alpha$ иногда наблюдаются психологическая триада: депрессия, повышенная утомляемость и бессонница. В таких ситуациях больным показано назначение небольших доз амитриптилина (12,5-50 мг) на ночь. При сохранении плохой нейропсихологической переносимости, особенно в случаях с суицидальными мыслями, лечение должно быть прервано.

Поскольку у отдельных больных описано развитие ревматоидного артрита, системной красной волчанки, гипотиреоза и нарушение функции почек, необходимо тщательное наблюдение за пациентами, имеющими сопутствующие заболевания с поражением этих органов [Guilhot F. et al., 1997]. Описаны также иммуноопосредованные осложнения: гемолитический синдром с развитием анемии. Сообщается и о случаях с развитием выраженной гипоплазии костного мозга [Хорошко Н.Д. и др., 1993; Talpaz M. et al., 1992].

Частота развития побочных эффектов при лечении $INF\alpha$, как и эффективность лечения, зависят от дозы $INF\alpha$. При назначении стандартной дозы 5 МЕ/м² в день частота возникновения побочных эффектов составляет 26-79%, что приводит к снижению дозы у 50% больных и отказу от лечения у 16-26% [Schofield et al., 1996]. Эффективность лечения низкими дозами находится в периоде исследования, частота развития побочных эффектов составляет 12%, никто из больных от лечения не отказался.

Обнадешивающие результаты с $INF\alpha$ стимулировали поиски других интерферонов или биологических агентов с возможной противолейкозной эффективностью при миелолейкозе. $INF\gamma$ отличается от $INF\alpha$ и β по своим биологическим свойствам, механизмам действия и клеточным поверхностным рецепторам. Исследование $INF\gamma$ при ХМЛ показало его весьма умеренную активность с уровнем полных гематологических ремиссий 20-30% [Kurzrock R. et al., 1987]. Комбинирование $INF\alpha$ и $INF\gamma$ в одновременных режимах с применением полных доз $INF\alpha$ и низких доз $INF\gamma$ (синергизм *in vitro*) или последовательным комбинированием чередования дней

или недель $INF\alpha$ и $INF\gamma$ существенных преимуществ не дало по сравнению с монотерапией $INF\alpha$ [Talpaz M. et al., 1987]. Попытка применить $INF\beta$ при ХМЛ оказалась неэффективной.

Суммируя сказанное, приведем рекомендации по лечению $INF\alpha$ в ранней хронической стадии ХМЛ. Лечение проводится амбулаторно. Желательно обучить больного и членов семьи правилам проведения инъекций.

Гидреа назначают для снижения количества лейкоцитов менее $10 \times 10^9/\text{л}$; возобновляют лечение при повышении количества лейкоцитов более $10 \times 10^9/\text{л}$. Препараты $INF\alpha$ применяют после нормализации количества лейкоцитов. Дозу $INF\alpha$ увеличивают постепенно: вводят подкожно 3 МЕ в день в течение первой недели, затем 5-6 МЕ в день в течение второй недели, а затем дозу увеличивают до максимально переносимой (6-10 МЕ в день). Для улучшения переносимости рекомендуют парацетамол за 30 мин до инъекции $INF\alpha$; инъекции делают в вечерние часы. Антидепрессанты показаны для купирования нейропсихологических нарушений (бессонница, депрессия, усталость).

Терапевтическое мониторирование - полный анализ крови 1 раз в неделю, а при стабилизации показателей - 2 раза в месяц. Необходимо сохранять количество лейкоцитов на уровне $2-4 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов не менее $50 \times 10^9/\text{л}$. Биохимический анализ крови выполняют ежемесячно; исследование костного мозга - каждые 6 месяцев.

При развитии тяжелой токсичности следует прервать лечение $INF\alpha$, затем возобновить инъекции $INF\alpha$ (дозу снизить на 50% от исходной). При развитии умеренной токсичности или при уровне лейкоцитов менее $3 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов менее $60 \times 10^9/\text{л}$ редуцировать дозу на 25%, а при уровне лейкоцитов менее $2 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$ - временно отменить препарат.

Достижение положительного эффекта оценивается как гематологическая ремиссия к 3-му и 6-му месяцам (необходимость приема гидреа для поддержания ремиссии) и цитогенетический ответ, при этом большой цитогенетический ответ - к 12-24-му месяцу.

