

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ, ОНКОГЕМАТОЛОГИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Материалы Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

3-4 октября 2017 года

Киров – 2017

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

A43



Организатор конференции:

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»

Редакционный совет:

- ответственный редактор: *И. В. Парамонов* – к.м.н., директор ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
- заместитель ответственного редактора: *А. В. Рылов* – доктор медицинских наук, зам. директора по научной работе;
- заместитель ответственного редактора: *Г. А. Зайцева* – профессор, руководитель научного направления;
- заместитель ответственного редактора: *Н. М. Поздеев* – доктор медицинских наук, зам. директора по организационно-методической работе;
- ответственный секретарь: *М. Е. Ковтунова* – доцент, ученый секретарь института.

A43 Актуальные вопросы трансфузиологии онкогематологии и клеточной терапии: сборник научных трудов / ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. – Киров: ООО «Форекс Принт», 2017. – 270 с. : цв. ил.- 8 с.

ISBN 978-5-498-00481-5

Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии онкогематологии и клеточной терапии», 3-4 октября 2017 г. В сборнике представлены статьи по актуальным проблемам производственной и клинической трансфузиологии, диагностики и лечения онкогематологических заболеваний, нарушений системы гемостаза, клеточных технологий.

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

ISBN 978-5-498-00481-5

© ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России», 2017
© Оформление. ООО «Форекс Принт», 2017

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

A43



Conference Organizer:

FSBSI «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
FMBA of Russia»

Editorial Council:

- ▶ responsible editor: I. V. Paramonov - Ph.D., director of FGBUN «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia»;
- ▶ Deputy Executive Editor: AV Rylov - Doctor of Medical Sciences, Deputy of Director for Research;
- ▶ Deputy responsible editor: GA Zaitseva - professor, head of the scientific direction;
- ▶ Deputy Executive Editor: NM Pozdeev - Doctor of Medical Sciences, Deputy of Director for organizational and methodical work;
- ▶ Executive Secretary: ME Kovtunova - Associate Professor, Scientific Secretary of the Institute.

A43 Topical issues of transfusiology of oncohematology and cell therapy:
a collection of scientific papers / FSBSI RRI of H&BT of FMBA of Russia. -
Kirov: Open Company «Forex Print», 2017. - 270 with. : color. yl. - 8.

ISBN 978-5-498-00481-5

Collection of scientific works of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Actual questions of transfusion of oncohematology and cell therapy», October 3-4, 2017 The collection contains articles on topical problems of industrial and clinical transfusiology, diagnosis and treatment of oncohematological diseases, hemostasis system disorders, cellular technologies.

UDC 615.38 + 616.1/.9

ББК 53

ISBN 978-5-498-00481-5

© FSBSI «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia», 2017

© Design. LLC «Forex Print», 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Вопросы производственной и клинической трансфузиологии

<i>Жибурт Е. Б., Губанова М. Н., Чемоданов И. Г., Кожемяко О. В., Аюпова Р. Ф.</i> Менеджмент крови пациента	8
<i>Землянских Н. Г., Бабийчук Л. А.</i> Исследование модификации Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов полиэтиленгликолем на разных экспериментальных моделях	18
<i>Калинина Е. Н., Пономарева И. В., Порохненко С. Г., Ковтунова М. Е., Кормищикова Е. С., Росина Е. В.</i> К вопросу о внедрении системы менеджмента качества в учреждениях службы крови	23
<i>Кардовский А. Г., Зайцева Г. А., Градобоева Т. Г.</i> Иммунокорректирующая терапия при лечении пострадавших с глубокими отморожениями конечностей	29
<i>Ковтунова М. Е., Шерстнев Ф. С., Утемов С. В.</i> Организация трансфузиологической помощи в чрезвычайных ситуациях	35
<i>Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М., Бабийчук Л. А.</i> Сохранность и жизнеспособность ядросодержащих клеток кордовой крови, криоконсервированных в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты	48
<i>Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Бондаренко В. А.</i> Негативные последствия переливания эритроцитов при значительной кровопотере и возможные подходы к их коррекции	53
<i>Смирнова О. Н.</i> Организация трансфузиологического кабинета в ГБУЗ СК «Городская детская клиническая больница им. Г. К. Филиппского» г. Ставрополь	58
<i>Строна В. И., Репин Н. В.</i> Содержание биологически активных соединений в ткани и криоэкстракте плаценты	63
<i>Утемов С. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Худяков А. Н.</i> Результаты замораживания донорских лейкоцитных концентратов по модернизированным программам	67

Вопросы гемостазиологии

<i>Васильева М. Ю., Колосков А. В., Филиппова О. И., Чернова Е. В.</i> Особенности диагностических методов болезни фон Виллебранда	74
<i>Игнатъев С. В., Зотина Е. Н., Ивашкина Е. П., Фокина Е. С., Лянгузов А. В.</i> Гиперкоагуляционный синдром у больных неходжкинскими лимфомами	80
<i>Игнатъев С. В., Вязникова О. Э., Тимофеева М. А., Ивашкина Е. П., Лянгузов А. В.</i> Опыт применения отечественного VIII фактора свертывания крови у больных гемофилией	84
<i>Киселева А. Н., Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Попонина Е. А., Игнатъев С. В., Ярыгин Д. Н.</i> Значение генетических полиморфизмов, предрасполагающих к тромбофилии, протромботическим состояниям и нарушениям фолатного цикла у женщин с репродуктивной дисфункцией	89

<i>Колосков А. В., Филиппова О. И., Васильева М. Ю., Чернова Е. В.</i> Изучение геморрагического анамнеза пациента как основополагающий этап диагностики патологии свертывающей системы крови	95
<i>Купряшов А. А., Рафиев И. А.</i> Влияние условий хранения на пространственно-временную динамику генерации тромбина и роста фибринового сгустка в донорской плазме	100
<i>Купряшов А. А., Гущин Д. К., Зеленикин М. М.</i> Пространственно-временная динамика генерации тромбина и роста фибринового сгустка во время операций с искусственным кровообращением у детей с унивентрикулярной гемодинамикой: пилотное исследование	113
<i>Лянгузов А. В., Калинина С. Л., Сергунина О. Ю., Игнатъев С. В., Шерстнев Ф. С.</i> Роль тромбоэластографии в определении трансфузионной тактики при катетеризации центральной вены у больных гемобластозами с тяжелой тромбоцитопенией	124
<i>Чернова Е. В., Колосков А. В., Филиппова О. И., Васильева М. Ю.</i> Генетика и молекулярная биология болезни Виллебранда	128

Вопросы диагностики и лечения онкогематологических заболеваний

<i>Буркитбаев Ж. К., Абдрахманова С. А., Рамильева И. Р., Турганбекова А. А., Баймукашева Д. К., Жибурт Е. Б.</i> Характер распределения специфичностей HLA у пациентов с апластической анемией	134
<i>Васкина Е. А., Целоусова О. М., Данилова Е. В., Татаурова И. П.</i> Результаты лечения острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу МВ-2008	142
<i>Докина И. А., Лагунова О. Р., Овсепян В. А., Федоровская Н. С., Исаева Н. В., Зотина Е. Н., Поздеев Н. М.</i> Мониторинг минимальной резидуальной болезни при лечении Rh-положительного острого лимфобластного лейкоза взрослых	146
<i>Дьяконов Д. А., Федоровская Н. С., Фокина Е. С., Минаева Н. В., Овсепян В. А.</i> Гистологические особенности состояния тканевых структур в трепанобиоптатах костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией в зависимости от мутации в гене JAK2V617F	151
<i>Зотина Е. Н., Загоскина Т. П., Шардаков В. И.</i> Прогностическое значение клинико-гематологических и демографических показателей у больных хроническим лимфолейкозом на ранней стадии заболевания	156
<i>Назарова Е. Л., Шардаков В. И., Демьянова В. Т., Зотина Е. Н., Докина И. А.</i> Показатели выживаемости больных хроническим лимфолейкозом, коррелирующие с молекулярно-генетическими особенностями иммунной системы	162
<i>Никитин Е. Н., Казарин Д. Д.</i> Современные подходы к диагностике и лечению железодефицитных анемий	171
<i>Никитин Е. Н., Мясникова О. И., Ахкиямов Р. Р.</i> Клиническая характеристика и опыт лечения острого промиелоцитарного лейкоза	182

Овсеян В. А., Сарпова М. В., Зотина Е. Н., Минаева Н. В., Загоскина Т. П. Прогностическое значение содержания клеток с изолированной интерстициальной делецией 13q14 при хроническом лимфолейкозе	188
Сёмочкин С. В., Желнова Е. И., Юрова Е. В., Гаглоева Д. Э., Архипова Н. В., Толстых Т. Н., Мисюрин Е. Н. Эффективность лечения впервые диагностированной множественной миеломы, осложненной диализ-зависимой почечной недостаточностью	193
Сергеева Л. Г., Целоусова О. М., Васкина Е. А., Татаурова И. П. Заболелаемость острыми лейкозами детского населения Кировской области за период 2002-2016 гг.	197
Федоровская Н. С., Росин В. А., Дьяконов Д. А., Минаева Н. В., Лагунова О. Р., Самарина С. В., Целоусова О. М., Парамонов И. В. Анализ структуры и частоты встречаемости неходжкинских лимфом в Кировской области	206
Чеботкевич В. Н., Бессмельцев С. С., Киселева Е. Е., Кайтанджан Е. И., Стижак Н. П., Бурылев В. В. Клинические и этиологические особенности вирусно-бактериальных инфекционных осложнений у больных гемобластозами	211
Черепанова В. В., Курышева М. А. Острые порфирии	216
Вопросы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	
Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Коряковцева Т. А. Анализ посттрансплантационного химеризма на основании исследования антигенов эритроцитов	224
Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Киселева А. Н. Определение посттрансплантационного химеризма при анализе генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR	229
Исаева Н. В., Утемов С. В., Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Шерстнев Ф. С. Результаты оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконцентраатах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки	234
Логинова М. А., Парамонов И. В., Рылов А. В. Новый аллель локуса HLA-C, HLA-C*06:02:48, выявленный у бурят	241
Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Исаева Н. В., Утемов С. В. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: свойства, источники получения и перспективы применения в трансплантологии	245
Хоробрых М. Н., Минаева Н. В., Зорина Н. А., Лучинин А. С., Лагунова О. Р., Докшина И. А., Исаева Н. В., Утемов С. В., Ветошкин К. А., Парамонов И. В. Эффективность режима кондиционирования высокими дозами мелфалана с бортезомибом при аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с множественной миеломой	252



**ВОПРОСЫ
ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ И
КЛИНИЧЕСКОЙ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ**

МЕНЕДЖМЕНТ КРОВИ ПАЦИЕНТА

Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Чемоданов И.Г., Кожемяко О.В., Аюпова Р.Ф.

*Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия
(105203, г. Москва, Нижняя Первомайская улица, 70 к. 10)*

*Ставропольская краевая станция переливания крови, Ставрополь, Россия
(355002, Ставрополь, ул. Лермонтова, 205)*

*Центр крови Республики Крым, Симферополь, Россия
(Симферополь, Киевская улица, 37/2)*

*Хабаровская краевая станция переливания крови, Хабаровск, Россия
(Хабаровск, Волочаевская улица, 46)*

Республиканская станция переливания крови, Уфа, Россия (Уфа, Батырская улица, 41/1)

PATIENT BLOOD MANAGEMENT

Zhiburt E.B., Gubanova M.N., Chemodanov I.G., Kozhemyako O.V., Ayupova R.F.

*Pirogov National Medical Surgical Center, Moscow, Russia (105203 Moscow, Nizhnyaya
Pervomayskaya street, 70k10) e-mail: ezhiburt@yandex.ru,*

*Stavropol regional blood transfusion station, Stavropol, Russia (355002 Stavropol, Lermontova
street, 205, e-mail: margo62.11@gmail.com, Crimean Blood Center, Simferopol, Russia*

(Simferopol, Kiev street, 37/2) e-mail: doc.chema.ark@mail.ru,

*Khabarovsk regional blood transfusion station, Khabarovsk, Russia
(Khabarovsk, Volochaevskaya street, 46) e-mail: kspk-27@mail.ru*

Republic blood transfusion station, Ufa, Russia

(Ufa, Batyrskaya street, 41/1), e-mail: auypova63@mail.ru

Менеджмент крови пациента (МКП) – основанный на доказательствах, междисциплинарный подход к оптимизации лечения пациентов, которым может понадобиться переливание крови. МКП охватывает все аспекты обследования и лечения пациента, окружающие процесс решения о гемотрансфузии, включая применение надлежащих показаний, а также минимизацию кровопотери и оптимизацию массы эритроцитов пациента.

Ключевые слова: *кровь, донор, переливание, менеджмент крови пациента, риски*

Patient blood management (PBM) is an evidence-based, interdisciplinary approach to optimize the treatment of patients who may need a blood transfusion. PBM covers all aspects of the examination and treatment of the patient's surrounding a decision on transfusion, including the use of appropriate indications, as well as minimizing blood loss and optimize the patient's red blood cell mass. PBM can reduce the need for allogeneic blood transfusion.

Keywords: *blood, donor, transfusion, patient blood management, risks*

Введение

Пионеры переливания крови были уверены в его спасительной роли. Однако эта точка зрения никогда не была подтверждена в проспективных контролируемых клинических исследованиях [1, 2].

Переливание крови несет:

- уникальные риски (что послужило причиной принятия единственного пока в России «медицинского» технического регламента [3]) (табл. 1);
- увеличение расходов клиники [4];

- сложности управления запасами крови [5].

Таблица 1.

Летальные осложнения трансфузии в США в 2005 – 2015 гг. [6]

Осложнение	n	%
Связанное с трансфузией острое повреждение легких (ТРАЛИ)	211	44
Гемолитическое (не-ABO)	71	15
Гемолитическое (ABO)	41	9
Бактериальное	53	11
Циркуляторная перегрузка	78	16
Анафилаксия	19	4
Другое	7	1
Всего	480	100

Наиболее ярко значимость и проблемы трансфузионной терапии проявляются в гематологической клинике. С одной стороны, уменьшение послекурсовой летальности у гематологических больных и, в конечном итоге, эффективность терапии зависят от адекватности заместительной терапии компонентами крови, в первую очередь тромбоцитами. Однако высокие темпы инфицирования вирусами гепатитов В и С подтверждают зависимость вероятности инфицирования от количества доноров, привлеченных для кроводачи [7, 8]. Эффективность современного лечения гемобластозов позволяет выявить ассоциацию между посттрансфузионными гепатитами и повышенной летальностью [9]. Вирусное поражение печени, другие неблагоприятные эффекты трансфузий снижают возможности пациента переносить без серьезных осложнений последующее интенсивное лечение и уменьшают его шансы на долгосрочную выживаемость [10, 11].

Озабоченность эффективностью, безопасностью и затратностью трансфузионной терапии стимулирует поиск клинических решений, альтернативных гемотрансфузиям, сбережение крови пациента и сокращение расхода донорской крови [12 - 16].

Комплекс таких решений получил название – менеджмент крови пациента (МКП; англоязычный термин - patient blood management).

МКП - основанный на доказательствах, междисциплинарный подход к оптимизации лечения пациентов, которым может понадобиться переливание крови. МКП охватывает все аспекты обследования и лечения пациента, окружающие процесс решения о гемотрансфузии, включая применение надлежащих показаний, а также минимизацию кровопотери и оптимизацию массы эритроцитов пациента. МКП может снизить потребность в переливании компонентов аллогенной крови и уменьшить расходы на здравоохранение, обеспечивая при этом доступность компонентов крови для пациентов, которым они необходимы [17, 18].

Во многом МКП соответствует идеологии кровесбережения [12], но несколько выходит за рамки трансфузиологии и нацелен на улучшение клинического исхода за счет отказа от ненужных гемотрансфузий.

Три составляющих («столпа») МКП:

- оптимизация объема крови и массы эритроцитов;
- минимизация кровопотери;
- оптимизация переносимости анемии пациентом [19].

Эти три принципа применимы к любому гематологическому нарушению. МКП оптимизирует использование донорской крови и сокращает риск, ассоциированный с трансфузией.

Акценты и технологии менеджмента крови пациента переменны и зависят от клинической ситуации (острая массивная кровопотеря, реанимация, акушерство, педиатрия и т.д.).

Рассмотрим ключевые составляющие МКП при плановой хирургической операции.

МКП до операции

Нужно стремиться избежать периоперационной трансфузии. Наряду с возможной предшествующей коагулопатией, важным прогностическим фактором возможной трансфузии является исходный объем циркулирующих эритроцитов.

Начинать обследовать пациента оптимально не менее, чем за 30 дней до операции. С тем, чтобы было время для диагностики и коррекции причин анемии. Наиболее частой и корригируемой причиной анемии является дефицит железа [20]. Опубликованы результаты мультицентрового рандомизированного исследования, доказавшего эффективность двукратного внутривенного введения 750 мг карбоксимальтозата железа у пациентов с железодефицитной анемией и неадекватным ответом на пероральные препараты железа [21].

При оценке анемии важно также рассмотреть возможность хронического заболевания почек и злокачественной опухоли.

При заболевании почек была известна эффективность стимуляторов эритропоэза. Эти препараты были рекомендованы как средства кровесбережения для пациентов, которым выполняются плановые операции, поскольку в проспективных рандомизированных исследованиях была показана их роль в снижении переливания донорской крови у пациентов хирургической ортопедической [22] и кардиохирургической клиник [23].

Однако позже показано, что у пациентов с плановыми операциями на позвоночнике, получавших эритропоэтин до операции, повышена частота тромбозов [24], а у кардиохирургических пациентов, получавших эритропоэтин, выше отсроченная летальность [25]. В настоящее время Администрация по пищевым продуктам и лекарствам США полагает, что назначение эритропоэтина с целью увеличить концентрацию гемоглобина выше 110 г/л увеличивает риск серьезных побочных сердечно-сосудистых событий и не

несет дополнительных выгод [26].

Еще возможный инструмент кровесбережения – дооперационное резервирование аутологичной крови и ее компонентов. В последние годы количество переливаний аутологичной крови снижается. Так, в США количество аутологичных трансфузий значительно сократилось с 2008 по 2011 на 59,4 % и достигло 65000 ($p < 0,01$). При этом доля аутологичных донаций составила 0,7 % (113000 доз) и, соответственно, 42,5 % доз аутологичной крови остались не перелиты из-за отсутствия показаний. Заготовка аутологичной крови до операции должна применяться при лечении аллоиммунизированных пациентов, которым сложно подобрать донорскую кровь [27].

Коррекция кровопотери

Острая нормоволемическая гемодилюция – замещение части крови пациента плазмозаменителями на операционном столе. При этом цельная кровь пациента сберегается, а в рану вытекает кровь со сниженным гематокритом. Дооперационная нормоволемическая гемодилюция может быть рекомендована как метод с ограниченным эффектом у пациентов с концентрациями гемоглобина на верхней границе нормы. В контролируемых исследованиях не смогли документировать снижение потребности в концентратах аллогенных эритроцитов [28].

Острая нормоволемическая гемодилюция менее эффективна, чем дооперационное резервирование крови. А самый эффективный вид использования аутологичной крови – интраоперационная реинфузия отмытых эритроцитов [29].

Коррекция нарушений гемостаза

В периоперационный период важна быстрая диагностика нарушений гемостаза (устройства «point-of-care») в сочетании с алгоритмами лекарственной и трансфузионной терапии.

Трансфузионная терапия не играет определяющей роли в инверсии антикоагулянтных эффектов многих препаратов.

СЗП используется только для инверсии варфарина, но и в этой ситуации является средством не первого, а второго выбора (после витамина К и протромбинового комплекса) [30].

Переливание патогенредуцированных тромбоцитов играет умеренную роль в присутствии антитромбоцитарных агентов, но при критическом кровотечении (например, внутричерепном) выходит на первый план и в отсутствие опубликованных доказательств [31].