Облучение селезенки долго существовало параллельно с терапией миелосаном (этот метод введен в практику Senn на 50 лет раньше миелосанотерапии - в 1903 г.). Облучение селезенки было эффективно для снижения уровня лейкоцитов в крови и уменьшении клеточности костного мозга. Изучение клеток-предшественниц миелопоза в культуре при ХМЛ до и после облучения селезенки показало снижение числа циркулирующих клеток предше-

ствениц, в частности КОЕ-ГМ [Забелина Т.С. и др., 1980; Koeffler et al., 1979]. Цитопенический эффект обнаруживается во всех трех ростках: и в гранулоцитарном, и в тромбоцитарном, и в эритроцитарном. В настоящее время облучение селезенки почти не применяется.

К спленэктомии в настоящее время прибегают только по определенным показаниям: выраженный бластоз в селезенке и выраженная спленомегалия с повторными инфарктами селезенки без признаков бластной трансформации в костном мозге, разрыв селезенки, аутоиммунная гемолитическая анемия или тромбоцитопения.

Лечение в терминальной стадии ХМЛ представляет собой весьма сложную проблему. С клинических позиций представляется целесообразным выделение двух основных вариантов бластного криза - лимфоидного и нелимфоидного. Это обусловлено тем, что у больных с лимфоидным вариантом бластного криза, в отличие от нелимфоидного, лучше отвечают на химиотерапию, включающую винкристин и преднизолон, и имеют более благоприятный прогноз.

Исследования поверхностных маркеров бластных клеток и цитохимических реакций выявили высокую корреляционную связь этих показателей в лимфобластах. Бластные клетки, экспрессирующие лимфоидные антигены CD10, CD19, имеют цитохимический маркер лимфобластов - гранулярный гликоген [Михайлова И.Н., 1995]. Клинические особенности лимфоидного варианта бластного криза ХМЛ заключаются в том, что он наблюдается чаще у лиц молодого возраста; как правило, развернутая стадия бывает короткой, бластный криз развивается внезапно, без предшествующего периода акселерации, чаще, снижение уровня гемоглобина незначительное, спленомегалия отсутствует. У этих больных в 50-70% случаев удается достичь ремиссии на фоне терапии винкристином и преднизолоном. Наилучшие результаты получены при использовании схемы Хельцера (I фаза). Медиана выживаемости пациентов лимфоидным бластным кризом составляет 10 месяцев.

При иммунологическом исследовании выявляется смешанная популяция бластных клеток, когда в крови одновременно содержатся бласты экспрессирующие как лимфоидные, так и миелоидные маркеры. Такая картина выявляется у 22 % больных. При цитохимическом исследовании обнаруживаются клетки или с лимфоидными, или с миелоидными характеристиками, иногда определяются одновременно и те, и другие. Обнаружение в крови смешанной популяции бластных клеток указывает на целесообразность включения в схемы химиотерапии пре-

паратов как лимфо-, так и миелотропного действия.

Клинико-гематологическая картина у больных с нелимфоидным бластным кризом, особенно с примитивным вариантом, при котором бластные клетки имеют фенотип стволовой клетки, характеризуются длительной переходной стадией, выраженной спленомегалией, низким уровнем гемоглобина и практически полной резистентностью к терапии. Попытки применения высоких доз противоопухолевых препаратов заканчиваются плачевно: большое количество пациентов погибает от осложнений; ремиссии, которых удается достичь, кратковременны, медиана жизни составляет 2-5 месяцев.

По результатам анализа лечения больных с бластным кризом хронического миелолейкоза, проведенным в ГНЦ РАМН, показано, что у 70% пациентов с лимфоидным вариантом бластного криза удается добиться второй хронической стадии при использовании схем лечения, обычно применяемых при остром лимфобластном лейкозе взрослых, включающих винкристин, преднизолон, рубомицин с или без добавления L-аспарагиназы. Применение более агрессивных схем (высокие дозы цитозара в дозе 3,0 г/м² каждые 12 ч или высокие дозы цитозара в сочетании с L-аспарагиназой, этопозидом или даунорубицином) приводят к развитию большого количества осложнений и высокой ранней летальности [Herzing et al., 1984]. G. Lambertenghi-Delilieri et al. (1991) применили идарубицин в дозе 12 г/м² внутривенно в течение 3 дней с последующим введением цитозара 120 г/м² в виде часовой инфузии ежедневно с 4-го по 10-й день. Ни у одного из 3 больных не отмечено положительного эффекта; две из них умерли от аплазии кроветворения. Таким образом, проведение менее агрессивной, более щадящей терапии позволяет достичь лучших результатов, чем при использовании более агрессивных схем.

Больным, достигшим второй хронической стадии, необходимо провести профилактику нейрорлейкемии (по схемам лечения больных острым лимфобластным лейкозом). Вопросы поддерживающей терапии во второй хронической стадии хронического миелолейкоза остаются неразработанными. Необходимо учитывать, что эта стадия имеет плохой прогноз, поэтому таким больным показаны повторные курсы химиотерапии (по схемам COAP, AVAMP) 1 раз в 2-3 месяца с постоянным приемом в перерывах 6-меркаптопурина, или ежедневно 6-меркаптопурина с еженедельным приемом метотрексата. Продолжительность бластного криза у них составляет 15-18 месяцев (медиана 10 месяцев).

При нелимфоидных вариантах бластного криза результаты лечения значительно хуже. Проведение курсовой полихимиотерапии позволяет несколько увеличить продолжительность жизни у ответивших больных. Проведение химиотерапии винкристином и преднизолоном в данной группе не эффективно. Несколько лучшие результаты получены при использовании схем «7+3» (цитозар и рубомицин или идарубицин).

Учитывая данные иммунофенотипических исследований, показавших линейную и межлинейную гетерогенность бластных клеток при бластном кризе миелолейкоза, что обуславливает высокую частоту смешанных вариантов бластного криза, следует считать целесообразным включение в схемы лечения препараты как лимфо- так и миелотропного действия (схемы полихимиотерапии POMP, COAP, TRAMPCOL). Вероятность восстановления хронической стадии у этих больных составляет 7-20%, а медиана бластного криза 2-5 месяцев. После проведения 2-3 курсов полихимиотерапии при резистентности к лечению, вероятно, целесообразно назначение относительно безвредного лечения, такого, как гидреа в больших дозах для сдерживания прогрессирующего увеличения опухолевой массы и обеспечения возможности амбулаторного пребывания больного столько, сколько возможно.

Применение ТКМ от HLA-совместимого родственного донора в фазе акселерации обеспечивает безрецидивную 5-летнюю выживаемость у 30-50% больных. В периоде бластного криза она, как правило, не эффективна, вероятность ранней летальности значительно увеличивается, а вероятная 5-летняя выживаемость составляет 0-10%.

В настоящее время продолжается поиск **новых программ лечения ХМЛ**, которые позволили бы обеспечить максимальное подавление Ph-позитивного клона с целью увеличения выживаемости. Они включают применение интенсивной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток, исследование новых препаратов, таких, как хомохаррингтонин (homoharringtonine) и STI-571 (синтетический ингибитор ABL тирозин-киназы).

Хомохаррингтонин - растительный алкалоид, проявивший незначительную активность при остром миелобластном лейкозе, но при этом вызвавший тяжелые кардиотоксические последствия. При изменении режима введения, уменьшении дозы и увеличении длительности инфузии был получен выраженный антипролиферативный эффект, в то время как кардиотоксический эффект практически отсутствовал. Хомохаррингтонин был применен в поздней

хронической стадии в дозе 2,5 мг/м² путем постоянной внутривенной инфузии в течении 14 дней до получения ремиссии, а затем по 7 дней в месяц для поддержания ремиссии. Полная гематологическая ремиссия была получена у 50 (72%) больных и у 30% был получен цитогенетический ответ (который был расценен как большой у 15%). Следует отметить, что 58% из них были резистентны к INF α [Brien et al., 1995]. Получив эти обнадеживающие результаты, авторы предприняли попытку лечения хомохаррингтонином (6 курсов) с последующим поддерживающим лечением INF α . Среди 90 больных ХМЛ, леченных в развернутой стадии (не более 12 месяцев с момента установления диагноза), полная гематологическая ремиссия после 6 курсов хомохаррингтонина была получена в 92% случаев, а цитогенетический ответ в 68% (большой в 27%) [Brien et al., 1995]. Отсроченные результаты также являются обнадеживающими: 3-летняя выживаемость при сочетанном назначении хомохаррингтонина больше, чем при монотерапии INF α .

Специфический ингибитор ABL тирозин-киназы CGP 57148 (STI 571) для лечения больных ХМЛ, рефрактерных к INF α . Начало исследований относится к 1980 г., когда была выделена смесь веществ, оказывающая ингибирующее действие на тирозин-киназу. В 1996 г. Druker B.J синтезировал специфический ингибитор ABL тирозин киназы CGP 57148. В исследованиях *in vitro* показано, что CGP 57148 ингибировал все ABL тирозин-киназы (p210^{BCR-ABL}, p185^{BCR-ABL}, v ABL) в субмикромольных концентрациях и не оказывал ингибирующего действия на другие тирозин и серин/трионин киназы (за исключением фактора роста тромбоцитов и c-kit киназы). В опытах на клеточных линиях отмечено преимущественное угнетение роста BCR-ABL-позитивных колоний. В опытах на крысах и на собаках установлено, что CGP 57148 является высоко биодоступным препаратом при назначении *per os*, и определены максимально переносимые токсические концентрации (6-100 мг/кг). I фаза клинических исследований начата по разрешению FDA с июня 1998 г. у больных, резистентных к INF α , которым не разрешалось принимать другие цитостатические препараты.