Концентрат протромбинового комплекса, активированный концентрат протромбинового комплекса и рекомбинантный активированный фактор VII (rVIIa) используются как «шунтирующие агенты» в ситуациях, где специфическая инверсия антикоагулянта невозможна. Следует отметить, что rVIIa разрешен лишь для лечения пациентов с ингибиторами к фактору VIII, и многие инстанции не рекомендуют его расширенное использование за пределами инструкции (off label use).

Во многих ситуациях применение антигемостатических агентов ведет к серьезному риску тромбозов. Задача клинициста – сбалансировать риск тромбоза, вероятный при металлическом клапане сердца или анастомозе печеночной артерии в трансплантате печени, и риск кровотечения [32].

Антифибринолитики, ингибирующие ограничение и растворение свертков крови, использовались для уменьшения кровопотери в кардиохирургии. После сообщений о повышенной летальности при применении аprotинина этот препарат был в 2007 году запрещен в США, однако появляется все больше данных, что удаление аprotинина с рынка привело к увеличению количества кровотечений, частоты рестернотомий, острой почечной недостаточности и летальности после кардиохирургических операций [33, 34].

Систематический обзор 104 исследований показал, что применение транексамовой кислоты на одну треть сокращает хирургическую кровопотерю. Для большинства взрослых достаточно дозы 1 г [35]. Следует отметить, что в мире описано 5 случаев инфаркта миокарда после приема транексамовой кислоты [36]

Центральную роль в образовании тромбоцитарной пробки играет фибриноген. Применение концентратов фибриногена снижает кровопотерю у хирургических пациентов с гипофибриногемией. Остается открытым вопрос о целевой концентрации/активности фибриногена [37]. В проспективном рандомизированном исследовании у пациентов с операцией на аорте и коагулопатическим кровотечением после искусственного кровообращения фибриноген назначали под контролем тромбоэластографии, что привело к снижению расходов продуктов аллогенной крови с 13 до 2 ($p < 0,01$) [38]. Следует отметить, что препараты фибриногена в России пока не зарегистрированы, поэтому средством выбора остается криопреципитат.

Анестезиологическое пособие

Уменьшению кровопотери способствуют:

- профилактика гипотермии
- правильное положение пациента (избегать повышенного венозного давления в месте операции, во время и после операции);
- индуцированная гипотензия (среднее артериальное давление 50-60 мм рт.ст.);
- послеоперационная реинфузия.

Важным средством коррекции гиповолемии являются плазмозаменяющие растворы. На фоне роста интереса к сбалансированным (разность сильных ионов 24 мЭкв/л) кристаллоидным растворам [39], драматические события происходят с коллоидами.

14.06.2013 Комитет по оценке рисков, связанных с безопасностью лекарственных средств, Европейского Агентства по лекарственным средствам (PRAC EMA) пришел к заключению, что в сравнении с кристаллоидами, применение растворов гидроксиэтилкрахмала (ГЭК) сопряжено с более вы-

соким риском развития повреждения почек, требующего диализа, а также с риском увеличения летальности. В связи с этим Комитет принял решение рекомендовать Европейской Комиссии приостановить на территории Европейского Союза обращение данных лекарственных средств.

Ранее, 11.06.2013, Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США по результатам анализа новых данных по безопасности ГЭК, пришло к выводам о риске повышенной летальности и повреждений почек, требующих трансплантации, у взрослых пациентов в критическом состоянии, включая больных с сепсисом и пациентов, находящихся в отделениях реанимации. В связи с этим FDA ограничило сферу использования данных лекарственных средств. В частности, рекомендовано не использовать препараты ГЭК у взрослых пациентов, находящихся в критическом состоянии, включая больных в реанимации и с сепсисом, не использовать данные растворы при заболеваниях почек в анамнезе; прекратить назначение препаратов при первых симптомах нарушений функции почек; контролировать их функцию как минимум 90 дней после применения растворов ГЭК у всех пациентов, учитывая риски поражения почек в отдаленном периоде. Одновременно с этим FDA рассмотрело мета-анализ исследований, проводившихся у пациентов, которым выполнялись операции на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения. Управление пришло к выводу о необходимости включить в инструкцию препаратов ГЭК дополнительное предупреждение о риске кровотечений при их использовании. В связи с этим FDA рекомендовало включить в инструкции препаратов ГЭК новое противопоказание, запрещающее их использование у пациентов, которым показана хирургическая операция на открытом сердце, связанная с проведением искусственного кровообращения. Также Управлением было рекомендовано прекращать использование растворов при первых признаках нарушений свертывания крови [40].

В мае 2013 года опубликованы результаты мультицентрового слепого проспективного рандимизированного контролируемого исследования CHEST (Crystalloid versus Hydroxyethyl Starch Trial), в котором приняли участие 32 госпиталя Австралии и Новой Зеландии. Сравнивали эффективность 6 % ГЭК 130/0,4 (Волювен, Германия) и 0,9 % раствора хлорида натрия в лечении пациентов отделений интенсивной терапии. Летальность в группах сравнения не отличалась. Заместительная почечная терапия использовалась у 235 (7,0%) из 3352 обследованных в группе ГЭК и 196 (5,8%) из 3375 пациентов в группе физиологического раствора ($p = 0,04$). ГЭК чаще был ассоциирован с осложнениями (5,3% против 2,8%; $p < 0,001$) [41]. Любопытно название отчетной статьи: «Кристаллоиды против коллоидов: нокаут в 12-м раунде?».

Гиперкоагуляционное влияние гелофузина (коллоид на основе желатина) на параметры тромбоэластографии и скорость роста сгустка в пространстве оказались выше, чем для ГЭК 130/0,4 и сохранялись дольше волемиче-

ского эффекта [42].

Таким образом, в «соревновании» внутри коллоидов на первое место выходит старый добрый альбумин – единственный из коллоидов, упоминающийся, например, в недавно принятых международных правилах лечения сепсиса [43].

Переливание крови

Доказала свою эффективность ограничительная стратегия трансфузий. У взрослых и детей – пациентов отделения интенсивной терапии переливание эритроцитов должно быть предусмотрено при концентрации гемоглобина 70 г/л или менее. У хирургических пациентов в послеоперационном периоде трансфузии должны быть предусмотрены при концентрации гемоглобина 80 г/л или менее, либо при симптомах (боль в груди, ортостатическая гипотензия или тахикардия, не отвечающая на восстановление жидкости, или застойная сердечная недостаточность). Решение о переливании эритроцитов должно быть основано не только на концентрации гемоглобина, но и на клинической симптоматике.

Для определения оптимального порога трансфузии у госпитализированных гемодинамически стабильных пациентов с острым коронарным синдромом необходимы дальнейшие исследования. Возможно, что целевая концентрация гемоглобина у этой категории пациентов – 100 г/л [44].

В 2013 году сделано заключение об эффективности профилактических трансфузий тромбоцитов (переливание, если количество тромбоцитов утром менее $10 \times 10^9/\text{л}$). Пациенты, которым не проводилась профилактика, более продолжительный срок имели кровотечение степени 2 ВОЗ или выше, более короткое время до первого кровотечения. Профилактическая стратегия переливания тромбоцитов на 7 % сокращает частоту кровотечений [45].

За последние 50 лет завершено 80 рандомизированных клинических исследований по вопросу применения замороженной плазмы для остановки или профилактики кровотечения, но все еще недостаточно доказательств для «информации о безопасности и эффективности трансфузий плазмы». Все еще мало доказательств о значимой пользе инфузий плазмы, а мета-анализ кардиологических исследований не выявил значимого отличия между экспериментальной и контрольной группами при кровопотере. Принимая во внимание хорошо известную мантру: «самая безопасная трансфузия – та, которая не выполнена, если нет четких показаний», остается надеяться на организацию новых высококачественных исследований применения плазмы с тем, чтобы определить эффективность и соответствующие индикаторы трансфузий [46]. На практике, в отсутствие концентратов факторов свертывания, переливание плазмы следует предусмотреть пациентам с кровотечением и лабораторным подтверждением коагулопатии (целевые значения коррекции коагулопатии: на тромбоэластограмме - $R < 11$; угол $\alpha > 52$; или $MNO < 1,6$; $AЧТВ < 45$ сек).

Заключение

Гемотрансфузионная терапия рискованна и затратна, а ресурсы ее - ограничены. Глобальной тенденцией является внедрение правил назначения компонентов крови, основанных на доказательствах. С 2013 года необходимость наличия правил клинического использования донорской крови и ее компонентов предусмотрена и российским законом [47].

Исследования последних лет, в основном показывают эквивалентность или преимущество ограничительной стратегии назначения гемотрансфузий над либеральной, расширенной практикой переливания крови.

Появляется все больше доказательств связи снижения применения донорской крови с другими трансфузиологическими (например, реинфузия эритроцитов) или «нетрансфузиологическими» (например, восполнение дефицита железа) технологиями.

Нужна большая работа, как по продолжению исследований, так и по трансляции результатов исследований в клиническое мышление и практику менеджмента крови пациента.

Список литературы

1. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р., Шестаков Е.А., Вергопуло А.А. Менеджмент крови пациента. - М.: Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова, 2014. - 64 с.
2. Goodnough L.T., Levy J.H., Murphy M. Concepts of blood transfusion in adults. *Lancet*. 2013; 381 (9880): 1845-54.
3. Постановление Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 г. №29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии».
4. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р., Шестаков Е.А., Файбушевич А.Г., Протопопова Е.Б. Медицинская и экономическая эффективность ограничительной стратегии переливания крови // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова.- 2015.- Т.10, №1.- С.100-102.
5. Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А., Караваев А.В. Возможное сокращение срока годности эритроцитов и управление их запасами в клинике. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова. 2011; 6 (3): 29-31.
6. Жибурт Е.Б., Зарубин М.В., Губанова М.Н. Развитие службы крови США // Трансфузиология.- 2016.- Т.17, №1.- С. 57-63.
7. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р. ВИЧ, вирусные гепатиты и сифилис у населения и доноров крови // Поликлиника. – 2016. – №8. – С. 46-48.
8. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р., Кузьмин Н.С., Вергопуло А.А. Гемотрансмиссивные инфекции у населения и доноров крови // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.- 2016.- Т.11, №1.- С.88-90.
9. Гармаева Т.Ц., Куликов С.М., Михайлова Е.А. и др. Долгосрочные результаты инфицированности вирусами гепатитов В и С больных с заболеваниями системы крови. Терапевтический архив. 2011; 83 (7): 17-26.
10. Полунина Н.В., Губанова М.Н., Жибурт Е.Б. Риск передачи инфекции при переливании крови // Российский медицинский журнал.- 2016.- Т. 22, № 6.- С. 284-286.
11. Протопопова Е.Б., Танкаева Х.С., Кузьмин Н.С., Шихмирзаев Т.А., Зарубин М.В., Мадзаев С.Р., Губанова М.Н., Жибурт Е.Б. Трансфузионная терапия при трансплантации

- аутологичных стволовых клеток // Трансфузиология.- 2016.- Т.17, №2.- С. 47-56.
12. Шевченко Ю.Л., Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А. Внедрение кровесберегающей идеологии в практику Пироговского центра // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.- 2008.- Т.3, №1.- С.14-21.
 13. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р. Гемотрансмиссивные инфекции: что нужно знать медсестре? // Главная медицинская сестра. - 2016. - №4.- 72-82.
 14. Spahn D.R., Goodnough L.T. Alternatives to blood transfusion. *Lancet*. 2013;381(9880): 1855-65.
 15. Жибурт Е.Б., Кузьмин Н.С., Вергопуло А.А. Переливание крови при пересадке солидных органов // Трансфузиология.- 2015.- Т.16, №4.- С. 12-23.
 16. Frank S.M., Rothschild J.A., Masear C.G. et al. Optimizing preoperative blood ordering with data acquired from an anesthesia information management system. *Anesthesiology*. 2013;118(6):1286-97 8,89 долларов на хирургического пациента
 17. Goodnough L.T., Shander A. Patient blood management. *Anesthesiology*. 2012;116(6):1367-76
 18. Vamvakas E.C. Reasons for moving toward a patient-centric paradigm of clinical transfusion medicine practice. *Transfusion*. 2013; 53(4): 888-901.
 19. Patient blood management guidelines. Module 1. Critical bleeding / Massive blood transfusion. Australian National blood authority. Canberra, 2011.- 104 p.
 20. Гороховская Г.Н., Петина М.М. Пожилой больной с железодефицитной анемией в клинической практике. *Терапевтический архив*. 2008; 80(12): 66-68
 21. Onken J.E., Bregman D.B., Harrington R.A. et al. A multicenter, randomized, active-controlled study to investigate the efficacy and safety of intravenous ferric carboxymaltose in patients with iron deficiency anemia. *Transfusion*. 2014;54(2):306-15
 22. Goodnough L.T., Maniatis A., Earnshaw P. et al. Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient: NATA guidelines. *Br J Anaesth*. 2011;106(1): 13-22.
 23. Yoo Y.C., Shim J.K., Kim J.C. et al. Effect of single recombinant human erythropoietin injection on transfusion requirements in preoperatively anemic patients undergoing valvular heart surgery. *Anesthesiology*. 2011; 115(5): 929-37.
 24. Stowell C.P., Jones S.C., Enny C. et al. An open-label, randomized, parallel-group study of perioperative epoetin alfa versus standard of care for blood conservation in major elective spinal surgery: safety analysis. *Spine*. 2009;34(23):2479-85.
 25. D'Ambra M.N., Gray R.J., Hillman R. et al. Effect of recombinant human erythropoietin on transfusion risk in coronary bypass patients. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(6):1686-93
 26. FDA Drug Safety Communication: Modified dosing recommendations to improve the safe use of Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESAs) in chronic kidney disease [6-24-2011]// <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm259639.htm>.
 27. US Department of Health and Human Services. The 2011 National Blood Collection and Utilization Survey Report. Washington, DC: DHHS, 2013: 87 p.
 28. Cross-Sectional Guidelines for Therapy with Blood Components and Plasma Derivatives/ Published by: The Board of the German Medical Association on the Recommendation of the Scientific Advisory Board (Bundesärztekammer)/ 4th revised edition. 2009: 148 p.
 29. Жибурт Е.Б. Трансфузиологический словарь. Руководство для врачей.- М., РАЕН, 2012.- 319 с.
 30. Tran H.A., Chunilal S.D., Harper P.L. et al. An update of consensus guidelines for warfarin reversal. *Med J Aust*. 2013;198(4):198-9.
 31. Pearson H., Davis K.G., Wood E.M. et al. Logistics of platelet concentrates// *Vox Sanguinis*.- 2007.- Vol. 92, № 2.- P. 160-181.
 32. Baron T.H., Kamath P.S., McBane R.D. Management of antithrombotic therapy in

patients undergoing invasive procedures. *N Engl J Med.* 2013; 368(22): 2113-24.

33. Walkden G.J., Verheyden V., Goudie R., Murphy G.J. Increased perioperative mortality following aprotinin withdrawal: a real-world analysis of blood management strategies in adult cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 2013; 39(10): 1808-17.

34. Goodnough L.T., Shander A. Current status of pharmacologic therapies in patient blood management. *Anesth Analg.* 2013; 116(1): 15-34.

35. Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Прокофьева И.В. Вопросы гемостаза в проекте правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов // *Тромбоз, гемостаз и реология.* - 2016. - № 4 (68). - С. 13-18.

36. Garg J., Pinnamaneni S., Aronow W.S., Ahmad H. ST Elevation Myocardial Infarction After Tranexamic Acid: First Reported Case in the United States. *Am J Ther.* 2014;21(6):e221-4

37. Warmuth M., Mad P., Wild C. Systematic review of the efficacy and safety of fibrinogen concentrate substitution in adults. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012; 56(5): 539-48.

38. Rahe-Meyer N., Hanke A., Schmidt DS. et al. Fibrinogen concentrate reduces intraoperative bleeding when used as first-line hemostatic therapy during major aortic replacement surgery: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 Mar; 145 (3 Suppl): S178-85.

39. Morgan T.J. The ideal crystalloid - what is 'balanced'? *Curr Opin Crit Care.* 2013; 19(4): 299-307.

40. Письмо Росздравнадзора от 10.07.2013 N 16И-746/13 «О новых данных лекарственных препаратов гидроксипроксиэтилкрахмала».

41. Phillips D.P., Kaynar A.M., Kellum J.A., Gomez H. Crystalloids vs. colloids: КО at the twelfth round? *Crit Care.* 2013; 17(3): 319.

42. Синауридзе Е.И., Буланов А.Ю., Щербакова О.В. и др. Усиление коагуляции, вызываемое переливанием искусственных плазмозамещающих растворов. *Терапевтический архив.* 2009; 81(1): 52-55.

43. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013; 41(2): 580-637.

44. Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А. Правила и аудит переливания крови. Руководство для врачей. - М., РАЕН, 2010. - 347 с.

45. Stanworth S.J., Estcourt L.J., Powter G. et al. A no-prophylaxis platelet-transfusion strategy for hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2013;368(19):1771-1780

46. Yang L., Stanworth S., Hopewell S. Is fresh-frozen plasma clinically effective? An update of a systematic review of randomized controlled trials // *Transfusion.* 2012; 52(8): 1673-86.

47. Федеральный закон от 20.07.2012 N 125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов» (ст. 9, ч. 2, п.7).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИКАЦИИ Ca^{2+} -АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ НА РАЗНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Землянских Н. Г., Бабийчук Л. А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, Холодногорский район, Переяславская улица, 23)*

STUDY OF THE MODIFICATION OF ERYTHROCYTE Ca^{2+} -ATPase BY POLYETHYLENE GLYCOLE WITH DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS

Zemlianskykh N. G., Babijchuk L. A.

*Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)*

E-mail: nzemliansky@gmail.com

Изучение модифицирующего действие полиэтиленгликоля м.м. 1500 на Ca^{2+} -АТФазу в замкнутых тенях и сапонин-перфорированных эритроцитах показало резкое снижение Ca^{2+} -АТФазной активности. Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах вследствие торможения каталитической активности Ca^{2+} -АТФазы может влиять на стабильность клеток в стрессовых условиях криоконсервирования.

Ключевые слова: *Ca^{2+} -АТФаза, мембрана, эритроцит, криопротектор, полиэтиленгликоль*

A study of the modifying action of polyethylene glycol m.w. 1500 on Ca^{2+} -ATPase in sealed ghosts and saponin-perforated erythrocytes showed a sharp decrease in Ca^{2+} -ATPase activity. An increase in the level of intracellular Ca^{2+} in erythrocytes due to inhibition of the catalytic activity of Ca^{2+} -ATPase can affect the stability of cells under stressful conditions of cryopreservation.

Keywords: *Ca^{2+} -ATPase, membrane, erythrocyte, cryoprotectant, polyethylene glycol*

Для защиты клеток от разрушения в процессе криоконсервирования используют различные органические соединения, отличительной чертой которых является биосовместимость. Тем не менее, все криопротекторы в той или иной степени влияют на структуру и функции мембранных систем. Полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500), не проникающий в клетки, обеспечивает высокую сохранность эритроцитов человека в процессе криоконсервирования. Важная роль в поддержании стабильности клеток в стрессовых условиях принадлежит Ca^{2+} -АТФазе плазматической мембраны – единственной системе контроля внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах человека. Вместе с тем, результаты оценки действия криопротекторов на Ca^{2+} -АТФазу при использовании разных экспериментальных моделей не всегда идентичны. Например, ДМСО может усиливать активность изолированного очищенного фермента, выделенного из мембран эритроцитов [1]. Однако под влиянием ДМСО ингибируется кальмодулин-зависимая активность Ca^{2+} -АТФазы без изменения ее базовой функции в случае, если фермент находится в составе мембраны [2].

Следовательно, эффекты криопротекторных соединений на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов могут быть неоднозначными и затрагивают различные аспекты ее функциональной активности. В данной работе для исследования эффектов ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах использовали две экспериментальные модели: Ca^{2+} -АТФазу в структуре изолированной мембраны (замкнутые тени эритроцитов) и сапонин-перфорированные клетки. Фермент в составе мембраны является адекватной моделью для изучения Ca^{2+} -АТФазы и позволяет исследовать различные аспекты ее функционирования в присутствии криопротекторов, близко к общей картине поведения данной системы в клетке. В частности, данная экспериментальная модель позволяет оценить действие криопротектора, если оно реализуется путем непосредственного влияния на структуру молекулы Ca^{2+} -АТФазы или опосредованно через влияние на структуру липидного бислоя. Вместе с тем, в нативной клетке контроль за активностью Ca^{2+} -АТФазы осуществляется более сложными путями и включает регуляцию ее работы различными эндогенными модуляторами, в том числе кальмодулином, протеинкиназами А и С, протеазами, кислыми фосфолипидами. Поэтому, сохранение всех компонентов внутриклеточного содержимого эритроцитов при перфорировании плазматических мембран сапонином требуется для того, чтобы получить доступ к активным центрам фермента и контролировать параметры среды при проведении ферментативной реакции гидролиза АТФ, а также дает еще одну дополнительную возможность для определения модификации активности Ca^{2+} -АТФазы полиэтиленгликолем.

Цель работы заключалась в определении модифицирующего действия ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах на различных экспериментальных моделях: изолированных мембранах (замкнутых тенях) и сапонин-перфорированных клетках.

Материалы и методы. Объектом исследования служили эритроциты донорской крови, полученной из Центра службы крови г. Харькова. Выделение мембран эритроцитов и определение ферментативной активности Ca^{2+} -АТФазы в тенях эритроцитов, проводили согласно методическим описаниям [3]. Влияние ПЭГ-1500 на активность Ca -АТФазы на модели сапонин-перфорированных клеток оценивали в соответствии с методическими описаниями [4]. Контролем служил раствор 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4. Результаты статистически обработаны с использованием программы Statgraphics plus 2.1 for Windows. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера.

Результаты и обсуждение. Модель реконструированных эритроцитов (замкнутых теней) позволяет оценить активность Ca^{2+} -АТФазы под влиянием экзоцеллюлярного соединения в условиях, предотвращающих его непосредственный контакт с цитоплазматическими доменами фермента, что соответствует экзоцеллюлярному характеру действия ПЭГ-1500 на

эритроциты человека. Недостаток данной модели связан с исключением эндогенных цитоплазматических регуляторов Ca^{2+} -АТФазной активности при получении фракции изолированных мембран. Сапонин-перфорированные эритроциты компенсируют этот недостаток. Однако, для оценки действия ПЭГ-1500 на Ca^{2+} -АТФазу в данной экспериментальной модели криопротектор необходимо удалить из среды до начала ферментативной реакции, чтобы он не мог контактировать с цитоплазматическими доменами Ca^{2+} -АТФазы, т.е., фактически, оцениваются последствия контакта ПЭГ-1500 с клетками.

Определение активности Ca^{2+} -АТФазы в замкнутых теньях эритроцитов в присутствии криопротектора показало, что при добавлении его в среду даже в небольших концентрациях наблюдается ингибирование активности Ca^{2+} -АТФазы (рис. 1). При высоких концентрациях полимера (20–30%), которые способны оказывать выраженное криопротекторное действие, было отмечено снижение скорости накопления конечного продукта гидролиза АТФ, осуществляемого Ca^{2+} -АТФазой (неорганического фосфата Pi) примерно в 3 раза.

Эксперименты с использованием сапонин-перфорированных эритроцитов были проведены только для 30% раствора ПЭГ-1500, который демонстрирует выраженный криопротекторный эффект. Инкубация эритроцитов с ПЭГ-1500 при 37°C и 5°C (рис.2) приводила к снижению активности Ca^{2+} -АТФазы почти в 2 раза независимо от температуры, при которой эритроциты инкубировались с ПЭГ-1500, в случае, если после удаления из среды криопротектора, реакция гидролиза АТФ проводилась при 37°C. Однако, если после инкубации эритроцитов с ПЭГ-1500 при температуре 5°C активность Ca^{2+} -АТФазы оценивать при той же температуре, то обнаруживается, что снижение температуры оказывает дополнительный ингибирующий эффект на Ca^{2+} -АТФазу. В этих условиях активность фермента была ниже в сравнении не только с контролем, но и с эритроцитами, инкубированными с ПЭГ-1500 при 5°C при последующей оценке функционирования Ca^{2+} -АТФазы при 37°C.

Таким образом, исследование Ca^{2+} -АТФазной активности в эритроцитах на экспериментальных моделях замкнутых теней эритроцитов и перфорированных сапонином клетках выявило только одну тенденцию ее модификации экзоцеллюлярным криопротекторным соединением ПЭГ-1500, выражающуюся в снижении скорости накопления конечного продукта гидролизной реакции – неорганического фосфора. Поскольку способность Ca^{2+} -насоса транспортировать ионы Ca^{2+} определяется, прежде всего, его каталитической активностью, можно ожидать повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах, инкубированных в ПЭГ-содержащих растворах. Известно, что ионы Ca^{2+} обладают функцией вторичного мессенджера и могут играть важную роль в выживании клеток в стрессовых условиях [5], в том числе когда стрессовые факторы обусловлены процессом криоконсервирования.

Несмотря на то, что ПЭГ-1500 обеспечивает высокий уровень сохранности эритроцитов человека на этапе размораживания при переносе размороженных эритроцитов в физиологические условия отмечается развитие гемолиза, т.е., происходит дестабилизация клеток. Возможно, одной из причин нестабильности мембран эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, является высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} , обусловленная снижением активности Ca^{2+} -АТФазы на этапе инкубирования клеток с криопротектором перед замораживанием. Известно, что высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} может быть триггером апоптоза [6,7], который ведет к дестабилизации и гибели клеток.

Ингибирующее действие ПЭГ-1500 на Ca^{2+} -АТФазу в эритроцитах, очевидно, обусловлено физико-химическими свойствами данного полимера, который обладает амфифильными свойствами, оказывает дегидратирующее действие на макромолекулы и изменяет поверхностный потенциал раствора [8,9]. Вследствие изменений свойств среды может снижаться текучесть мембран, происходит дегидратация липидов [10,11]. По-видимому, структурные изменения мембраны эритроцитов, обусловленные криопротектором, являются достаточно сложными и устойчивыми, и даже присутствие в среде ферментативной реакции эндогенных модуляторов Ca^{2+} -АТФазы, способных оказывать стимулирующее действие, не может преодолеть ограничения, наложенные модифицированным мембранным окружением, на ее функционирование в мембранной системе.

Список литературы

1. Benaïm, G. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents / G. Benaïm, L. de Meis // FEBS Lett. – 1989. – Vol. 244, №2. – P. 484–486.
2. Inhibition of calmodulin-stimulated (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase activity by dimethyl sulfoxide / E.J. McConnell, M.J. Wagoner, C.E. Keenan, B.U. Raess // Biochem Pharmacol. – 1999. – Vol. 57, №1. – P. 39–44.
3. Землянских, Н.Г. Активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре / Н.Г. Землянских, М.В. Хоменко // Биологические мембраны. – 2006. – Т.23, №6. – С. 484–492.
4. Землянских, Н.Г. Изменения активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов под влиянием пэг-1500 и низких температур / Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук // Цитология. – 2016. – Т.58, №12. – С. 964–970.
5. Calcium in red blood cells – a perilous balance / A. Bogdanova, A. Makhro, J. Wang [et al.]. - // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, №5. – P. 9848–9872.
6. Lang E. Killing me softly – suicidal erythrocyte death / E. Lang, S.M. Qadri, F. Lang // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44, №8 – P.1236–1243.
7. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death / F. Lang, S. M. Huber, I. Szabo, E. Gulbins // Arch. Biochem. Biophys. – 2007. – Vol. 462, №2. – 189–194.
8. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media / J. Chen, S.K. Spear, J. G. Huddleston, R. D. Rogers // Green Chem. – 2005. – Vol. 7, №2. – P. 64–82.
9. Effect of poly (ethylene glycol) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes / A. Herrmann, L. Pratsch, K. Arnold, G. Lassmann // Biochim. biophys. acta. – 1983. – Vol. 733, №1 – P. 87– 94.

10. Lehtonen, J.Y.A. Changes in the lipid dynamics of liposomal membranes induced by PEG / J.Y.A. Lehtonen, P.K.J. Kinnunen // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 66, №6 – P. 1981–1990.
11. Lehtonen, J. Y. Poly (ethylene glycol) - induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes / J. Y. Lehtonen, P. K. Kinnunen // *Biophys J.* – 1995. – Vol. 68, №2. – P. 525–535.

К ВОПРОСУ О ВНЕДРЕНИИ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В УЧРЕЖДЕНИЯХ СЛУЖБЫ КРОВИ

Калинина Е. Н., Пономарева И. В., Порохненко С. Г.*,
Ковтунова М. Е., Кормицикова Е. С., Росина Е. В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)*

**Кировское областное государственное бюджетное учреждение
здравоохранения «Кировский центр крови», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 74)*

TO THE QUESTION OF IMPLEMENTATION QUALITY MANAGEMENT SYSTEMS IN BLOOD SERVICE INSTITUTIONS

Kalinina E. N., Ponomareva I. V., Porochnenko S. G.*,
Kovtunova M. E., Kormshchikova E. S., Rosina E. V.*

*Federal state budget institution of science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and
Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency»,
Kirov, Russia (610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: kalininaen@niigpk.ru, mkovtunova@yandex.ru,
kormschikova@niigpk.ru, rosina@niigpk.ru*

**Kirov regional state budgetary healthcare institution «Kirov center of blood»,
Kirov, Russia (610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 74)
E-mail: kospk@yandex.ru*

Внедрение системы менеджмента качества в учреждениях службы крови является гарантом безопасности крови донорской, ее компонентов и препаратов. Внедрение элементов названной системы позволило стандартизовать методики оценки показателей биологической полноценности и функциональной активности крови донорской и/или ее компонентов, а также повысить качество заготавливаемой продукции.

Ключевые слова: *система менеджмента качества, кровь донорская и ее компоненты, метрологические характеристики, методы оценки*

The introduction of a system of quality management in institutions of blood service is the guarantor of the safety of donor blood, its components and preparations. The introduction of elements of these systems allowed us to standardize assigned characteristics of blood and its components and methods for their determination, as well as to improve the quality of harvested products.

Keywords: *system of quality management, donor blood and its components, metrological characteristics, assessment methods*

Основной задачей учреждений службы крови является выпуск продукции – крови донорской, ее компонентов и препаратов – надлежащего качества. Для реализации этого в субъектах обращения донорской крови и ее компонентов должна быть разработана и внедрена система менеджмента качества, охватывающая все виды осуществляемой деятельности и направленная на обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов.

Важным элементом функционирования системы менеджмента качества в учреждениях службы крови является подтверждение пригодности всех используемых аналитических методик для оценки соответствия показателей биологической полноценности и функциональной активности крови донорской и/или ее компонентов требованиям Технического регламента «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» [1; 1]. Однако до настоящего времени требования к периодичности контроля, объему отбираемых образцов компонентов крови и методикам его осуществления не установлены. Следовательно, определение периодичности и объема контроля качества крови донорской и ее компонентов, оценка метрологических характеристик и обоснование выбора приемлемых методов и аналитических методик актуальны.

Цель работы – оценка эффективности внедрения элементов системы менеджмента качества заготовки крови донорской и ее компонентов в учреждениях службы крови.

В Кировском НИИ гематологии и переливания крови (КНИИГиПК) на первом этапе были систематизированы данные о применяемых методах заготовки и контроля качества крови донорской и ее компонентов, порядке медицинского обследования доноров, лабораторных исследованиях образцов их крови, отводах от донаций. На основании изученных материалов разработан и утвержден в установленном порядке стандарт организации «Кровь донорская и ее компоненты. Требования к заготовке и контролю качества».

В дальнейшем охарактеризована сходимость методик выполнения измерений некоторых показателей качества компонентов крови и подготовлено Заключение о методиках измерения показателей биологической полноценности и функциональной активности крови донорской и ее компонентов. Затем установлены приписанные характеристики методов контроля качества эритроцитных компонентов, разработаны рекомендации «Методы контроля эритроцитных компонентов крови» (Р ФМБА России 18.7-17-2017).

Материалы и методы. Проведен контроль качества 161 образца тромбоцитного концентрата (ТК), 56 образцов свежезамороженной плазмы, 75 образцов эритроцитной массы, 83 образцов эритроцитной взвеси с ресуспендирующим раствором, 20 образцов криоконсервированных эритроцитов.

Результаты. В ходе оценки влияния процедуры инактивации патогенов (ИП) с использованием амотосалена и последующего хранения на показатель рН ТК установлено, что значение рН образцов, подвергнутых ИП, к концу срока хранения имеет тенденцию к снижению у 25% проконтролированных образцов. Средние значения рН исходного ТК составили $7,29 \pm 0,14$, после ИП – $7,25 \pm 0,16$, к концу срока хранения (5 сутки) – $6,58 \pm 0,29$. Вместе

с тем хранение ТК, не подвергнутых ИП, приводило к увеличению рН в 18% случаев: у исходного ТК – $7,16 \pm 0,11$, на 5 сутки хранения – $7,58 \pm 0,22$.

Таким образом, при экспериментальной оценке влияния ИП и длительности хранения ТК на показатель рН сделаны следующие выводы:

- изменение рН ТК до и после ИП незначительно;
- снижение рН происходит при хранении ТК, подвергнутого ИП, в течение срока годности (5 суток);
- при хранении ТК без ИП в течение 5 суток рН повышается.

При выполнении контроля качества установлено, что в некоторых случаях тестируемые образцы компонентов крови не отвечали установленным требованиям. В процессы заготовки компонентов крови внесены необходимые коррективы. Эмпирически определено оптимальное соотношение между антикоагулянтом и компонентом в процессе заготовки и вирусинактивации ТК, увеличено время реадсорбции амтосалена. На процедуры заготовки крови донорской и ее компонентов разработаны внутренние документы (СОП, инструкции и т.д.).

В рамках формирования системы менеджмента качества при обращении крови донорской и ее компонентов на первом этапе работы был определен порядок отбора образцов крови донорской и ее компонентов для осуществления контроля, утвержденный приказом директора института в 2014 году, определены методики выполнения измерений (МВИ), разработаны формы протоколов анализа показателей качества и порядок действий персонала при выявлении отклонений показателей качества от регламентированных норм, создана комиссия по качеству. С 2016 года внедрена система менеджмента качества (СМК), разработан порядок обращения внутренних документов СМК, отраженный в соответствующих инструкциях; в 2017 году создан отдел обеспечения качества, основной задачей которого является разработка и контроль функционирования СМК.

В рамках работы по стандартизации методик оценки показателей биологической полноценности и функциональной активности определен перечень МВИ при осуществлении контроля качества крови донорской и/или ее компонентов и критерии приемлемости на основании приказов Министерства здравоохранения Российской Федерации от 07.02.2000г. № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ» [2; 30] и от 26.05.2003 г. № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» [3; 13].

Следующим этапом работы по определению метрологических характеристик явилось проведение аттестационных экспериментов. Для получения статистически достоверных данных каждое исследование включало 10-12 серий испытаний двумя исследователями. Оценивали пригодность унифицированного метода центрифугирования в гематокритных капилля-

рах и гемиглобинцианидного для определения показателей «гематокрит», «содержание гемоглобина» и «степень гемолиза». С этой целью указанные показатели анализировали в образцах эритроцитной массы и эритроцитной взвеси с ресуспендирующим раствором SAG-M фильтрованной, заготовленных с использованием антикоагулянта CPDA. Максимальные значения коэффициентов вариации МВИ общего гемоглобина, гематокрита и степени гемолиза составили 3,03%, 1,83% и 20,71% соответственно, и во всех случаях соответствовали установленным ранее критериям приемлемости.

На основании МИ 2377-98 «Разработка и аттестация методик выполнения измерений» данные характеристики были приписаны указанным методикам [4; 4].

В дальнейшем это позволило использовать методики с установленными приписанными характеристиками в качестве референсных для оценки возможности применения других методик и расширения номенклатуры методов контроля качества крови донорской и ее компонентов. Так, гемиглобинцианидный метод с приписанной характеристикой 20,71% применяли в качестве референсного для оценки пригодности методик определения степени гемолиза на анализаторах Sismex XT-4000i-1 и НемоСue Hb 201+. Проверку гипотезы о статистической значимости различий осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Данные, полученные с использованием геманализатора Sismex XT-4000i-1, признаны статистически эквивалентными данным референсной методики ($p = 0,19076$), вместе с тем результаты, полученные на портативном анализаторе НемоСue Hb 201+, значительно отличались ($p = 0,00000$), при этом наблюдалось занижение значений степени гемолиза. Сделан вывод о нецелесообразности применения портативного анализатора НемоСueHb201+ для определения степени гемолиза и содержания общего гемоглобина в эритроцитных компонентах крови.

В целом, за период с 2014 по 2016 гг. в ходе метрологической характеристики методик контроля эритроцитных компонентов крови установлены приписанные характеристики методик определения общего гемоглобина и степени гемолиза гемиглобинцианидным методом и бесцианидным SLS-методом с использованием геманализатора Sysmex XT-4000i, доказана статистическая эквивалентность результатов методик. Сделан вывод о непригодности методики фотометрии с применением портативного анализатора НемоСue Hb 201+ для оценки указанных показателей качества. Установлены приписанные характеристики и показано отсутствие статистических различий методик определения гематокрита унифицированным методом и с использованием геманализатора. С 2017 г. проводятся исследования по метрологической характеристике МВИ остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах крови.

Один из элементов системы менеджмента качества – управление оборудованием, включающее в себя метрологическое обеспечение (поверка, калибровка контрольно-измерительного оборудования), квалификацию (ат-

тестацию), техническое обслуживание и ремонт оборудования. Управление оборудованием в КНИИГиПК осуществляется в соответствии с приказами директора института «О правилах сдачи в поверку», «О метрологическом обеспечении» и внутренними документами СМК (стандарт организации «Управление медицинским оборудованием», стандартные операционные процедуры, определяющие порядок работ по квалификации оборудования, инструкции по эксплуатации оборудования).

С учетом научных разработок в КНИИГиПК и Кировском центре крови (КЦК) внедрены некоторые элементы системы менеджмента качества. Проведена оценка эффективности работы этих учреждений по обеспечению качества компонентов крови в условиях действия названной системы. На основании Федерального закона «Об обеспечении единства измерений» от 26.06.2008 г. №102-ФЗ (с изменениями от 13.07.2015г. №233-ФЗ) [5; 1] в КЦК разработан и введен в действие Стандарт организации «Метрологическое обеспечение», в котором отражена краткая схема метрологического обеспечения. В учреждении назначен сотрудник, отвечающий за метрологическую экспертизу методов и средств измерения (СИ), в подразделениях эта работа возложена на заведующих.

В срок до 25 ноября составляется единый список подлежащего метрологическому контролю оборудования и СИ, который включается в соответствующие планы-графики аттестации и поверки. Утвержденный руководителем план-график одновременно передается в отдел контроля качества и сторонней организации, с которой заключен договор на проведение метрологической поверки (аттестации). Большое значение имеет качественное и своевременное обслуживание оборудования. В КЦК эта работа проводится ежедневно, еженедельно или ежеквартально (в соответствии с требованиями документации на определенный вид оборудования) сотрудниками подразделений. При необходимости приглашаются представители инженерной службы. Данные о сервисном обслуживании заносятся в «Журнал обслуживания оборудования». По окончании работы все дозаторы переменного объема и другие СИ обрабатываются для удаления биологических и химических остатков.

Периодичность метрологической аттестации СИ и оборудования в КЦК определяется учреждением в зависимости от условий эксплуатации. При этом все СИ проходят метрологическую поверку ежегодно, а аттестация оборудования имеет особенности. В случаях, когда показатели метрологической аттестации оборудования стабильны, устанавливается межповерочный срок 2 года. Подобная тактика позволяет экономить бюджетные средства. В настоящее время около 15% единиц оборудования имеет данный межповерочный срок.