Установлено, что STI 571 высоко биодоступный препарат при однократном приеме *per os*. Период полувыведения составляет 13-19 ч. При дозе 250 мг в день через 3 ч достигается терапевтическая концентрация. Исследованы различные дозы STI 571 (25-300-500 мг) и показано, что наиболее эффективная доза 300 мг и более (максимально переносимая доза не установлена). Tyler et al. (1998) выявили синергизм с ARA-C и с INF α . Лечение 31 больного хроническим

миелолейкозом, резистентным к INF- α STI 571 в дозе 300 мг и более, позволило получить гематологическую ремиссию в 100 % случаев и малый цитогенетический ответ у 45%, большой - 10%. Максимальная продолжительность лечения - 18 месяцев. Побочные эффекты были крайне незначительны: легкая тошнота, мышечные боли, отеки. Таким образом, на сегодняшний день можно сделать вывод, что лечение это высоко специфично и минимально токсично.

Аутотрансплантация костного мозга. Установления факта наличия у больных в развернутой стадии ХМЛ Ph-негативных костномозговых предшественников имело принципиальное значение в разработке программ интенсивной терапии на ранних этапах диагностики развернутой стадии ХМЛ, так как именно у этих больных в дальнейшем удастся получить лучшие результаты. Цель различных протоколов аутотрансплантации является получение Ph-негативных костномозговых предшественников и с их помощью восстановление Ph-негативного гемопоэза после миелоаблативной терапии. Однако такая процедура, когда она производится в ранние после диагностики сроки, оказывается в состоянии восстановить полностью Ph-негативный гемопоэз у 60-70% пациентов [Frassoni et al 1996]. Хотя у большинства больных вновь появляются Ph-позитивные клетки, значительная часть больных поддерживает мозаицизм Ph-позитивных/Ph-негативных клеток. В настоящее время можно отметить, что подобные попытки позволяют лишь несколько увеличить продолжительность жизни больных ХМЛ.

Итак, интерферонотерапию следует считать методом выбора в лечении больных с развернутой стадией ХМЛ в период установления диагноза. Важно назначение препарата как можно ранее после установления диагноза и в адекватной дозе. При отсутствии гематологического и цитогенетического ответа через 6-12 месяцев, к лечению целесообразно добавить малые дозы цитозара. Терапия INF α у больных в терминальной стадии не эффективна. У молодых больных, имеющих HLA-совместимого донора, альтернативным методом лечения остается трансплантация костного мозга.

Прогноз при ХМЛ. В ГНЦ РАМН в течение многих лет проводятся работы по анализу неблагоприятных прогностических факторов прогрессирования ХМЛ [Хорошко Н.Д., 1992]. В одной из последних работ проанализированы показатели гемо- и миелограммы до начала лечения у 340 больных ХМЛ, наблюдавшихся с 1975 по 1997 гг.

При составлении прогностической модели были выбраны показатели, которые характеризуют распространенность процесса и его каче-

ство, а именно размер селезенки характеризует массу опухоли; уровень гемоглобина позволяет оценить степень подавления других ростков гемопоэза; количество бластных клеток в крови и костном мозге указывают на степень нарушения дифференцировки клеток. Увеличение числа эозинофилов достоверно связано с выживаемостью и имело независимое прогностическое значение.

Многофакторный анализ неблагоприятных прогностических признаков в период установления диагноза показал, что наиболее значимы следующие признаки: гемоглобин менее 100 г/л, бластные клетки в крови и/или в костном мозге 3% и более, увеличение размеров селезенки + 5 см от края реберной дуги и более, количество эозинофилов в крови более 4%. К категории низкого риска отнесены больные, не имеющие ни одного неблагоприятного признака, промежуточного - 1-2 признака и высокого - 3 и более. Медиана продолжительности жизни в зависимости от категории риска составила 75, 47, и 15 месяцев соответственно [Туркина А.Г., 1998].