После метрологической экспертизы выдается «Свидетельство о поверке» на средства измерения и «Аттестат» при аттестации оборудования, номера которых заносятся в статусную этикетку и проставляется дата следу-

ющей метрологической поверки (аттестации). При получении «Свидетельства о непригодности», устанавливается ее причина и возможность проведения ремонта. В случаях, когда оборудование или измерительные средства ремонту не подлежат, составляется служебная записка на имя руководителя о списании, к ней прилагается «Свидетельство о непригодности». Списание с баланса проводится только по решению комиссии учреждения. При этом учитывается срок эксплуатации и данные «Журнала обслуживания оборудования».

Вывод: поэтапное внедрение системы менеджмента качества на основе научно обоснованных рекомендаций позволило обеспечить преемственность процессов заготовки, повысить качество компонентов крови, а также принесло экономический эффект.

Список литературы

1. Технический регламент: О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии: постановление Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 [Электронный ресурс] - режим доступа: <http://www.transfusion.ru/2010/01-30-1.html>, свободный.
2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ» от 07.02.2000 г.
3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» от 26.05.2003 г.
4. МИ 2377-98 Государственная система обеспечения единства измерений. Разработка и аттестация методик выполнения измерений. Введ. 12.08.98.
5. Российская Федерация. Законы. Об обеспечении единства измерений [Электронный ресурс]: [федер.закон: принят Госдумой 11 июня 2008: по состоянию на 12 апр. 2017].- М.: 18 с.- Доступ из информационной системы Консультант-плюс.

ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОСТРАДАВШИХ С ГЛУБОКИМИ ОТМОРОЖЕНИЯМИ КОНЕЧНОСТЕЙ

Кардовский А. Г., Зайцева Г. А., Градобоева Т. Г.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)*

IMMUNOCORRECTION THERAPY IN TREATMENT OF PATIENTS WITH DEEP FROSTBITE OF LIMB

Kardovsky A. G., Zaytseva G. A., Gradoboeva T. G.

*Federal state budgetary sciences institution «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal medical-biological Agency», Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: al.cardovscky@yandex.ru, zayiseva@niigpk.ru*

Течение глубоких отморожений конечностей сопровождается выраженными нарушениями иммунной системы. Включение отечественного иммуномодулирующего препарата «Полиоксидоний» в комплексную терапию данных пострадавших улучшало исходы их лечения, что подтверждалось клиническими данными и положительной динамикой и нормализацией показателей клеточного, гуморального иммунитета и факторов неспецифической резистентности организма.

Ключевые слова: *отморожение, конечность, иммунитет, иммунотерапия, ампутация, «Полиоксидоний»*

The course of deep frostbite of the limbs is accompanied by severe disorders of the immune system. Including Russian immunomodulating preparation «Polyoxidonium» in the complex treatment of the affected patients improved the outcomes of the disease, which was confirmed by clinical data, positive dynamics and normalization of cellular, humoral immunity and factors of nonspecific resistance of the organism.

Keywords: *frostbiting, limbs, immunitet, immunotherapy, amputation, «Polioxidonium»*

Патогенез развития отморожений достаточно сложен и многообразен. Острая холодовая травма является мощным стрессом, запускающим весь комплекс защитных механизмов организма. Ключевым аспектом служит то, что вследствие холодового воздействия происходит нарушение гемореологии пораженных тканей, выражающееся увеличением вязкости крови, гиперкоагуляционным синдромом, заканчивающееся тромбозом и омертвением пораженных конечностей. Это, естественно, влечет за собой развитие выраженных инфекционно-воспалительных осложнений [1, 2, 3]. Иммунная система отвечает за постоянство функционирования ее клеточного и гуморального звеньев, а также факторов неспецифической резистентности организма. Работа этой системы обеспечивает защиту организма от внедрения чужеродных агентов, уничтожение поврежденных клеток с последующей элиминацией всех образующихся биологических продуктов в условиях различных инфекционно-воспалительных процессов.

Проведенные нами исследования [4] выявили существенные нарушения во всех звеньях иммунной системы. У преобладающего большинства пациентов уже в раннем реактивном периоде регистрировались признаки ее недостаточности. В последующем с развитием инфекционно-воспалительных процессов, обусловленных некробиотическими изменениями пораженных тканей, явления иммунодефицита сохранялись, а некоторые из них усугублялись в позднем реактивном периоде холодовой травмы. Следовательно, в комплексном лечении пострадавших с глубокими отморожениями конечностей необходимо проведение специфических иммунореабилитационных мероприятий.

В литературе последних лет представлены данные о применении иммуномодулирующих препаратов при лечении больных с острой общей холодовой травмой – эпиталамина и тималина [5], эпиталона и кортексина [6]. Однако отсутствуют сообщения об использовании отечественного иммуномодулятора нового поколения полиоксидония при лечении пострадавших с глубокими отморожениями конечностей. Этот препарат разработан в Институте иммунологии и, помимо иммуномодулирующих свойств, обладает мембранопротекторным, детоксицирующим и антиоксидантным действием [7].

Иммуномодулирующий эффект полиоксидония связан с его преимущественным воздействием на клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы, моноциты/макрофаги, естественные киллеры и опосредованно – на клетки приобретенного иммунитета – В- и Т-лимфоциты. Следствием этого является усиление способности фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов) поглощать и убивать патогенные микроорганизмы, а повышение функциональных свойств естественных киллеров, осуществляющих элиминацию в организме чужеродных клеток, стимулирует синтез моноцитами и лимфоцитами ряда цитокинов, усиливающих продукцию В-лимфоцитами антител и функциональную активность Т-клеток [8]. Полиоксидоний является уникальным иммуномодулирующим препаратом, сочетающим в себе много положительных качеств. Он не имеет противопоказаний к применению, не вызывает возникновения осложнений и побочных реакций, его использование можно сочетать с различными лекарственными средствами (за исключением других иммуномодуляторов и стимуляторов иммунитета).

В настоящей работе приведены результаты включения иммунокорригирующей терапии в комплексное лечение пострадавших с глубокими отморожениями конечностей. Под наблюдением находилось 37 больных в возрасте от 21 до 62 лет, которые были разделены на 2 группы. Первую группу составили 19 пострадавших, которые поступили в ранние сроки после получения местной холодовой травмы - дореактивном и в первые часы раннего реактивного периода. После наложения теплоизолирующих повязок на пораженные сегменты и с информированного согласия больного осуществлялось внутриартериальное введение в пораженные конечности лекар-

ственных препаратов 1 раз в сутки. Путем пункции плечевой или бедренной артерии каждой конечности вводили смесь следующего состава: новокаин 0,25%-10,0, никотиновая кислота 1%-2,0, пентоксифиллин (трентал) 2%-5,0, гепарин 5000 ед., в другом шприце - эуфиллин 2,4% - 2,5. После этого продолжали инфузионно-трансфузионную терапию, включающую 500 мл волювена, углеводно-кристаллоидные растворы в среднем объеме до 2 л в сутки, 4,0 1% раствора никотиновой кислоты, 10,0 2,4% раствора эуфиллина и гепарин 20 000 ед. в сутки через 4 часа. Такая терапия продолжалась в течение 5 суток. В последующем осуществлялось внутримышечное введение иммуностропного препарата полиоксидоний в дозе 6 мг в течение 5 дней.

Вторую группу (сравнения) составили 18 человек. Предыдущими нашими исследованиями и работами других авторов [3, 9, 10] установлено, что использование внутриартериального введения лекарственных препаратов в поздние сроки поступления больных в стационар (через 2-3 суток после получения местной холодовой травмы) не эффективно. Поэтому именно в связи с поздней госпитализацией в специализированное медицинское учреждение лечение данной категории пострадавших проводилось без внутриартериального введения препаратов и включало в себя дезинтоксикационные, противовоспалительные, симптоматические средства и хирургические мероприятия. Этим пострадавшим полиоксидоний в лечении не применялся.

Лабораторные исследования крови проводили четырехкратно – при поступлении больного в стационар до введения препаратов, после проведения курса лечения (5 суток), в динамике наблюдения (10-15 суток) и перед выпиской. В группе сравнения соблюдались такие же сроки обследования.

Клеточные показатели иммунитета у всех пострадавших оценивали методом проточной цитофлуорометрии на приборе FACS Canto II: определяли содержание в периферической крови CD3, CD19-лимфоцитов и основных субпопуляций Т-клеток – CD4, CD8, CD16, CD56, HLA-DR исследовали также уровень иммуноглобулинов основных классов G, A, M, концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), фагоцитарную функцию нейтрофилов (ФАН и ФИ), в том числе, активность кислородзависимого киллинга (НСТ – тест), оценивали состояние гуморальных факторов естественной резистентности – активность сывороточного лизоцима, бета-лизинов [11].

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Об эффективности комплексной терапии судили по числу и уровню производимых ампутаций, которые подразделялись на минимальные (в пределах фаланг пальцев) и максимальные (уровень пястных, плюневых костей и проксимальнее их), а также по изменениям иммунологических показателей.

В первой группе наблюдавшихся был получен отчетливый клинический эффект при использовании внутриартериального введения указанных препаратов с последующим введением полиоксидония. Ни у одного больного не было выполнено калечащих операций - уровень голени, предплечий и проксимальнее. У 10 пострадавших лечение закончилось выздоровлением без ампутаций и у 9 выполнены операции с минимальным уровнем. В группе сравнения один больной умер от сопутствующих заболеваний и осложнений, связанных с длительным употреблением алкоголя и его суррогатов, у 11 пострадавших по жизненным показаниям в связи с омертвением тканей произведены калечащие операции с максимальным уровнем (граница средней и нижней трети голени), влекущих за собой инвалидизацию, и 6 пациентам выполнена ампутация пальцев кистей и стоп по минимальному уровню. Результаты и объемы оперативного лечения представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Количество и уровень операций у больных с отморожениями конечностей

Группы больных	Число больных	Без ампутации	Минимальный уровень ампутаций	Максимальный уровень ампутаций	Умерли
Первая	19	10	9	–	–
Вторая	18	–	6	11	1

Результаты, приведенные в таблице, наглядно указывают на высокую эффективность предложенного комплексного лечения пострадавших с глубокими отморожениями конечностей с использованием инфузионно-трансфузионной терапии и применением иммуномодулятора полиоксидония.

Изучение состояния иммунной системы у пострадавших с глубокими отморожениями конечностей выявило существенные нарушения показателей клеточного и гуморального иммунитета, а также факторов неспецифической резистентности организма.

У преобладающего большинства пациентов уже в раннем реактивном периоде регистрировались признаки дисфункции иммунной системы. У больных обеих групп отмечен выраженный лейкоцитоз $-14,5 \times 10^9/\text{л}$ при поступлении в стационар. После комплексной терапии с применением инфузионной терапии и введением полиоксидония происходило статистически значимое его снижение с дальнейшей положительной динамикой. В группе сравнения это отмечено только при выписке больных из стационара. Выявлено снижение количества лимфоцитов до 18% при поступлении у всех пострадавших с постепенной нормализацией показателей в процессе лечения у больных первой группы до 30%, в отличие от группы сравнения.

Изменения содержания CD3-клеток были незначительны и не выходили за пределы нормы (60-80%) , в то же время количество В-лимфоцитов (CD19) в группе сравнения было ниже нормальных величин и в динамике

наблюдения продолжало снижаться до $6,0 \pm 0,41\%$ (при норме 8-15%) к моменту выписки пациентов из стационара. При использовании разработанного комплексного лечения с введением полиоксидония такого снижения В-клеток не происходило, оно составляло $8,6 \pm 0,45\%$, изменения показателей достоверно значимы.

Содержание NK-клеток ($CD3^+CD16^+ / CD56^+$ - норма 9,0-17,0%) и Т-NK ($CD3^+CD16^+ / CD56^+$ - норма 0 - 7,0%) при поступлении в стационар у пострадавших было выше нормальных величин. После курсового проведения предложенного комплексного лечения с применением полиоксидония отмечено статистически значимое увеличение количества натуральных киллеров с $12,7 \pm 1,03$ до $17,9 \pm 1,39\%$, в то время как в группе сравнения оно снижалось с $14,2 \pm 1,16$ до $10,9 \pm 1,31\%$. Это связано с развитием некробиотических процессов, обусловленных холодовым поражением тканей.

При исследовании показателей гуморального иммунитета выявлено повышение уровня иммуноглобулинов классов G (норма - $11,0 \pm 0,15$ г/л), А (норма - $2,2 \pm 0,04$ г/л) уже в раннем реактивном периоде, а иммуноглобулинов класса М (норма - $1,6 \pm 0,04$ г/л) в более поздние сроки течения отмождений. После курсового применения полиоксидония отчетливые изменения найдены в содержании иммуноглобулинов всех классов. Концентрация Ig G достоверно повышалась с $14,2 \pm 0,91$ до $23,6 \pm 1,40$, Ig А с $2,8 \pm 0,21$ до $3,9 \pm 0,25$, Ig М с $1,3 \pm 0,11$ до $2,4 \pm 0,16$, что можно рассматривать как защитную реакцию организма на развитие инфекционно-воспалительных процессов в тканях, подвергнувшихся холодовому воздействию. У пострадавших группы сравнения такой положительной динамики исследуемых показателей не отмечено.

Выраженные нарушения затрагивали и факторы неспецифической резистентности организма пострадавших с глубокими отморожениями конечностей. Выявлено снижение процента фагоцитирующих нейтрофилов (норма - $79,0 \pm 1,3\%$) и фагоцитарного индекса (норма - $8,0 \pm 0,2$) у всех обследованных, причем, у больных, которым применялось разработанное комплексное лечение, после введения полиоксидония отмечено достоверное повышение ФАН с $53 \pm 2,7$ до $67 \pm 3,3\%$ и ФИ с $8,1 \pm 0,32$ до $9,0 \pm 0,31$ ед, в то время как в группе сравнения эти показатели статистически достоверно продолжали снижаться во все сроки наблюдения, вплоть до выписки пациентов из стационара. Состояние фагоцитарной системы позволяет оценить и НСТ-тест, который по способности поглощать нитросиний тетразолий отражает метаболический потенциал фагоцитирующих клеток крови. Показатели НСТ-теста (норма $12,2 \pm 1,2\%$) были выше нормальных величин, что подтверждает развитие у пострадавших инфекционно-воспалительных процессов, обусловленных некробиотическими изменениями пораженных тканей. У больных, которым вводился полиоксидоний, при выписке из стационара отмечена нормализация теста с $17 \pm 1,6$ до $12 \pm 1,3\%$, что свидетельствует о стихании воспалительных процессов. У пострадавших группы

сравнения подобного не происходило и во все сроки наблюдения значения НСТ-теста оставались повышенными ($15 \pm 1,3$ – $17 \pm 1,6\%$). Применение полиоксидония, безусловно, свидетельствует об увеличении функциональной активности нейтрофилов и повышении иммунореактивности организма.

Таким образом, включение полиоксидония в комплексное лечение пострадавших с глубокими отморожениями конечностей улучшало исходы их лечения, что подтверждается клиническими данными и результатами иммунологических исследований. Отмечена положительная динамика и нормализация показателей клеточного, гуморального иммунитета и факторов неспецифической резистентности организма. Высокий иммуномодулирующий эффект и отсутствие осложнений и побочных реакций при применении полиоксидония позволяют рекомендовать его включение в комплексное лечение больных с глубокими отморожениями конечностей.

Список литературы

1. Вихриев, Б.С. Местные поражения холодом / Б.С. Вихриев, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов. – Л.: Медицина, 1991. – 192 с.
2. Котельников, В.П. Отморожения // М.: Медицина, 1988. – 256 с.
3. Мурадян, Р.И. Отморожения конечностей / Р.И. Мурадян, С.В. Смирнов. М.: Медицина, 1984. – 112с.
4. Кардовский, А.Г. Иммунный статус у больных с глубокими отморожениями конечностей / А.Г. Кардовский, Г.А. Зайцева, И.А. Пепеляев и [др.] // Тезисы Всероссийской науч.- практ. конф. «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (5-6 июля 2011 г., г. Санкт-Петербург). – Трансфузиология. – 2011. - №2, т. 12. – С. 68.
5. Сизоненко, В.А. Биорегулирующая терапия у больных с острой холодовой травмой / В.А. Сизоненко, Б.И. Кузник, Ю.А. Витковский, В.И. Подойницина // Третья научная конференция по проблеме «Холодовая травма» (18 апреля 2002 г.). С.-Пб., 2002. – С. 68-70.
6. Сизоненко, В.А. Влияние эпиталона и кортексина на состояние клеточного иммунитета при острой общей холодовой травме / В.А. Сизоненко, В.В. Ковалев, К.Г. Шаповалов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. - №5 (57). – С. 34.
7. Пинегин, Б.В. Отечественный иммуномодулятор «Полиоксидоний»: механизм действия и клиническое применение / Б.В. Пинегин, А.С. Сараф. – М. – 2000. – 94 с.
8. Хаитов Р.М. Современные представления о механизме действия полиоксидония / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2005. – Т. 26, № 4. – С. 197-200.
9. Вихриев, Б.С. Проблемы лечения отморожений / Б.С. Вихриев, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов // Казанский мед. ж. т. 68.– 1987.- № 6. – С. 411-414.
10. Кардовский, А.Г. Комплексное лечение отморожений конечностей / А.Г. Кардовский, И.А. Пепеляев, А.Г. Оноприенко // Третья научная конференция по проблеме «Холодовая травма» (18 апреля 2002 г.) – С.-Пб., 2002. - С. 37-39.
11. Оценка иммунной системы при массовых обследованиях: (Методические рекомендации для научных сотрудников и врачей практического здравоохранения) [Разработаны сотрудниками института иммунологии Минздрава России Р.В. Петровым, Р.М. Хаитовым, Б.В. Пинегиным и др.] // Иммунология. – 1992. - №6. – С. 51-62.

ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСФУЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ В ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ

Ковтунова М. Е., Шерстнев Ф. С., Утемов С. В.

*ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)*

ORGANIZATION OF TRANSFUSIOLOGY IN EMERGENCIES

Kovtunova M. E., Sherstnev F. S., Utemov S. V.

*Federal state budget institution of science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and
Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency», Kirov, Russia
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: mkovtunova@yandex.ru, sherstnyov_phil@mail.ru, utemovs@mail.ru*

Трансфузионная терапия является неотъемлемой составляющей медицинской помощи при чрезвычайных состояниях. Около 30% пострадавших при различных катастрофах нуждается в инфузионной и около 15% - в трансфузионной терапии. Трансфузиологическая помощь при чрезвычайных ситуациях должна быть плановой, непрерывной и начинаться на ранних этапах медицинских мероприятий. Целесообразно заготавливать кровь и ее компоненты в учреждениях (подразделениях) службы крови, находящихся на территории возникновения экстремальной ситуации. Управление потоками трансфузионных средств должно быть централизованным с использованием компьютерной информационно-аналитической системы. Неукоснительно должны соблюдаться нормативные требования, касающиеся всех этапов оказания трансфузиологической помощи.

Ключевые слова: трансфузиологическая помощь, служба крови, криоконсервирование, чрезвычайные ситуации

Transfusion is a key part of medical help during calamity. About 30% of injured in different natural disasters require fluid resuscitation and about 15% need transfusion. Organization of transfusion therapy should be well-planned, continuous and started on early stages of medical help. It is reasonable to produce blood components, using facilities of local blood banks. Logistics of blood and blood components should be centralized and automated computer system assisted. All blood banking regulations should be fulfilled on every stage of transfusion support.

Keywords: transfusion support, blood banking, cryopreservation, emergency

Мировой опыт показывает, что судьба пострадавших при катастрофах определяется организацией медицинской помощи, которая при чрезвычайных ситуациях (ЧС) во многом напоминает военно-полевую медицинскую помощь. Трансфузионная терапия является ее неотъемлемой составляющей.

Учитывая масштабы потребности в гемотрансфузионных средах при ЧС, обеспечение ими должно рассматриваться как социально значимая государственная проблема. При этом немаловажными определяющими факторами служат причины возникновения катастрофы и ее объем. От этого зависят характер повреждений и потребность в трансфузиологической помощи.

Оказание медицинской помощи в условиях катастроф должно быть спланированным. По данным зарубежных специалистов, при плановой медицинской помощи удается спасти 20% лиц, которые могли бы погибнуть при стихийном ее оказании [13]. По мнению экспертов ВОЗ, в совершенствовании системы оказания медицинской помощи существенными являются организационные мероприятия, которые должны иметь научное обоснование [11, 15, 17].

Известно, что потребность в трансфузионной терапии зависит от вида чрезвычайной ситуации. Так, при землетрясении около 80% пострадавших нуждаются в трансфузиологической помощи, при пожаре – 90%, при военных конфликтах – 20-30%.

Также как при организации лечебных мероприятий в основе оказания инфузионно-трансфузионной терапии (ИТТ) лежит проверенная временем военно-медицинская доктрина, которая базируется на следующих принципах:

- единое понимание патологического процесса, происходящего в организме пострадавшего;
- единые взгляды на методы лечения и профилактики осложнений;
- своевременность, преемственность и последовательность выполнения медицинских мероприятий на этапе эвакуации;
- ведение медицинской документации на всех этапах.

Только такой подход может обеспечить качество оказания медицинской помощи в условиях ЧС.

Организация деятельности учреждений службы крови в условиях чрезвычайных ситуаций

Чрезвычайно важным для работы учреждений службы крови при ЧС является быстрота реагирования и развертывания ее подразделений. При этом оптимально заготовку крови и ее компонентов производить в ближайших к месту катастрофы учреждениях службы крови. Качество заготовки гемокомпонентов и безопасность донорства не должны страдать, соблюдение приказов по медицинскому обследованию доноров, заготовке крови и ее компонентов, их апробации, консервированию, хранению, транспортировке и клиническому применению обязательно.

Управление потоками трансфузионных средств должно быть централизованным с использованием компьютерной информационно-аналитической системы. Центр управления службой крови и трансфузиологической помощью оперативно контролирует ситуацию и направляет действия медиков и соответствующих служб МЧС. В оперативном управлении центра должен быть запас инфузионно-трансфузионных сред, оборудования и расходных материалов на 1-2 дня работы. В случае отсутствия такового запаса требуется дополнительное развертывание помещений для массовой заготовки крови в территориальных центрах крови.

Для организации заготовки крови и ее компонентов необходимо нала-

диль учет масштаба катастрофы, числа пострадавших, характера травматизма и объема необходимой трансфузиологической помощи. Обязательным условием для планомерной организации транспортировки и хранения значительных объемов гемотрансфузионных сред является наличие достаточного количества транспорта и специальных контейнеров. Поэтому должно быть создано информационное поле для взаимодействия всех служб, позволяющее осуществлять:

- непрерывное автоматическое отслеживание имеющихся запасов трансфузионных сред в центрах крови;
- оперативную передачу в центры управления информации о потребностях ЛПУ и полевых госпиталей в трансфузионных средах, материалах и оборудовании;
- обеспечение баланса между запасами и потребностями с учетом времени и маршрута доставки, полноты удовлетворения потребности;
- автоматическое распределение среди центров крови экстренных заявок по неудовлетворенным потребностям ЛПУ в инфузионно-трансфузионных средах, передача этих заявок и отслеживание их исполнения;
- автоматическое прогнозирование необходимых объемов и структуры требующихся трансфузионных сред на основании поступивших сведений об объеме и квалификации катастрофы, формирование дополнительных заявок;
- автоматический поиск доноров с редкими группами крови на территории региона.

В условиях ЧС деятельность службы крови должна обеспечиваться за счет стационарных центров крови (станций переливания крови), специализированных бригад переливания компонентов крови (служба ГО) и трансфузиологических бригад экстренной специализированной медицинской помощи (формирования).

Для участия в ликвидации медико-санитарных последствий катастроф на федеральном, региональном, территориальном, местном и объектовом уровнях за счет имеющихся лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений Минздрава России создаются (привлекаются) нештатные формирования Службы медицины катастроф. На федеральном и региональном уровнях основными формированиями являются бригады специализированной медицинской помощи (БСМП).

Из опыта работы в условиях катастроф конца прошлого – начала нынешнего столетия оказалось, что при планировании медицинского обеспечения нецелесообразно предусматривать заготовку крови в непосредственной близости от района ЧС. Например, при ликвидации последствий землетрясения в Армении формирование донорских контингентов и заготовка донорской крови практически были неосуществимы из-за стрессового состояния населения и разрушений. Также отмечено, что созданных запасов свежезамороженной плазмы, эритроцитов (в том числе, банка эри-

троцитов редких групп крови) оказалось недостаточно для бесперебойного снабжения лечебных учреждений. При оказании ИТТ в Чечне оказалось, что наиболее часто возникали проблемы в основном организационного характера:

- обеспечение медицинских формирований передовых эшелонов компонентами крови и кровезаменителями из медицинских учреждений тыла;
- организация хранения доставленных гемотрансфузионных средств на месте;
- возможность заготовки донорской крови медицинскими учреждениями и формированиями в непосредственной близости от театра боевых действий.

По данным литературы [16], после изучения в странах НАТО оптимальных методов хранения эритроцитов для ЧС, пришли к выводу, что в настоящее время наиболее приемлемым для использования в военной и гражданской программах снабжения кровью является долгосрочное хранение эритроцитов в банках крови. С 1985 года утверждена модернизированная программа по снабжению кровью вооруженных сил НАТО. Ключевым ее моментом является криоконсервирование компонентов крови и транспортировка их на большие расстояния. Более 20 000 доз замороженных эритроцитов складированы для возможного обеспечения боевых действий, а также на случай промышленных катастроф и стихийных бедствий [2].

Свою эффективность эта программа продемонстрировала во время проведения ряда войсковых операций ВМС США последних лет (снабжение кровью операции «Правое дело» в Панаме, оказание гуманитарной помощи Филиппинам во время государственного переворота и последующего землетрясения, а также при проведении операций «Щит в пустыне»). В период операции «Буря в пустыне» в район Персидского залива были доставлены 73 180 доз эритроцитов.

К настоящему времени доказана эффективность использования криоконсервирования эритроцитов при создании резерва трансфузионных сред при массовом поступлении раненых и пострадавших, использовании программ предоперационного аутодонорства, для карантинизации эритроцитов, для хранения эритроцитов с последующим производством реагентов для иммуногематологических исследований, а также для обеспечения гемокомпонентами военно-медицинских учреждений при выполнении миротворческих или военных операций. В этих случаях используют различные методы замораживания эритроцитов в широком диапазоне температур (-25°...-196°С) [4, 5]. В последние годы в трансфузиологическую практику внедрены методы замораживания эритроцитов с использованием электрохолодильников. Однако в нашей стране криоконсервирование с применением жидкоазотного оборудования широко используется для долгосрочного хранения эритроцитов, что обусловлено особенностями эксплуатации криогенной техники, наличием значительного научно-практического опыта и

разработанных нормативных документов, возможностью длительного сохранения морфофункциональных свойств замороженных клеток крови.

В Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови банк долгосрочного хранения крови и ее компонентов функционирует около 40 лет. За этот период были предложены методы криоконсервирования биообъектов с использованием различных температурных режимов: от низких ($-40 \div 60^\circ\text{C}$) до ультранизких (-196°C). Разработаны технические средства для защиты полимерных контейнеров от внешнего воздействия, комплекты-укладки для оказания трансфузионной терапии в условиях ЧС (защищены патентами). Имеется опыт хранения в течение 30 лет биологически полноценного биоматериала.

В настоящее время в институте разрабатываются методы консервирования гемокомпонентов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с использованием новых комбинированных криопротекторов эндо- и экзоцеллюлярного действия, не требующих отмывания. Основной задачей криобанка является создание запасов эритроцитов и тромбоцитов различных групп крови, в том числе типированных по антигенам систем HLA и HPA.

На сегодняшний день в криобанке института находится на длительном хранении 827 доз эритроцитной массы различной групповой принадлежности, в том числе хранящиеся в электроморозильниках при температуре -80°C - 510 доз и 317 – при -196°C . В условиях температуры жидкого азота хранится 2439 единиц донорского тромбоцитного концентрата.

Важнейшей задачей медицины катастроф является оказание своевременной адекватной трансфузиологической помощи, неотъемлемой частью которой служит обеспечение качественными гемокомпонентами. В соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к трансфузионной терапии в условиях ЧС, она должна начинаться на ранних этапах оказания медицинской помощи, быть непрерывной с учетом иерархии трансфузионных сред. По данным П.Г.Брюсова, ранняя ИТТ больных с шоком и кровопотерей свыше 40% ОЦК позволяет снизить летальность пострадавших с 70% до 2,5% [1].

Известно, что из общего числа раненых и пострадавших в локальных вооруженных конфликтах в гемотрансфузионной терапии нуждается до 20% от общего числа санитарных потерь. Сложность лечения больных с кровопотерей обусловлена генерализованными расстройствами циркуляции и метаболизма, возникающими в организме в результате потери крови, эмоциональными, болевыми и другими стрессовыми воздействиями. Использование кровезаменителей - это временное средство, которое позволяет лишь отсрочить проведение гемотрансфузионной терапии.

Инфузионно-трансфузионная терапия проводится поэтапно, причем существенное значение приобретает раннее применение свежезамороженной плазмы с целью предупреждения или устранения ДВС-синдрома. Максимально раннее начало проведения мероприятий инфузионно-трансфузи-

онной терапии зачастую предопределяет благоприятный прогноз лечения пострадавшего. В Афганистане у раненых с артериальным давлением ниже 70 мм. рт. ст., которым на догоспитальном этапе инфузионная терапия не проводилась, летальность составила 67%, а при ее осуществлении в полном объеме – показатель снижался до 25%.

Опыт оказания трансфузиологической помощи в условиях современных военных конфликтов показал, что в связи с увеличением числа минно-осколочных ранений, возросло количество пострадавших с шоком и острой кровопотерей. Это привело к повышению потребности в трансфузиях компонентов крови. Однако проблемы своевременного оказания гемокомпонентной терапии были связаны с неэффективной организацией их заготовки, транспортировки и хранения, а также квалификацией персонала [10].

При локальных ЧС малой интенсивности оказание адекватной трансфузиологической помощи силами и средствами осуществляется в соответствии со штатами и обеспечением местных учреждений службы крови и медицинских учреждений, но с более интенсивной нагрузкой. В условиях крупных катастроф для оказания трансфузиологической помощи требуется приток не только медицинских средств, человеческих сил, но и принципиально другой организационной тактики.

Формированиями, призванными оказывать трансфузиологическую помощь при различного рода катастрофах, являются трансфузиологические БСМП. Они предназначены для выполнения инфузионно-трансфузионной экстренной интенсивной терапии, лечебного плазмафереза, гемодиализа и гемосорбции пострадавшим. БСМП создаются решением территориального органа здравоохранения на базе институтов, центров крови (станций переливания крови), гематологических центров. В состав бригады входят: руководитель бригады (врач-реаниматолог) - 1, врач-хирург-трансфузиолог - 1, врач-терапевт-организатор по заготовке крови от доноров - 1, врач-нефролог - 1, врач-лаборант - 1, старшая медицинская сестра (гемодиализ, заготовка крови, плазмаферез) - 1, медицинская сестра (анестезист) - 1, фельдшер-лаборант - 1; всего 8 человек.

Объем медицинской помощи трансфузиологической бригады включает:

- проведение трансфузионной терапии, лечебного плазмафереза, гемодиализа, гемосорбции;
- определение групповой и резус-принадлежности крови доноров и пострадавших;
- медицинское освидетельствование доноров;
- проведение биологической пробы и проб на совместимость при переливании крови и ее компонентов, на реактогенность - кровезаменителей;
- заготовка и апробация донорской крови и ее компонентов.

Бригада работает автономно. Запас трансфузионных средств должен быть как минимум на 1 сутки работы. За 12 часов работы БСМП может ока-

зять помощь до 50 пострадавшим.

Кроме высокой квалификации специалисты БСМП должны иметь опыт совместной работы, в том числе в условиях чрезвычайных ситуаций. Поэтому рекомендуется таким бригадам работать и в обычное время. Принципиально важно при формировании бригад учитывать психологическую совместимость работников. В обязательном порядке должны быть разработаны и утверждены отраслевые или ведомственные стандарты применения трансфузионных сред при различных травмах и инструктивно-методические материалы по организации службы крови и трансфузиологической помощи при катастрофах. Действует единая трансфузиологическая доктрина, заключающаяся в том, что независимо от школы и мнения, врачи должны одинаково соблюдать стандартные программы трансфузионной терапии, утвержденные для медицины катастроф в зависимости от нозологического фактора и показаний к ИТТ.

Принципы оказания ИТТ сводятся к следующим:

- трансфузиологическая помощь должна быть максимально приближена к месту катастрофы для оптимальной помощи пострадавшим;
- трансфузиологическая помощь должна быть непрерывной, в том числе при транспортировке пострадавших до момента оказания квалифицированной специализированной помощи;
- ИТТ не должна быть причиной задержки эвакуации;
- в ситуации, когда необходимо сделать выбор, предпочтение отдается тем пострадавшим, которым трансфузионная терапия может помочь выжить;
- нельзя тратить силы на обреченных и тех, кто может выжить без трансфузионной терапии;
- в чрезвычайной ситуации используют максимально упрощенные и стандартизированные программы трансфузионной терапии. Ориентир – на применение кровезаменителей и средний медицинский персонал, который, в основном, будет реализовывать трансфузионную терапию;
- показания и задачи оказания трансфузиологической помощи должны быть стандартными для каждого этапа медицинской эвакуации;
- использование бригадного принципа организации и проведения трансфузиологической помощи (натренированные специалисты).

Показания к назначению инфузионно-трансфузионной терапии пострадавшим

Показаниями к ИТТ являются обезвоживание различной этиологии, острая кровопотеря, травматический и ожоговый шок, а также другие состояния, требующие коррекции ОЦК, реологических свойств крови, микроциркуляции, показателей водно-солевого баланса, кислотно-щелочного состояния крови и транспорта кислорода. В период транспортировки пострадавших в лечебные учреждения ИТТ должна обеспечивать устранение гиповолемии (полное или частичное), стабилизацию гемодинамики, при

этом трансфузиологические мероприятия не должны быть причиной задержки эвакуации. Во время транспортировки продолжают проведение ИТТ.

ИТТ на этапе оказания квалифицированной медицинской помощи является необходимой составной частью комплексных лечебных мероприятий, направленных на устранение нарушений основных показателей гомеостаза и профилактику осложнений. Для определения характера и степени тяжести патофизиологических сдвигов, требующих коррекции с помощью ИТТ, наряду с общеклиническими признаками, используют данные лабораторных и инструментальных методов обследования, а также некоторые расчетные показатели. Особое внимание следует уделить виду и степени тяжести обезвоживания, величине кровопотери, гипоальбуминемии, сдвигу показателей кислотно-щелочного состояния, электролитного состава, характеру нарушений сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной систем, а также степени выраженности печеночно-почечной недостаточности, эндотоксикоза. При этом учитывается характер инфузий предыдущего этапа. На основании полученных данных назначается ИТТ, в основу которой положены 4 основных принципа, заключающиеся в определении показаний к ИТТ, выборе инфузионно-трансфузионных сред, необходимого объема, метода и способа их введения.

Учитывая дефицит времени и ситуацию, показания к назначению ИТТ рекомендуется определять по нозологическому принципу (характеру повреждения):

- кровопотеря, связанная с повреждением магистральных кровеносных сосудов, родами, абортами, операциями;
- травматический шок + травма тканей;
- синдром длительного сдавления (травматический токсикоз);
- ожоговая болезнь;
- лучевая болезнь;
- экзотоксикоз (химическая травма);
- эндотоксикоз (осложнение других видов травм);
- постгеморрагическая анемия (не всегда своевременно удается остановить кровотечение);
- вторичные расстройства гемостаза при травмах, родах, абортах, операциях;
- гнойная анаэробная инфекция;
- нарушение обменных процессов (нарушение водного обмена в жару, белкового обмена);
- обеспечение парентерального питания;
- замедленное заживление ран;
- комбинированная травма.

При тяжелом шоке и массивной кровопотере восстановление ОЦК и жизненно важных показателей гемодинамики достигается струйным вве-

дением в периферическую или центральную вену солевых инфузионных растворов (мафусол, лактасол и др.), а в другую вену — коллоидных протившоковых растворов. Объемная скорость вливания растворов первоначально (до стабилизации АД на уровне 90 мм рт.ст.) должна составлять 150-200 мл/мин, после чего переходят на струйно-капельное или капельное введение. Пострадавшим в терминальном состоянии требуется не просто струйное вливание, а нагнетание под давлением, чтобы обеспечить суммарную скорость введения раствора не менее 250 мл/мин. При этом клинический эффект (четко определяемое систолическое АД) должен быть получен в ближайшие 5 мин, а стабилизация АД на уровне 90 мм рт.ст. — в последующие 10 мин. Если на предыдущих этапах пострадавшему вводили синтетические коллоидные кровезаменители в объеме 0,8-1,0 л (20-33 мл/кг), то эти средства повторно использовать не следует.

Препаратами выбора являются 5-10% растворы альбумина, а также производные желатина [7]. Принципиально важно, чтобы их назначению предшествовало введение достаточных объемов глюкозы и солевых растворов. Из электролитных растворов предпочтительны готовые буферные растворы.

Назначение ИТТ в первые же минуты после поступления пострадавшего в лечебное учреждение позволяет стабилизировать центральную гемодинамику, восстановить нарушенную перфузию органов, улучшить микроциркуляцию и тем самым создать условия для выполнения необходимого оперативного вмешательства. Эффективность ИТТ, проводимой на данном этапе, оценивают по показателям АД, ЦВД, а также по восстановлению диуреза. В случаях позднего (через 4 ч и более) поступления пациента, не получавшего ИТТ на догоспитальном этапе, когда резервы организма по поддержанию центрального кровообращения истощены, программа лечения разрабатывается индивидуально на той же первоначальной основе. В случае развития почечной, а в поздние сроки — полиорганной недостаточности лечебные мероприятия могут оказаться уже не эффективными [8,9,12].

В процессе хирургического вмешательства, предпринимаемого для ликвидации причин, вызвавших шок, а также для окончательной остановки кровотечения, ИТТ также направлена на возмещение кровопотери. Однако на данном этапе (во время операции) обязательно вводят 5-10% раствор альбумина и свежезамороженную плазму.

После окончательной остановки кровотечения (на заключительном этапе операции) требуется нормализовать газотранспортную функцию крови, нарушенную в связи с дефицитом объема циркулирующих эритроцитов, а также устранить нарушения гемостаза. При массивной кровопотере это может потребоваться и раньше (при подготовке к оперативному вмешательству).

При расчете потребности в гемотрансфузионных средах необходимо учитывать не только характер повреждений, конкретные особенности воз-

можных ситуаций, а также климатические условия. Например, в горно-пустынном климате дополнительными неблагоприятными факторами могут быть обезвоживание и физическое истощение. Следует также помнить, что при пожаре, землетрясении и военных действиях характер повреждений, причины и частота развития шока будут значительно отличаться.

При катастрофах мирного времени, по разным оценкам [6,18], шоковые состояния составляют от 10 до 20% от общего числа пострадавших, при этом летальность может достигать 40%. Около 50% случаев шока возникает вследствие комбинации двух или нескольких факторов.

Обеспечение этапов медицинской эвакуации гемотрансфузионными средствами при ЧС возлагается на службу крови Минздрава России и ФМБА России, а при ведении военных действий - также на службы крови Вооруженных сил России. Расчет потребности в трансфузионных и инфузионных жидкостях на этапе медицинской эвакуации производится на основании показателей, предусмотренных для лечения одного пострадавшего. Транспортировка компонентов крови и препаратов, требующих особых условий хранения, обеспечивается подразделениями службы крови. Допускается хранение компонентов и препаратов крови в приспособленных помещениях, землянках, колодцах и других сооружениях, позволяющих обеспечить температурные условия $+(4 - 6)^{\circ}\text{C}$.