Статистический анализ показал, что наличие у больного при установлении диагноза в крови и в костном мозге бластов 15% и более, (но менее 30%), бластов + промиелоциты 30% и более (но при условии что, бласты менее 30%), базофилов 20% и более, тромбоцитопении, не обусловленной лечением менее $100 \times 10^9/\text{л}$, и дополнительных хромосомных аномалий свидетельствует о неблагоприятном прогнозе ХМЛ и позволяет диагностировать начало терминальной стадии [Kantarjian, 1993]. В таких случаях проведение терапии препаратами INF α мало эффективно и необходимо начинать лечение с более интенсивных режимов.

Одним из важнейших факторов, индивидуального прогноза является ответ больного на лечение. Достижение гематологической ремиссии в течение 3-6 месяцев и большого цитогенетического ответа к 12-му месяцу свидетельствует о благоприятном прогнозе и возможности полного восстановления Ph-негативного гемопоэза. Отсутствие выраженного подавления Ph-позитивных клеток в костном мозге к 12-му месяцу лечения (менее 65%) делает мало вероятным возможность полного восстановления Ph-негативного гемопоэза и в ряде случаев можно ставить вопрос об интенсификации лечения (ТКМ). Терапия INF α значительно улучшила прогноз больных в различных группах риска, что вызвало необходимость пересмотра старых прогностических моделей и привело к созданию новой синтетической модели (Hasford et al., 1996). С другой стороны, только оценив лечение INF α в течение первых 6-12 месяцев можно судить об эффективности лечения у данного больного и более точно определить прогноз.