Из опыта работы в условиях ЧС установлено, что оказание специализированной медицинской помощи в первые 12-24 часа после ранения или травмы и обеспечение гемотрансфузионными средами в соответствии с современной концепцией стало положительным моментом. Нецелесообразной и неэффективной явилась организация нештатных центров заготовки крови. Негативными факторами оказались отсутствие термоконтейнеров с активным термоохлаждением и неправильная отметка о группе крови в документах, удостоверяющих личность (наиболее распространенный) [3].

Алгоритм действий при проведении инфузионно-трансфузионной терапии при острой кровопотере в условиях чрезвычайных ситуаций

- врач хирург или реаниматолог определяет группу крови у пострадавшего, наносит ее фломастером на грудь пациента и записывает в дневник истории болезни;
- группа крови перепроверяется в клинической лаборатории, после чего запись выносится на титульный лист истории болезни;
- инфузионная терапия начинается с любого адекватного сосудистого доступа по принципу «иерархия трансфузионных средств»: кристаллоиды из расчета 30 мг/кг, при продолжающихся явлениях шока – коллоиды из расчета 15-20 мг/кг (в среднем в первые сутки около 1200 мл);
- в последующем применяют реамберин, мафусол, альбумин (в среднем по 1 флакону каждому пострадавшему);
- затем переливают компоненты крови: плазму свежезамороженную 7-10-15 мл/кг при массивной кровопотере перед трансфузией эритроцитсо-

державших сред, особенно при проведении оперативных вмешательств;

- после контроля гемоглобина, при уровне менее 70-80 г/л, показаны трансфузии эритроцитной массы (лучше переливать эритроцитную взвесь лейкофильтрованную).

- соотношение плазмы свежезамороженной и эритроцитной массы 2:1.

- в среднем объем инфузии составляет 4,5-5,5 л на одного пострадавшего, находящегося в отделении анестезиологии-реаниматологии.

Подобная тактика делает ИТТ патогенетически обоснованной и отсрочивает переливание компонентов крови на 2-4 часа. За этот период можно провести необходимые иммунологические исследования группы крови, резус-принадлежности, антигенов С, с, Е, е, Сw, К и к в полном объеме; заказать и получить запас компонентов крови со станции переливания крови (центра крови); приготовить фильтрованные гемотрансфузионные среды ранних сроков хранения, а также провести пробы на совместимость, а при необходимости повторных гемотрансфузий – индивидуальный подбор [13].

При массовом поступлении пострадавших в реанимационно-анестезиологическое отделение считается, что из 100-200 человек 30% нуждаются в инфузионной терапии, 15-20% - в гемотрансфузионной [14].

Рекомендуемый запас инфузионно-трансфузионных сред, необходимый при массовом поступлении пострадавших

Рекомендуется следующий запас инфузионных сред, необходимый при массовом поступлении пострадавших [8,9]:

- кристаллоидов 150 флаконов по 400 мл;
- коллоидов - по 90 флаконов каждого по 400 мл;
- мафусол и реамберин по 30 флаконов по 400 мл;
- альбумина 10% - 30 флаконов по 100 мл;
- 100 систем для переливания компонентов крови.

Примерный расчет потребности в плазме свежезамороженной: около 1,5 л на 1 реципиента или 1 л - на пострадавшего, нуждающегося в трансфузионной терапии. Половину расчетной дозы можно заказать до подтверждающего определения групповой принадлежности пострадавшего из расчета 1 л на реципиента. В первые сутки переливается 60% всего объема плазмы свежезамороженной, во вторые – 30%, в третьи – 10%. С целью ускорения трансфузий плазмы целесообразно в медицинских учреждениях иметь запас плазмы универсальных доноров АВ (IV) группы крови, предварительно размороженной и хранящейся при температуре +4°С в течение 24 часов.

Эритроцитной массы рекомендуется иметь в запасе по 3-4 л каждой группы, а после определения групповой принадлежности обычно заказывают компоненты 0(I) группы 35%, А(II) – 35%, В(III) – 20% и АВ (IV) группы – 10%.

Приблизительный расчет потребности эритроцитной массы: обычно расходуется 1 л на 1 реципиента, или 0,5 л - на пострадавшего, требующего

проведения гемотрансфузий. Половина расчетной дозы может быть заказана до подтверждающего определения групповой принадлежности из расчета 0,5 л на 1 реципиента.

Резус-отрицательных доноров и реципиентов в России примерно 15% от общего числа. Следовательно, исходя из количества процентов эритроцитной массы каждой группы, рекомендуемых иметь в запасе, 0(I) группы резус-положительных необходимо иметь 3,5 л, резус-отрицательных – 0,5 л, А(II) – также 3,5 л и 0,5 л, В(III) – 2 л и 0,5 л и АВ (IV) группы – 1 л и 0,5 л, соответственно. В первые сутки обычно переливается 75% всего объема эритроцитной массы, во вторые – 20%, в третьи – 5%.

На основании анализа деятельности стационарной медицинской службы в условиях крупномасштабных ЧС считается, что к этой работе должны быть привлечены многопрофильные ЛПУ. Число учреждений здравоохранения, привлекаемых к ликвидации последствий катастрофы, определяется ее масштабом, количеством пострадавших и видом необходимой медицинской помощи. Для того чтобы медицинские последствия ЧС не застали врасплох, должна быть налажена четкая организация, знание расстановки и необходимых действий в условиях экстремальных ситуаций.

Список литературы

1. Военно-полевая хирургия / П.Г. Брюсов; под ред. П.Г. Брюсова, Э.А. Нечаева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 1996. - 415 с.
2. О банке криоконсервированных гемокомпонентов для службы медицины катастроф / М.Е. Ковтунова, С.В. Утемов, А.А. Костяев, Ф.С. Шерстнев // Консилиум.- 2014.- № 1.- С.38-39.
3. Организация медицинской помощи пострадавшим с сочетанной травмой в условиях травмоцентра первого уровня / В.М. Королев, В.Н. Кораблев. - Дальневосточный государственный медицинский университет, 2012.
4. Организация трансфузиологического обеспечения на подготовительном этапе и в начальном периоде боевых действий / В.И. Замятина, И.Г. Терехов. - Красноярская государственная медицинская академия.
5. Халайчев, Е.Е. Оптимизация программ криоконсервирования эритроцитов для резервирования гемотерапевтических средств: дисс ... канд.мед.наук / Е.Е. Халайчев. - СПб., 2009. - 129 с.
6. Хирургия катастроф: Учебник / Х.А. Мусалатов.- М.: Медицина, 1998.- 592 с.
7. Тхай, С.В. Альбумин – наиболее востребованный препарат крови в трансфузиологической практике / С.В. Тхай, В.В. Захаров, В.М. Русанов // Вестник Службы крови России. – 2012.- № 3. – стр. 40-45.
8. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant // The British Society for Haematology.- 2004.- 126.- P. 11–28.
9. DeLoughery, T.G. Logistics of Massive Transfusions / T.G. DeLoughery // Hematology. – 2010. – P. 470-473.
10. Grau, L. Помощь раненым в противопартизанской войне: опыт Советской/Российской армии в Афганистане и Чечне / L. Grau, U. Yorgensen // U.S. Army Medical Department Journal. - 1998.
11. Health 21: the health for all policy framework for the WHO European Region // Eur. Health for All Series. – № 6. – Copenhagen, 1999. [Электронный ресурс] / Режим доступа:

http://en.wikipedia.org/wiki/Health_21.

12. Holcomb, J .B. Optimal trauma resuscitation with plasma as the primary resuscitative fluid: the surgeon's perspective / J.B. Holcomb, Sh. Pati // Hematology. - 2013. - P. 656-659.

13. Lamp, L. Recommendation for emergency strategies in crush trauma [Text] / L. Lamp // Actually Traumatol. – 1994. – № 24 (5). – P. 163-168.

14. Myburgh, J.A. Fluid resuscitation in acute medicine: what is the current situation? / J.A. Myburgh // Journal of Internal Medicine.- 2015.- 277.- P. 58–68.

15. National Health Research systems. Report on Int. Workshop (Thailand, 12-15 March 2001). – Geneva, 2002 [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://www.who.int/entity/rpc/meetings/Further_eading_List_for_Chapter_3.pdf.

16. Scott, K.L. Biopreservation of red blood cells: past, present and future / K.L. Scott, J. Lecak, . Acker // Transfus. Med. Rev. - 2005. - Vol. 19, № 2. - P. 127-142.

17. The 10/90 Report on Health Research, 2001-2002. – Geneva, 2002 [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://www.who.int/entity/alliance-hpsr/resources/Strengthening_complet.pdf.

18. White, N. Mechanisms of trauma-induced coagulopathy / N.J. White // Hematology.- 2013.- P. 660-663.

СОХРАННОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ В РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДМСО И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М., Бабийчук Л. А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, Холодногорский район, Переяславская улица, 23)

PRESERVATION AND VIABILITY OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS CRYOPRESERVED IN SOLUTIONS CONTAINING VARYING CONCENTRATIONS OF DMSO AND ASCORBIC ACID

Makashova O. Ye., Zubova O. L., Zubov P. M., Babijchuk L. O.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: Olena.makashova@gmail.com, pmzubov@gmail.com

Проведенные в работе исследования по определению числа клеток с избыточным содержанием АФК, а также их сохранности и жизнеспособности после криоконсервирования с различными концентрациями ДМСО показали, что добавление в криозащитную среду аскорбиновой кислоты в концентрациях 100 и 150 мкМ способно снизить уровень активных форм кислорода в клетках и тем самым обеспечить повышение количества клеток в препарате кордовой крови с сохранением их жизнеспособности.

Ключевые слова: кордовая кровь человека, ядросодержащие клетки, криоконсервирование, диметилсульфоксид, активные формы кислорода, антиоксиданты, аскорбиновая кислота

The studies carried out to determine the number of cells with excess ROS content, as well as their preservation and viability after cryopreservation with various concentrations of DMSO, showed that the addition of ascorbic acid in concentrations of 100 and 150 μ M to the cryoprotective medium can reduce the level of active oxygen species in cells and thereby provide an increase in the number of cells in the cord blood preparation while maintaining their viability.

Keywords: human cord blood, nucleated cells, cryopreservation, dimethylsulfoxide, reactive oxygen species, antioxidants, ascorbic acid

В научной медицинской литературе появляется все больше публикаций, указывающих на повышение частоты использования кордовой крови (КК) для лечения различных заболеваний [1]. Причем в клинических целях могут использоваться как отдельные ее компоненты (эритроциты, стволовые гемопоэтические клетки, плазма), так и цельная КК. Повышенное внимание со стороны ученых и врачей к использованию КК привело к необходимости разработки эффективных технологий криоконсервирования и создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре -196°C в течение практически неограниченного времени без потери биологических свойств [2]. В наших предыдущих исследованиях [3] было установлено, что криоконсервирование ядросодержащих клеток

(ЯСК) КК под защитой различных концентраций ДМСО приводит к увеличению количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК), что отрицательно влияет на количественные и качественные характеристики клеток в препарате. Исходя из этого целесообразно было провести исследования по определению влияния различных концентраций веществ, которые обладают выраженными антиоксидантными и цитопротекторными свойствами [4]. Мы считаем, что это позволит избежать или замедлить развитие оксидативного стресса и улучшить результаты криоконсервирования. Одним из таких потенциальных веществ является аскорбиновая кислота или витамин С. Некоторые исследователи относят его к представителям «первой линии обороны» от «агрессивных» реактивных соединений, обладающих высокой окислительной активностью [5; 12]. В связи с этим добавление в криозащитную среду аскорбиновой кислоты (АК) может способствовать снижению количества ЯСК с избыточным содержанием АФК, повышению уровня их сохранности и жизнеспособности после криоконсервирования – как следствие клинической эффективности препаратов. В связи с этим целью работы была оценка сохранности, жизнеспособности и количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода в ядродержащих клетках кордовой крови при криоконсервировании в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты.

Для этого выделенную декстраном с молекулярной массой 60 кДа фракцию ЯСК КК обрабатывали 25% раствором ДМСО до конечных концентраций в пробе 5; 7,5 и 10%. В криозащитные среды также вносили аскорбиновую кислоту в концентрациях 0,05; 0,1; 0,15 и 0,2 мМ. Криоконсервирование проводили со скоростью 1-3°C в минуту до -80°C с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе Cryoson. Отогрев осуществляли при 37±40°C на водяной бане при постоянном покачивании до исчезновения твердой фазы. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере Горяева согласно стандартной методике [6]. Жизнеспособность ЯСК оценивали по стандартному ISHAGE протоколу с использованием моноклонального антитела (CD45FITC) и ДНК-красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD) методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur [7]. Оценку содержания внутриклеточных активных форм кислорода в ЯСК осуществляли с помощью флуоресцентного зонда дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH₂DA («Sigma-Aldrich», США) [8]. Статистическую обработку результатов проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программы «Excel» («Microsoft Office», США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как отмечалось ранее, добавление ДМСО и, особенно, замораживание-отогрев может вызвать повышение уровня АФК, что инициирует апоптоз и в дальнейшем приводит к гибели клеток. В связи с этим нами

было изучено количество клеток с избыточным содержанием АФК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и АК. Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что даже минимальная концентрация антиоксиданта (0,05 мМ) обеспечивает достоверное снижение количества клеток с избыточным содержанием АФК в пробах, консервированных с 10% ДМСО, по сравнению с контрольными значениями, в остальных случаях можно говорить лишь о некоторой тенденции к снижению.

Таблица 1.

Количество ЯСК КК с избыточным содержанием АФК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты

Конц. ДМСО, %	Контр.	Конц. аскорбиновой кислоты (мМ)			
		0,05	0,1	0,15	0,2
5	29,5±4,7	26,1±1,5	21,2±2,0*	19,7±2,7*	25,1±3,8
7,5	20,6±3,2	20,1±2,1	16,9±2,3	17,5±1,4	24,3±2,8
10	21,2±1,9	16,3±1,0*	18,7±1,3	17,9±2,1	25,2±2,1

Примечание. Данные представлены в процентах в виде $M \pm SE$.

** - значимо по отношению к контролю, с уровнем $p < 0,05$.*

В свою очередь применение концентраций АК 0,1 и 0,15 мМ обеспечивает достоверное снижение данного показателя в группе, обработанной ДМСО в концентрации 5%, в других группах можно говорить о тенденции к снижению. Эти данные указывают на антиоксидантное действие АК в данных клетках, которое, по-видимому, реализуется путем инактивации свободных радикалов с образованием семидегидроаскорбата (неактивной формы), т.е. АК перехватывает АФК и восстанавливает их [9; 10], не позволяя вызывать связанные с увеличением их уровня повреждения клеток.

Добавление аскорбиновой кислоты в концентрации 0,2 мМ вызывало увеличение количества клеток с избыточным содержанием АФК, что свидетельствует о прооксидантном действии этого вещества в высоких концентрациях. Это может быть связано с тем, что АК представлена в жидкости в виде АК и аскорбинового радикала А, который, если накапливается чрезмерно, может индуцировать образование свободных радикалов. Поэтому, повышенные концентрации АК могут приводить к накоплению промежуточного продукта - аскорбинового радикала А и индуцировать оксидативный стресс [11].

На следующем этапе нами было проанализировано влияние избыточного содержания АФК на показатели сохранности и жизнеспособности ЯСК КК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и АК.

Ранее нами было показано, что процесс криоконсервирования вызывает выраженное снижение исследуемых параметров [13]. Как видно из

табл. 2, добавление к суспензии клеток АК в минимальной концентрации (0,05 мМ) было эффективным только в пробах, криоконсервированных с ДМСО в концентрации 5%, о чем свидетельствует достоверное увеличение количества сохраненных клеток в пробах практически на 10%, по сравнению с контролем, криоконсервированным без добавления АК. При этом добавление аскорбиновой кислоты в средних концентрациях 0,1 и 0,15 мМ позволило сохранить большее количество клеток во всех экспериментальных группах, что напрямую может быть связано с антиоксидантным эффектом данного соединения.

Таблица 2.

Сохранность (А) и жизнеспособность (Б) ЯСК КК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты

Конц. ДМСО, %	Контр.	Конц. аскорбиновой кислоты (мМ)				
		0,05	0,1	0,15	0,2	
5	А	63,2±2,7	74,6±2,7*	76,6±1,4*	75,4±3,7*	67,5±2,9
	Б	75,2±3,9	75,8±3,1	78,5±2,1	79,3±3,6	65,8±4,1*
7,5	А	72,1±3,2	77,7±6,7	84,5±4,3*	86,4±5,1*	79,1±6,9
	Б	78,5±4,2	80,9±3,8	82,8±4,5	84,2±4,7	78,1±3,4
10	А	73,4±2,1	77,6±4,7	82,4±3,4	83,2±2,7*	76,0±7,1
	Б	76,9±3,1	72,5±4,1	73,8±4,2	72,8±4,1	62,7±3,2*

Примечание. Данные представлены в процентах в виде M±SE.

** - значимо по отношению к контролю, с уровнем p<0,05.*

Анализ жизнеспособности клеток (табл. 2), криоконсервированных с добавлением АК в малых и средних концентрациях (0,05; 0,15 мМ) продемонстрировал отсутствие достоверных отличий от аналогичных показателей без использования антиоксиданта. Применение же высокой концентрации аскорбиновой кислоты (0,2 мМ) приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток в суспензии по отношению к контрольным значениям, не изменяя их сохранность. Эти результаты подтверждают тот факт, что при использовании высоких концентраций аскорбиновой кислоты, она перестает выступать в роли антиоксиданта и начинает оказывать прооксидантный эффект, вызывая снижение уровня жизнеспособности клеток. Следует отметить, что в пробах криоконсервированных в 7,5% растворе ДМСО с добавлением 0,1 и 0,15 мМ раствора АК наблюдались максимальные показатели сохранности и жизнеспособности.

Таким образом, криоконсервирование ЯСК КК в растворах, содержащих аскорбиновую кислоту, является перспективным направлением для разработки протоколов криоконсервирования, однако следует учитывать, что данное соединение может иметь и прооксидантный эффект. Комплексный анализ полученных результатов позволил установить, что в пробах замороженных в растворе с концентрацией ДМСО 7,5% с добавлением 0,1 и 0,15 мМ раствора АК наблюдались максимальные показатели сохранности и жизнеспособности ЯСК КК. Эти данные подтверждают антиоксидантное

действие АК в данных клетках, что в конечном итоге выражается в улучшении качества консервированных препаратов и может быть предпосылкой для разработки криопротекторных сред с более низким содержанием ДМСО.

Список литературы

1. Gluckman, E. History of cord blood transplantation [Текст] // Bone marrow transplantation.– 2009.– Vol. 44, №10.– P. 621–626.
2. Rubinstein, P. Cord blood banking for clinical transplantation [Текст] // Bone Marrow Transplantation.– 2009.– Vol. 44, №10.– P. 635–642.
3. Mykhailova, O.Y. Cryopreservation and redox state of cord blood nucleated cells [Oral report] / O.Y. Mykhailova, O.Y. Makashova, P.M. Zubov, O.L. Zubova, L.A. Babijchuk.– SLTB 2016.– Dresden.
4. Журавлев, А.И. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология [Текст] / А.И. Журавлев, С.М. Зубкова.– М.: МИКО-ПРИНТ, 2008.– 269 с.
5. Arrigoni, O. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant [Текст] / O. Arrigoni, M.C. De Tullio // Biochim Biophys Acta.– 2002.– Vol. 1569, №1–3.– P. 1–9.
6. Davis, J.M. Basic Cell Culture A Practical Approach [Текст] // Oxford University Press, 2002.– 382 p.
7. Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry [Текст] / I. Schmid, W.J. Krall, C.H. Uittenbogaart // Cytometry.– 1992.– Vol. 13.– P. 204–208.
8. Chen, X. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy [Текст] / X. Chen, H. Z Zhong, Z. Xu [et al.] // Free Radical Research.– 2010.– Vol. 44, № 6.– P. 587–604.
9. Blokhina, O.I. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [Текст] / O. I. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // Ann. Bot.– 2003.– Vol. 91.– P. 179–194.
10. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients [Текст] / P. Jaruga, B. Jaruga, D. Gackowski [et al.] // Free Radic. Biol. Med.– 2002.– Vol. 32, № 5.– P. 414–420.
11. Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes [Текст] / A. García-Krauss, L. Ferrada, A. Astuya [at al.] // Mol Neurobiol.– 2016.– P. 5847–5863.
12. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy [Текст] / N. Suhail, N. Bilal, H.Y. Khan [et al.] // J. Clin. Pharm. Ther.– 2012.– Vol. 37, №1. – P. 22–26.
13. Oxidative processes: Structural state of cord blood nucleated cells upon cryopreservation [Текст] / O.Y. Mykhailova, O.Y. Makashova, P.M. Zubov [at al.] // X Parnas Conference Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine».– Poland. – 2016. – P. 8.

НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПЕРЕЛИВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ КРОВОПОТЕРЕ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ КОРРЕКЦИИ

Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Бондаренко В. А.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, юХолодногорский район, Переяславская улица, 23)

THE NEGATIVE EFFECTS OF TRANSFUSION OF ERYTHROCYTES WITH SIGNIFICANT BLOOD LOSS AND POSSIBLE APPROACHES TO THEIR CORRECTION

Ramazanov V. V., Volovelskaya E. L., Bondarenko V. A.

Institute Problems for Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Разрабатывается способ криоконсервирования эритроцитов в среде с невысоким содержанием NaCl (0,3%), который может обеспечить сохранение морфо-трансформирующей функции клеток и их основных биохимических показателей (глутатион, АТФ и 2,3-ДФГ). Данный способ позволит получить криоконсервированные эритроциты, которые при массивной трансфузии не будут значительно разрушаться, что снизит вероятность развития системного воспаления.

Ключевые слова: криоконсервирование, эритроциты, морфология, биохимические показатели

A method for cryopreservation of erythrocytes in a medium with a low content of NaCl (0,3%) is developed, which can ensure preservation of the morfo-transforming function of cells and their basic biochemical parameters (glutathione, ATP and 2,3-DPG). This method will allow obtaining cryopreserved erythrocytes, which will not be significantly destroyed during massive transfusion. This will reduce the likelihood of developing systemic inflammation.

Keywords: cryopreservation, erythrocytes, morphology, biochemical indices

У пациентов с тяжелой травмой или пациентов, перенесших операцию на сердце, при массивной трансфузии эритроцитов, хранившихся в гипотермических условиях при 4°C (ГТХ-эритроциты), отмечаются негативные последствия и летальный исход, связанные с развитием посттрансфузионного системного воспаления [11]. Было высказано предположение о том, что освобождение ионов железа при разрушении ГТХ-эритроцитов макрофагами селезенки и печени инициирует воспалительный процесс посредством действия активных форм кислорода. Кроме того, повышение уровня циркулирующего несвязанного железа при разрушении эритроцитов способствует развитию «феррофильных» грамотрицательных бактерий, и это является недооцененным фактором неблагоприятных последствий переливания ГТХ-эритроцитов [10].

Подходом к ослаблению посттрансфузионного воспалительного ответа может быть использование хелатора ионов железа дефероксамина. На мышах было показано, что введение данного средства приводит к ингиби-

рованию развития воспалительного процесса, индуцированного переливанием ГТХ-эритроцитов [4]. Для предотвращения тяжелых последствий переливания эритроцитов было рекомендовано их хранение при 4°C в специальных растворах не более 2 недель. Замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте (-196°C) позволяет исключить длительное гипотермическое хранение и предотвратить серьезные побочные реакции, включая развитие воспаления. Однако даже при аутоотрансфузии эритроцитов после их замораживания глицериновым методом с последующим кратковременным гипотермическим хранением (3 суток) среднее посттрансфузионное значение выживаемости клеток в течение последующих 24 часов составляло 75% [11]. Значительная часть ГТХ-эритроцитов (25%) после переливания разрушается в ретикулоэндотелиальной системе селезенки и печени. Возможно, данный внесосудистый гемолиз эритроцитов определяется их повреждением при использовании криоконсерванта на основе глицерина, так как при замораживании-оттаивании эритроцитов в данной среде отмечается потеря АТФ более чем на 50% [7].

Решение вопроса сохранения уровня АТФ при замораживании может быть связано с использованием комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы. Показано, что замораживание в среде с декстраном приводит к потере АТФ до 44,8%. В то же время использование среды, содержащей декстран и 1,2-пропандиол (1,2-ПД), обеспечивает сохранение АТФ на уровне 74,6% [2]. Установлено, что использование среды с сахарозой и проникающим криопротектором (ДМСО или 1,2-ПД) с невысоким содержанием NaCl (0,3%) при замораживании эритроцитов обеспечивает устойчивость клеток к действию осмотического стресса на стадии оттаивания. Замораживание в подобных средах обеспечивает сохранение осмотических характеристик эритроцитов [1].

В настоящей работе определяли морфологию и содержание главных биохимических соединений эритроцитов после замораживания в среде с 1,2-ПД, сахарозой и невысоким содержанием NaCl.

Степень повреждения эритроцитов, отмытых изотоническим раствором (0,9% NaCl), после замораживания в среде, содержащей 22% 1,2-ПД, 10% сахарозы и 0,3% NaCl составляла 5%. Замороженные эритроциты по осмотической хрупкости незначительно отличаются от интактных клеток. Морфологический анализ показал, что в изотонической среде (0,9% NaCl), интактные эритроциты представлены в основном стоматоцитами, а замороженные клетки – эхиноцитами и сфероэхиноцитами. Включение в среду альбумина (2%) вызывает изменение формы интактных клеток на дискоциты (нормоциты), а замороженных – на дискоцитоподобные (70%), стоматоциты (20%) и сфероэхиноциты (10%) (рис). Следовательно, морфо-трансформирующая функция замороженных эритроцитов, которая особенно необходима в условиях микроциркуляции в тканях, сохраняется в удовлетворительном состоянии. Возможно, при включении таких эритроцитов в

систему циркуляции крови клетки восстановят свои функции.

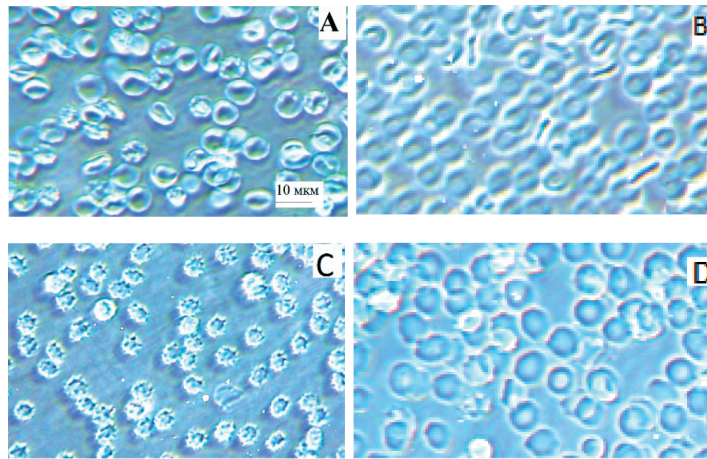


Рисунок. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl:

A, B – интактные клетки; C, D – замороженные клетки.

B, D – в среду добавлен альбумин (2%)

Содержание глутатиона (GSH) в отмытых после замораживания-оттаивания эритроцитах существенно не изменяется по сравнению с интактными клетками (табл.). После замораживания-оттаивания эритроцитов (без отмывания) отмечается незначительное снижение содержания главных фосфоорганических соединений (АТФ, 2,3-ДФГ) (табл.).

У больных с неотложным состоянием при переливании ГТХ-эритроцитов не всегда нормализуется гемодинамика и поставка кислорода в ткани [8], что может быть связано с потерей 2,3-ДФГ или со снижением уровня АТФ в клетках при хранении [5, 8]. В системе микроциркуляции в тканях из эритроцитов высвобождается АТФ, связывается с рецепторами на эндотелиальных клетках и стимулирует повышение уровня оксида азота (NO). Это способствует дилатации микрососудов и поставке кислорода в ткани [8]. До 10% GSH в эритроцитах находится в состоянии нитроглютамина, посредством которого происходит образование других нитрозотиолов, в том числе нитрозогемоглобина. GSH может регенерировать NO и тем самым выполнять буферную функцию в качестве резервного источника NO. При низком давлении кислорода нитрозогемоглобин посредством реакции транснаитрозилирования передает молекулу NO на SH-группу белка полосы 3 с последующим высвобождением в плазму. Кроме того, белок полосы 3 опосредует высвобождение в плазму нитрозотиолов, которые поставляют NO в эндотелиальные клетки и, таким образом, система нитрозотиолов эритроцитов обеспечивает значительный вклад в механизм дилатации микрососудов тканей в условиях микроциркуляции [6]. Потеря GSH при хранении эритроцитов приводит к уменьшению уровня нитрозогемоглобина. Такие эритроциты теряют способность к релаксации сосудов [9]. Весомая доля осложнений, которые возникают при переливании ГТХ-эритроцитов при нормальном уровне АТФ и 2,3-ДФГ, может быть связана с нарушением в системе нитрозотиолов из-за недостатка GSH [3].

Биохимические показатели эритроцитов после замораживания-оттаивания в среде, содержащей 22% 1,2-ПД, 10% сахарозы и 0,3% NaCl

Образцы эритроцитов	GSH, мкмоль/г Hb	АТФ, мкмоль/г Hb	2,3-ДФГ, мкмоль/г Hb
Интактные	8,78±1,25 (100%)	3,47±0,55 (100%)	10,42±1,32 (100%)
Замороженные	7,88±1,13 ¹ (89,7%)	2,68±0,41 ² (77,2%)	8,16±1,052 (78,3%)

¹ – с отмыванием, ² – без отмывания от криоконсерванта.

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с 1,2-ПД и сахарозой при невысоком содержании NaCl (0,3%) обеспечивает удовлетворительное сохранение морфо-трансформирующей функции клеток на действие альбумина, который является дискоцит-стабилизирующим белком плазмы. Сохраняется удовлетворительный уровень главных соединений (GSH, АТФ и 2,3-ДФГ), которые необходимы для осуществления эритроцитами функций регуляции сосудистого тонуса и поставки кислорода тканям. Можно предположить, что использование эритроцитов, замороженных в указанной среде позволит избежать значительного разрушения клеток при переливании и, соответственно, уменьшить вероятность развития системного воспаления. В настоящей работе использовалось отмывание размороженных клеточных образцов с 0,9% NaCl при их 10-кратном разведении. Очевидно, данный подход отмывания может создавать осмотический стресс на эритроциты. В следующей экспериментальной работе предполагается модифицировать способ отмывания, возможно с использованием сахарозо-солевого гипертонического раствора с целью получения лучших морфологических показателей клеток.

Список литературы

1. Рамазанов, В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом / В.В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 155–163.
2. Рамазанов, В.В. Определение содержания аденозинтрифосфата и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах донорской крови при замораживании / В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко. // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2016. – Т. 16, Вип. 1 (53) – С. 233–237.
3. Metabolomics of AS-5 RBC supernatants following routine storage / A. D'Alessandro, K.C. Hansen, C.C. Silliman [et al.] // Vox Sang. – 2015, – Vol. 108, №2 – P. 131-140. doi: 10.1111/vox.12193.
4. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation / E. A. Hod, N. Zhang, S. A. Sokol [et al.] // Blood. – 2010 – Vol. 115, №21 – P. 4284–4292. doi: 10.1182/blood-2009-10-245001.
5. Högman CF, Löf H, Meryman HT. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate // Transfusion. – 2006. – Vol. 46, №9 – P.1543-1552.
6. Pawloski, J.R. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity / J.R. Pawloski, D.T. Hess,

J.S. Stamler // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, № 6820. – P. 622–626.

7. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier [et al.] // *Cryobiology*. – 1997. – Vol. 35, №2. – P.173–186.

8. Qu, L. Clinical effects of red blood cell storage / L. Qu, D. J. Triulzi // *Cancer Control*. – 2015. – Vol. 22, №1. – P.26–37.

9. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood / J.D. Reynolds, G.S. Ahearn, M. Angelo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007 – Vol. 104, № 43. – P. 17058–17062.

10. Spitalnik, S.L. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection / S.L. Spitalnik // *Transfusion*. – 2014. – Vol. 54, №10. – P. 2365–2371. doi: 10.1111/trf.12848.

11. Valeri, C.R. An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products / C.R. Valeri, G. Ragno // *Transfus Apher Sci*. – 2010. Vol. 42, №3. – P. 223–233. doi: 10.1016/j.transci.2009.08.001.

**ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСФУЗИОЛОГИЧЕСКОГО КАБИНЕТА
В ГБУЗ СК «ГОРОДСКАЯ ДЕТСКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА
ИМ. Г. К. ФИЛИППСКОГО» г. СТАВРОПОЛЬ**

Смирнова О. Н.

*Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования
«Северо-кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия
(355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1)*

**THE ORGANIZATION OF BLOOD TRANSFUSIONS CABINET
GBUZ SK «MUNICIPAL CHILDREN'S CLINICAL HOSPITAL.
G. K. FILIPPSKY» STAVROPOL**

Smirnova O. N.

*Federal state Autonomous institution of higher professional education
«North-Caucasus Federal University», Stavropol, Russia
(355009, Stavropol, Pushkin St., 1)
E-mail: 79624137493@yandex.ru*

Представлены основные направления, по которым ведется непрерывная работа по организации трансфузиологической помощи в регионе, включая круглосуточное консультирование врачей, непосредственно осуществляющих гемотрансфузии. Освещена деятельность городской клинической детской больницы им. Г. К. Филиппского по организации трансфузионной терапии.

***Ключевые слова:** организация трансфузиологической помощи, консультирование врачей, размораживатель плазмы, компоненты крови*

Presents the main areas in which work continues on the organization of Transfusiology care in the region, including round-the-clock consultation of the doctors directly involved in blood transfusion. Highlights the activities of the city children's clinical hospital.G.To.Philippi on the organization of transfusion therapy.

***Keywords:** organization of Transfusiology care, consulting physicians, freezer plasma blood components*

ГБУЗ СК «Городская детская клиническая больница им. Г.К. Филиппского» развернута и функционирует с 1989 г. в реконструированном здании Совпартшколы г. Ставрополь. В 2012 г. учреждением получена бессрочная лицензия более чем на 150 видов деятельности, установлена высшая сертификационная категория. Для сравнения – в 2006 и 2007 гг. было лицензировано 42 вида деятельности, в 2008 г. – 64, в 2009 – уже 150 видов деятельности.

Больничное учреждение создано для обследования и лечения детей от 1 мес. до 17 лет. В больнице имеются 6 лечебных отделений на 232 койки: неврологическое с койками детской кардиологии, гастроэнтерологическое с эндокринологическим постом, соматическое (педиатрическое), аллергологическое, хирургическое с палатами реанимации и интенсивной терапии, которое функционирует с апреля 2009 г., ЛОР-отделение – открыто с апреля 2012 г.

С 1 апреля 2009 г. в учреждении начали работу городской детский травматологический пункт и отделение детской хирургии, оснащенные самым современным медицинским оборудованием. В хирургическом отделении имеется лапароскопическая и артроскопическая аппаратура, которая позволяет выполнять хирургические вмешательства на органах брюшной полости и суставах без разреза, через небольшие проколы. Анестезиологическое оборудование и препараты для наркоза дают возможность проводить общее обезболивание практически без побочных эффектов.

В учреждение поступают дети со всех городов и районов края, Карачаево-Черкесской Республики, Дагестана, Ингушетии, других регионов России и ближнего Зарубежья. Больные поступают на обследование и лечение в плановом и экстренном порядке [1; 5].

ГБУЗ СК «ГДКБ им. Г. К. Филиппского» оказывает в полном объеме специализированную квалифицированную помощь, работая в тесном контакте с медицинскими учреждениями города, кафедрами Ставропольской медицинской академии, краевым диагностическим центром. Разрабатываются мероприятия, направленные на повышение качества медицинского обслуживания путем внедрения новых форм и методов диагностики и лечения различных заболеваний. В учреждении организован трансфузиологический кабинет, врачи которого оказывают консультативную помощь специалистам других медицинских учреждений.

В стационаре производится комплексное обследование, включающее: общеклинические и биохимические анализы, ультразвуковые и рентгенологические исследования, эзофагогастродуоденофиброскопию, электроэнцефалографию с видеомониторированием, урофлуометрию, уреазный хелик-тест и др.

В комплексном лечении используется медикаментозная и трансфузионная терапия. На базе трансфузиологического отделения функционирует размораживатель плазмы РП 2-01-«БФА», предназначенный для быстрого оттаивания и подогрева свежзамороженной плазмы и замороженного криопрепитата, непосредственно перед трансфузией пациенту, а также для подогрева растворов. Прибор оборудован звуковой и световой индикацией, защитой от перегрева, датчиком уровня воды. Используется технология «Бережное оттаивание», исключая механические воздействия на размораживаемый объект. Данная технология, применяемая в размораживателях плазмы (подогревателях растворов) РП 2-01-«БФА» имеет следующие особенности:

- обтекаемую внутреннюю поверхность водяной бани, обеспечивающую равномерный температурный режим теплоносителя (воды);
- оптимальные параметры размораживания и поддержания заданного уровня температуры, позволяющие сохранить VIII фактор в наибольшем процентном отношении;
- специальные держатели из нержавеющей стали, защищающие раз-

мораживаемые (подогреваемые) пакеты и флаконы от механических воздействий;

- двухуровневую защиту размораживаемых и подогреваемых объектов от перегрева;
- программы работы, соответствующие современным стандартам.

Размораживатель (рис. 1) представляет собой ванну из нержавеющей стали, в которую заливается 10 л воды, используемой в качестве теплоносителя для размораживания или подогрева. Конструкция прибора включает: 3-программный регулятор температуры; электронный таймер; блок сигнализации; датчик уровня воды; теплоэлектронагреватель (ТЭН); кран для слива воды.



Рисунок 1. Внешний вид размораживателя плазмы РП 2-01-«БФА»

Регулятор температуры обеспечивает:

- с помощью первой программы: поддержание температуры воды на уровне 37°C, с автоматическим управлением нагревом и поддержанием температуры;
- при использовании второй программы в случае превышения температуры воды значения 38°C происходит автоматическое отключение нагрева с кратким звуковым и световым оповещением персонала;
- третья программа (резервная), имеющая установку на 39°C, осуществляет полное отключение всех функциональных систем размораживателя с постоянным (непрерывным) звуковым и световым оповещением персонала.

Электронный датчик уровня воды обеспечивает отключение прибора при недостаточном уровне воды, а также непрерывное звуковое и световое оповещение обслуживающего персонала.

Методы используемой трансфузионной терапии:

- гемотрансфузия: переливание компонентов и препаратов крови;
- инфузия: переливание кровезаменителей;
- экстракорпоральная гемокоррекция: плазмаферез;

Палаты реанимации и интенсивной терапии

Палаты реанимации и интенсивной терапии являются неотъемлемой и важной частью больницы [1; 5].

Здесь спасают жизни маленьким пациентам при самой различной патологии (сахарный диабет, отравления, пороки сердца, пневмонии, эпилепсия и др.).

Высокий профессионализм, самоотверженность и исключительная компетентность сотрудников отделения позволяют возвращать к жизни детей в самых, казалось бы, безвыходных ситуациях.