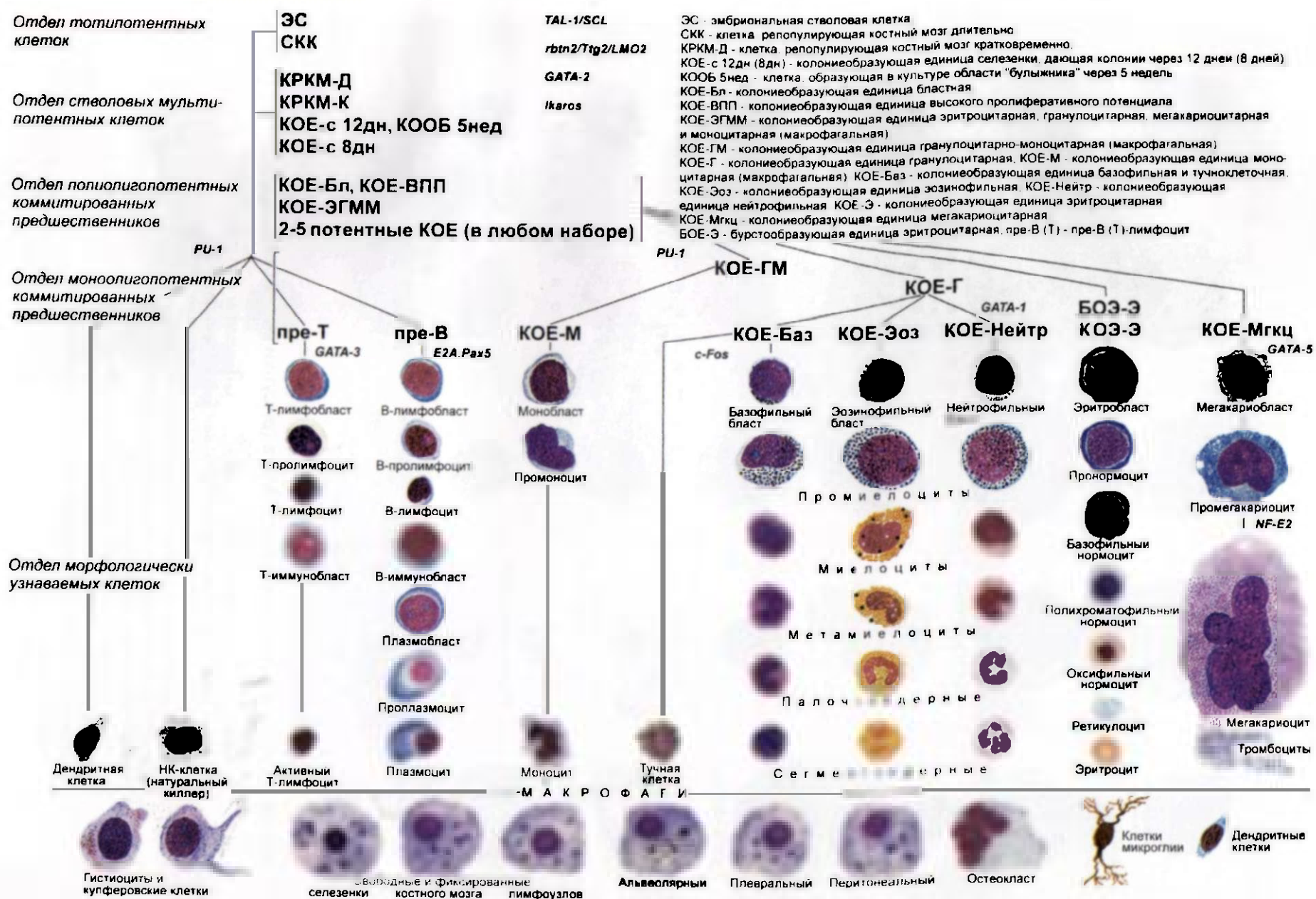


Рис. 12. Схема кроветворения и основные факторы транскрипции (к главе И. Л. Чертова и соавт. "Кроветворение", рисунки клеток М. Г. Абрамова).

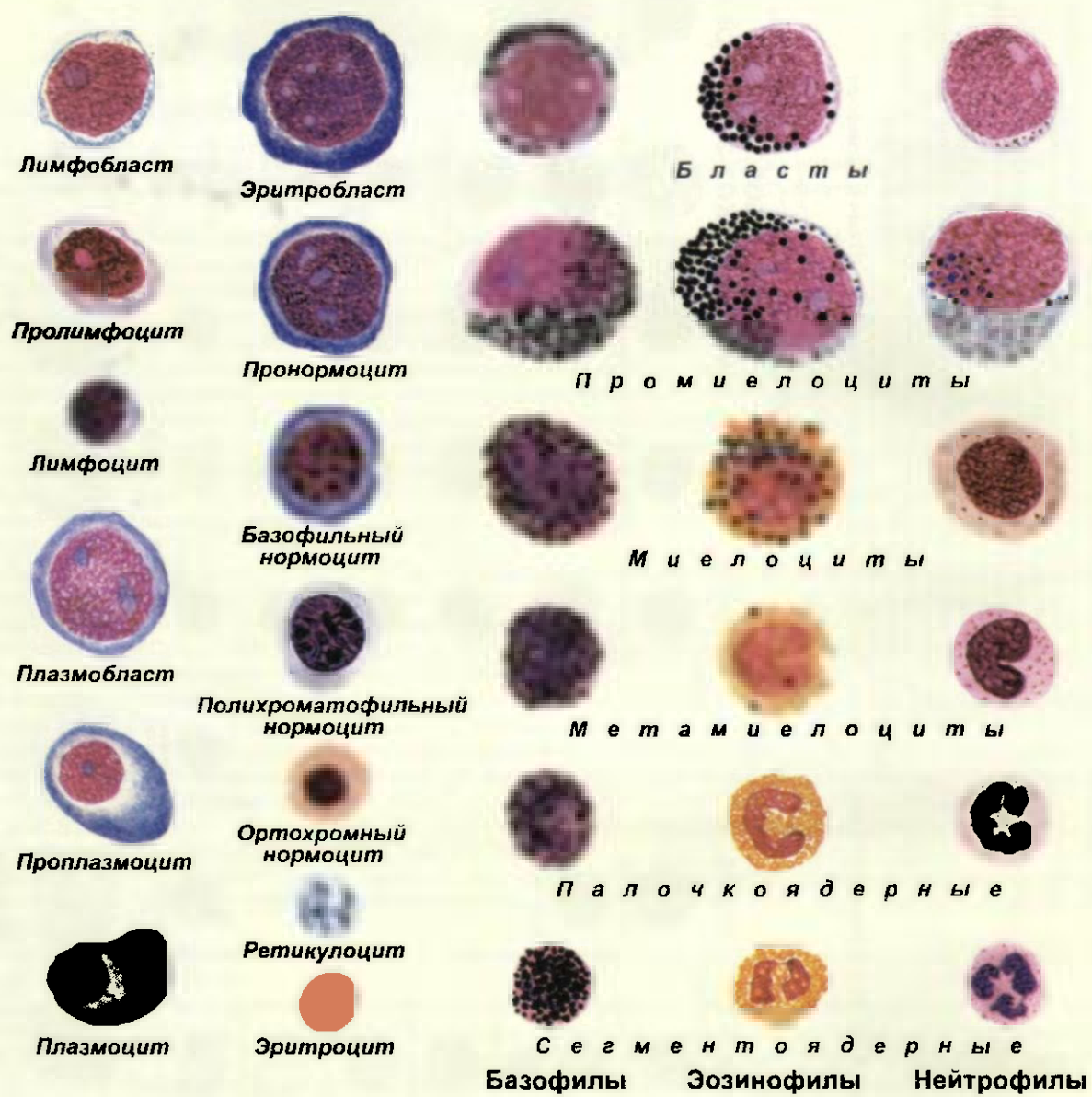
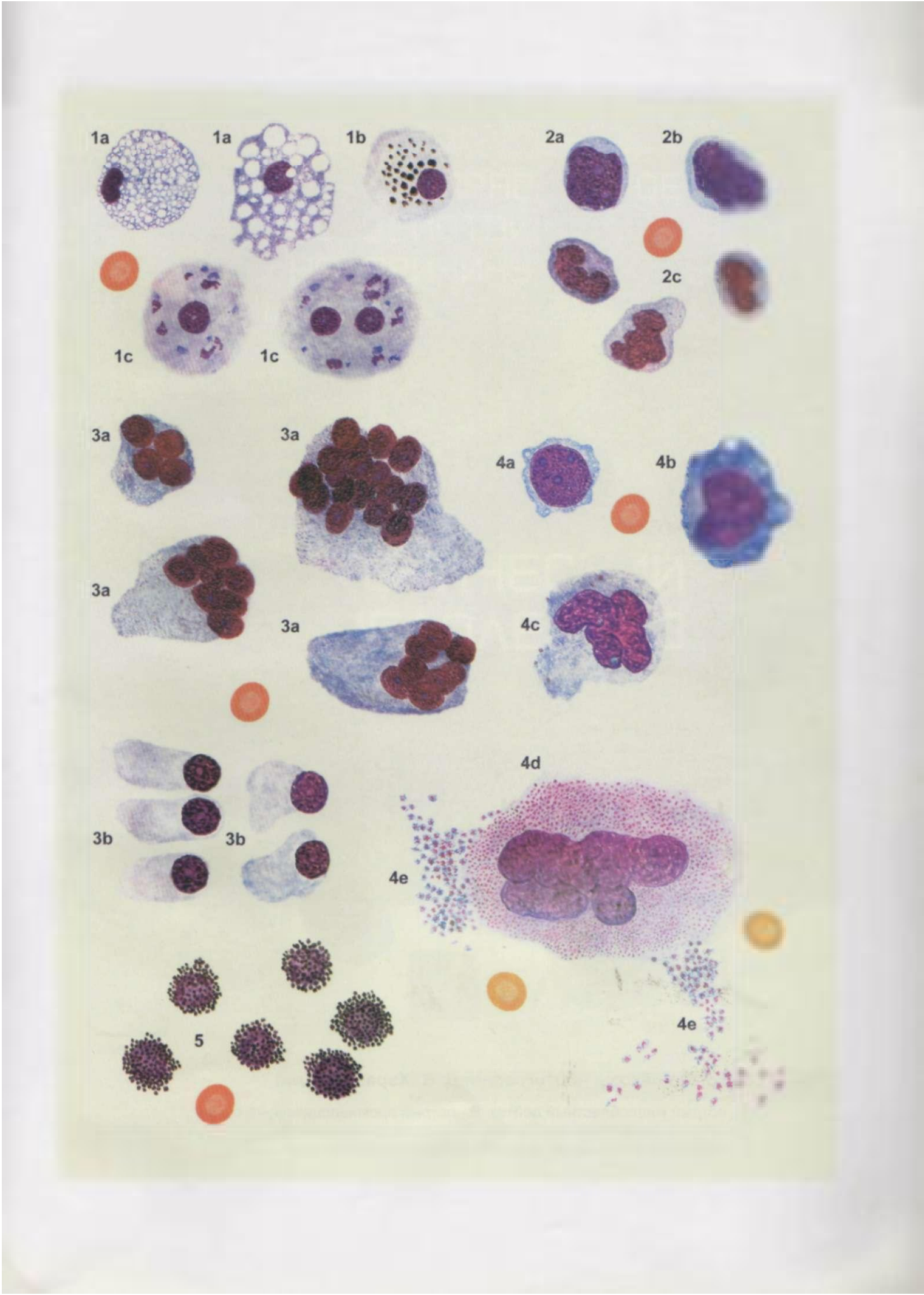
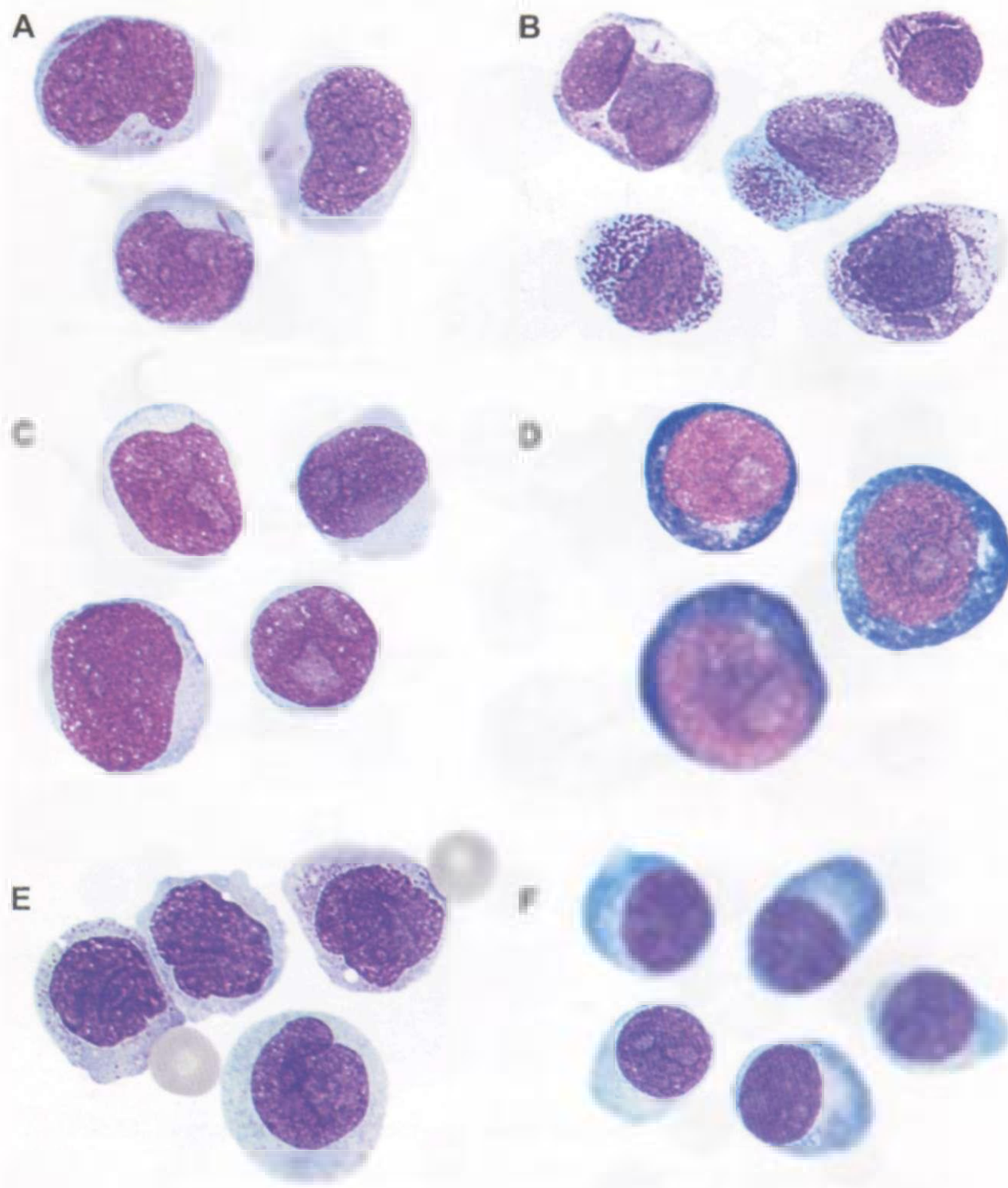


Рис.18. Клеточный состав костного мозга (рисунки М. Г. Абрамова)

- 1 - макрофаги, из них два липофага (1а), один пигментофаг (1б) и два макрофага с остатками клеточных образований в цитоплазме (1с);
- 2 - клетки моноцитарного ряда: монобласт (2а), промоноцит (2б) и моноциты различных морфологических вариантов (2с);
- 3 - клетки, участвующие в резорбции и новообразовании костной ткани: остеокласты (3а), остеобласты (3б);
- 4 - клетки мегакариоцитарного ростка: мегакариобласт (4а), промегакариоцит (4б), недеятельный мегакариоцит (4с), функционально активный мегакариоцит (4д), тромбоциты (4е);
- 5 - тучные клетки.





10 мкм

Рис. 50. Острые лейкозы (фотографии Д. В. Харазишвили)

A - острый миелобластный лейкоз, B - острый промиелоцитарный лейкоз,
C - острый лимфобластный лейкоз, D - острый эритромиелоз,
E - острый монобластный лейкоз, F - острый плазмобластный лейкоз.