Результаты

Трансфузии компонентов крови выполняются строго по показаниям с соблюдением требований приказов Минздрава России. Гемотрансфузии осуществляют врачи, имеющие подготовку по трансфузиологии. За 2015-2016 гг. переливание гемокомпонентов выполнено 19 пациентам. В таблице представлены данные отчета за указанный период об использовании донорской крови и (или) ее компонентов медицинской МБУЗ г. Ставрополя «Городская детская клиническая больница им. Г.К. Филиппского».

Таблица.

Использование донорской крови и ее компонентов в 2015-2016 гг.

№ п/п	Наименование компонентов крови*	Остаток на начало отчетного периода (литров)	Получено (литров)	Израсходовано (литров)			Остаток на конец отчетного периода (литров) (5+6+7+8)
				Перелито больным (литров)	Списано (литров)	Причина списания (литров)	
1	Эритроцит-содержащие компоненты	0	8,325	8,325	0	0	0
2	СЗП	0	8,671	8,671	0	0	0
3	Концентрат тромбоцитов		0,786	0,786			
ИТОГО		0	-	-	0	0	0

Заключение

Выделены направления оказания трансфузиологической помощи, по которым ведется непрерывная работа:

- своевременное получение компонентов крови по заявкам при наличии у ЛПУ лицензии на вид деятельности «трансфузиология» и «транспортировка донорской крови»;

- удовлетворение потребности в услугах: проведение индивидуального подбора крови донора и реципиента, диагностика гемолитической болезни новорожденных, определение группы крови и резус фактора в трудных случаях, лабораторная диагностика посттрансфузионного осложнения.

Учреждение является консультативным центром региона по вопросам оказания трансфузионной терапии. Взаимодействие с другими медицинскими организациями осуществляется по следующим направлениям:

- передача сведений о компонентах крови заключается в ежегодном

предоставлении номенклатурного перечня получаемой продукции.

- проведение анализа договора (контракта) на поставку компонентов крови в рамках государственного заказа. Внесение поправок с учетом технологических возможностей учреждения - производителя и фактического получения осуществляется в течение календарного года;

- круглосуточное консультирование врачей, непосредственно осуществляющих гемотрансфузии в конкретный момент времени. Наиболее часто встречающиеся вопросы - выбор и обоснованность назначения компонента, трудности в оценке проб на совместимость и др.;

- подготовка (консультирование) персонала больницы по вопросам производственной, клинической трансфузиологии и иммуногематологии;

- участие в работе комиссии по разбору случаев посттрансфузионных осложнений (ПТО). Полномочия комиссии охватывают весь комплекс организационных мероприятий, направленных на снижение рисков гемотрансфузий;

- изучение протоколов само- и взаимоинспекции, ежемесячных, квартальных, годовых отчетов по расходованию компонентов крови и проведению трансфузионной терапии,

- контроль эффективности трансфузионной терапии.

Список литературы

1. Приказ МЗ РФ от 29.05.97г. №177 «О введении в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей «трансфузиология».
2. Инструкция по заготовке и консервированию донорской крови. МЗ РФ, 29.05.1995г.
3. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови. Москва, 1996г. Материалы Совета Европы.
4. ГОСТ Р 53470- 2009 Кровь донорская и ее компоненты. Руководство по применению компонентов донорской крови.
5. ГОСТ Р 53420-2009 Кровь донорская и ее компоненты. Общие требования к обеспечению качества при заготовке, переработке, хранении и использовании донорской крови и ее компонентов.

СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТКАНИ И КРИОЭКСТРАКТЕ ПЛАЦЕНТЫ

Строна В. И., Репин Н. В.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, Холодногорский район, Переяславская улица, 23)*

THE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN TISSUES AND CRYOEXTRACTION OF PLACENTATION

Strona V. I., Repin N. In.

*Institute Problems for Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov,
Ukraine (Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: vstrona@rambler.ru*

С помощью метода диск-электрофореза в ПААГе изучено содержание некоторых гормонов в биопрепаратах, полученных на основе плаценты. Показано практически полное отсутствие высокомолекулярных структурных белков и высокое содержание фракций средне- и низкомолекулярных белков при фракционировании пептидов. Считают, что это является свидетельством высокой биологической активности биопрепаратов, которые могут применяться для коррекции функциональных показателей гомеостаза.

Ключевые слова: биопрепараты, плацента, гормоны, высокомолекулярные белковые структуры, средне- и низкомолекулярные белки

Using the method of disc-electrophoresis in PAAY studied the contents of some hormones in the biological products derived from the placenta. Shown the almost complete absence of high molecular weight structural proteins and a high content of fractions of medium and low molecular weight proteins in fraktionirovanie peptides. I believe that this is evidence of the high biological activity of biologics, which can be used for correction of functional parameters of homeostasis.

Keywords: biopreparations, placenta, hormones, macromolecular protein structures, medium and low molecular weight proteins

Увеличение числа заболеваний, которые сопровождаются иммунной или эндокринной недостаточностью, определяет высокую потребность в соответствующей тканевой терапии. Плацента может служить источником для получения целого ряда препаратов как общего, так и направленного этиопатогенетического действия. Фармакопейные препараты из ткани плаценты подвергаются тепловой обработке, которая приводит к инактивации биологически активных белковых веществ. Исходя из этого возникла необходимость разработки метода криоконсервирования ткани плаценты для ее последующего использования в разных клинических ситуациях.

Проведенные в течение последних лет экспериментальные и клинические исследования по изучению криочувствительности ткани плаценты и возможности получения биопрепаратов позволили получить биоматериал, который обладает выраженным клиническим эффектом при лечении ряда патологий. Было доказано, что предлагаемая биотехнология позволяет достичь не только неспецифического биостимулирующего действия, но и специфического иммуно-эндокринного влияния препаратов на организм

больного [1].

Исходя из этого, целью исследования было изучение содержимого некоторых гормонов в биопрепаратах, полученных на основе плаценты. Содержимое гормонов определяли в экстракте, полученном из плаценты после кесаревого сечения методом иммуноферментного анализа. Кривоэкстракт плаценты получали методом, разработанным в ИПКиК НАНУ. Содержание гормонов и биологически активных веществ в абсолютных цифрах приведено в таблице 1. Как видно, в экстракте, полученном из ткани плаценты, содержимое всех изученных гормонов значительно выше, чем в сыворотке крови. Широкий спектр гормонов, белков «зоны беременности» с гормональной ферментативной и еще не установленной функцией, что присутствует в ткани плаценты, обуславливает ее иммуномодулирующую активность и влияние на метаболические процессы.

Фракционный состав белков препаратов, полученных из плаценты человека, был изучен с помощью метода диск-электрофореза в ПААГе. После электрофоретического фракционирования белков их условно можно разделить на 3 группы: 1 - высокомолекулярные, которые имеют молекулярную массу (Мм) выше 100 кДа.

2 группа - белки, которые имеют Мм 20-100 кДа. Функционально представлены, в основном, белками-ферментами, которые принимают участие в жизнедеятельности клеток и тканей.

3 группа - низкомолекулярные белки и пептиды до 20 кДа. С большой вероятностью их можно отнести к регуляторным или биологически активным компонентам клеток и тканей.

Таблица 1

ГОРМОНЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ТКАНИ (КРИОЭКСТРАКТЕ) ПЛАЦЕНТЫ

Название	Характеристика гормонов и биологически активных соединений	Сыворотка крови	Ткань плаценты
Альфа-фето-протеин	активатор (или ингибитор) роста эмбриональных, трансформированных, активированных иммунокомпетентных клеток	2,5 – 13,1 мМЕ/мл	4290 ± 75 мМЕ/мл
Хорионичный гонадотропин	активатор иммунной системы, стимулирует продукцию стероидных гормонов (тестостерона и эстрадиола)	0 – 5 мМЕ/мл	26,8 ± 8 мМЕ/мл
Эстрадиол	репродуктивная функция, кардиопротекторное действие	30 – 120 пг/мл	2770 ± 176 пг/мл
Прогестерон	репродуктивная функция, кардиопротекторное действие	0,2- 1,4 нг/мл	718 ± 352 нг/мл
Пролактин	влияние на развитие вторичных половых признаков, эритропоэтическое действие, регуляция жирового обмена	2,7 – 16,9 нг/мл	1800 ± 195 нг/мл

АМГФ	подготовка к беременности, процесс зачатия, нормальное развитие фетоплацентарной единицы	16 – 70 нг/мл	1470 ± 173 нг/мл
Лактоферрин	стимуляция лактации	340 - 540 нг/мл	1270 ± 223 нг/мл
СТГ	гормон роста, анаболическое действие	2 - 10 нг/мл	5,64 нг/мл
Фолликуло-стимулирующий гормон	гормон гипофиза, индуцирует вызревание фолликулов в яичниках и сперматогенез у самцов	9 - 25 МЕ/л	7,1 ± 2,3 мМЕ/л
Лютеинизирующий гормон	гормон гипофиза, секреция эстрогенов, прогестерона, тестостерона	13 - 21 МЕ/л	7,8 ± 1,9 МЕ/л
Тестостерон	дифференцировка и функционирование репродуктивной системы, анаболическое действие	менее 5 нМоль/ мл	26 ± 10 нМоль/л
Тиреотропный гормон	стимуляция функции щитовидной железы, иммуномодулирующее действие	0,2 – 3,5 мМЕ/л	291 ± 13 мМЕ/л
T4	стимуляция обмена веществ, роста и дифференцировки тканей, процессы размножения, гемопоэз	10 – 23 пМоль/л	5,6 ± 0,99 пМоль/л
T3	стимуляция обмена веществ, роста и дифференцировки тканей, процессы размножения, гемопоэз	2,5 – 5,8 пМоль/л	2,1 ± 0,6 пМоль/л
Кортизол	обмен белков, углеводов, жиров и нуклеиновых кислот	150 – 660 нМоль/л	1392 ± 515 нМоль/ мл
G-CSF	пролиферация клеток костного мозга		9,87 нг/мл
ФНО- α	ингибитор пролиферации раковых клеток	0 - 6 пг/мл	84,5 пг/мл
IL-1β	регуляция дифференцировки полипотентных стволовых клеток, иммуно-эндокринной системы и т.д.	0 - 40 пг/мл	201,7 пг/мл
IL-4	регуляция дифференцировки полипотентных стволовых клеток, иммуно-эндокринной системы и т.д.	0 - 13 мг/мл	21,7 пг/мл
IL-6	регуляция дифференцировки полипотентных стволовых клеток, иммуно-эндокринной системы и т.д.	0 - 10 пг/мл	114,9 п г/мл
Общий белок			76,5 ± 14 мг/1 г веса
Белки М.м. 20-100 кДа			70 – 80 %
Белки М.м. Ниже 20 кДа			20 – 30 %

При фракционировании белков обращает на себя внимание практически полное отсутствие высокомолекулярных структурных белков и высокое содержание фракций средне- (2 группа) и низкомолекулярных белков (3 группа) в количестве 70 - 80% и 20 - 30% соответственно, которые имеют, как предполагается, высокую биологическую активность, реализуют свое действие в конкретных условиях и корригируют функциональный статус систем обеспечения гомеостаза [2].

Список литературы

1. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение / Под ред. А.Н. Гольцева, Т.Н. Юрченко. – Харьков. – 2013. – 317 с.
2. Грищенко, В.И. Трансплантация продуктов фетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 54-85.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДОНОРСКИХ ЛЕЙКОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ПО МОДЕРНИЗИРОВАННЫМ ПРОГРАММАМ

Утемов С. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Худяков А. Н.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72)

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Россия
(Республика Коми, Сыктывкар, Первомайская улица, 50)

RESULTS OF DONOR LEUKOCYTE CONCENTRATES` FREEZING BY THE MODERNIZED PROGRAMS

Utemov S. V., Vetoshkin K. A., Kostyaev A. A., Khudyakov A. N.*

Federal State-Funded Institution of Science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal medical-biological Agency», Kirov, Russia
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

E-mail: utemovs@mail.ru, kostyavetoshkin@yandex.ru, kirov_ak@bk.ru

*Federal State-Funded Institution of Science Institute of Physiology Komi Science Centre, the Urals Branch, Russian Academy of Science, Russia,
Republic of Komi, Syktyvkar, street may day, 50
E-mail: ddc@yandex.ru

В работе представлены результаты замораживания донорских лейкоцитных концентратов (ЛК) до температуры -80°C по усовершенствованным программам охлаждения биоматериала. Применение модернизированных режимов замораживания позволило увеличить показатели морфо-функциональной сохранности клеток ЛК после криоконсервирования до 93,9 – 96,7% от исходного количества.

Ключевые слова: результаты криоконсервирования, программы замораживания, лейкоцитные концентраты

The paper presents the results of donor leukocyte concentrates` freezing to temperature of -80°C by advanced freezing programs. Application of the upgraded program resulted to increasing the morpho-functional safety of leukocytes after cryopreservation up 93,9 – 96,7% of their initial amount.

Keywords: results of cryopreservation, freezing programs, leukocyte concentrates

Основным препятствием к созданию запасов трансфузионных сред, применяемых в практической трансфузиологии, является ограниченный срок хранения гемокомпонентов [1 – 3]. В первую очередь, к компонентам крови, время жизни которых вне организма ограничено, а потребность в них в экстремальных ситуациях резко возрастает, относятся лейкоциты.

Одним из способов долгосрочного хранения ядерных клеток крови (ЯКК) для лечебного применения в настоящее время является их криоконсервирование [4 – 6]. Современное криогенное оборудование обеспечивает поддержание низких и сверхнизких температур в широком диапазоне значений (от -80°C до -196°C) и позволяет хранить компоненты крови в те-

чение нескольких лет. Основными повреждающими факторами, вызывающими разрушение клеток при низкотемпературном консервировании, являются изменения агрегатного состояния криобиологической системы [1, 7, 8]. В зависимости от условий охлаждения клеточной суспензии (КС) при фазовом переходе в ней формируются кристаллы внеклеточного льда различной морфологии, что обуславливает определенный характер распределения клеток в кристаллической структуре. Это в свою очередь влияет на особенности массообмена между клеткой и средой при нарушении термодинамического равновесия в системе, и, в конечном счете, – на результат криоконсервирования ЛК.

При введении ЛК в криоанабиоз клетки подвергаются воздействию комплекса повреждающих факторов, среди которых существенное значение имеют вымораживание воды, образование кристаллов эндо- и экзоцеллюлярного льда, гиперконцентрация солей, что приводит к уменьшению объема, деформации и разрушению клеток [8 - 10]. Регуляцию процессов кристаллизации и снижение негативного влияния возникающих при замораживании физико-химических факторов осуществляют, во-первых, путем добавления в биологические системы хладоограждающих веществ, а во-вторых, управлением скоростями охлаждения биоматериала. Однако имеется ряд проблем, решение которых требует углубленной научной разработки, в частности, усовершенствование программ замораживания донорских ЛК.

Данные литературы, посвященной проблеме криоконсервирования ЛК, свидетельствуют о том, что повышения количественной и качественной сохранности клеток позволяют достичь не только модификация состава хладоограждающих растворов, но и усовершенствования программ замораживания биоматериала. Программное (контролируемое) замораживание проводится в один или несколько этапов с определенными для каждого этапа скоростями охлаждения. Варьирование темпами охлаждения биологических объектов позволяет изменять в нужном направлении скорость образования кристаллов льда и характер вне- и внутриклеточной кристаллизации, тем самым дает возможность достигать более высоких результатов количественной и качественной сохранности ЛК после декриоконсервирования. Контролируемое снижение температуры КС достигается применением специальной аппаратуры – программных замораживателей. Одна из первых программ для замораживания ЛК под защитой раствора «Лейкоккриодмац» была предложена В.А. Аграненко [11]. Она состояла из трех этапов: 1 этап – охлаждение со скоростью 3°С / мин от стартовой температуры (СТ) +20°С до -1°С; 2 этап – фазовый переход в течение 2 – 4 минут; 3 этап – дальнейшее охлаждение со скоростью 5 - 10°С/мин до -100°С с последующим погружением ЛК в среду жидкого азота. Указанный метод криоконсервирования обеспечивал сохранность клеток (по резистентности к витальным красителям) до 70 - 80% и их функциональную полноценность до 50% от исходных показателей. Среди других известных программ охлаждения ЯКК

в криобиологии распространена трехэтапная схема: на первом этапе осуществляют замораживание суспензии клеток до температур $-8,5 \div -10,5^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,7 - 1,2^{\circ}\text{C}$; на втором этапе охлаждают до температур $-30 \div -40^{\circ}\text{C}$ со скоростью $1,0 - 4,5^{\circ}\text{C}$; после второго этапа осуществляют температурную остановку при температурах $-30 \div -40^{\circ}\text{C}$ в течение 3 – 5 минут, а на третьем этапе охлаждают со скоростью $10 - 12^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $-130 \div -196^{\circ}\text{C}$ [12].

Материалы и методы

ЛК для лабораторных исследований выделяли из стандартного объема донорской крови, заготовленной в строенные пластиковые контейнеры, содержащие гемоконсервант CFD-A, путем центрифугирования при 900g в течение 7 минут. После центрифугирования производили фракционирование крови на компоненты при помощи плазмозекстрактора. Плазму переводили в первый сателлитный контейнер, а образовавшийся над эритроцитами ЛК переводили во второй сателлитный контейнер. Объем выделенного ЛК составлял от 40 до 60 мл.

В качестве хладоограждающих растворов использовали комбинированный криоконсервирующий раствор на основе диметилацетамида (ДМАЦ) и гидроксипропилкрахмала (ГЭК) [13], а также диметилсульфоксид в концентрации 10%. Раствор диметилсульфоксида (ДМСО) для замораживания ЛК готовили *ex tempore* следующим образом: набирали 5 мл высокоочищенного ДМСО (99,99%) в шприц объемом 50 мл и доводили до отметки «50 мл» полиглюкином (декстран со средней молекулярной массой 50000 – 70000, 6% раствор для инфузий).

Смешивание ЛК с приготовленным хладоограждающим раствором осуществляли в соотношении 1:1 (по объему) медленно (в течение 1 – 2 минут) при постоянном перемешивании. Подготовленный ЛК переводили в пластиковые криопробирки (объем 2,0 мл) и охлаждали по специальным программам при помощи замораживателя KRYO (модель 360, производство фирмы “PLANER Plc.”, Великобритания) до температуры хранения -80°C . При использовании программы № 1 стартовая температура (СТ) ЛК была равна $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, скорость охлаждения – $1,5 - 2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, холодовая остановка производилась при температуре $-4,1^{\circ}\text{C}$ и длилась 5 минут. На следующем этапе скорость охлаждения составляла $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до достижения температуры -80°C , после чего биоматериал переносили в низкотемпературный электрохолодильник. Программа № 2 отличалась от программы № 1 СТ биоматериала ($+6^{\circ}\text{C}$), скоростью охлаждения ($1,8 - 3,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до точки кристаллизации ($-5,9^{\circ}\text{C}$), длительностью холодовой остановки (3 минуты), а также скоростью охлаждения на завершающем этапе ($15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до температуры хранения (-80°C).

Срок хранения замороженных образцов при указанной температуре составил до 6 месяцев и до 1 года. Процедуру размораживания биоматериала осуществляли в водной среде при температуре $+37 \div +39^{\circ}\text{C}$ и постоянном интенсивном покачивании пробирки. Количественные и качественные по-

казатели ЛК определяли до криоконсервирования и после оттаивания стандартными методами [14].

Результаты и их обсуждение

Основная цель криоконсервирования – получение после размораживания достаточного количества жизнеспособных клеток. В этой связи мы изучили результаты морфо-функциональной сохранности клеток донорских ЛК в зависимости от режима замораживания. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Сохранность ЛК при замораживании по программам №№ 1 и 2

Показатель	Режимы замораживания	
	1	2
Количество ЯКК (% от исходного уровня)	87,2 – 91,0	94,2 – 97,1
Жизнеспособность, %	69 – 75	78 – 94

Оба испытанных режима охлаждения ЛК позволили сохранить клетки крови. При замораживании клеток крови по режиму № 1 общее количество лейкоцитов после размораживания оставалось на достаточно высоком уровне (87,2 – 91,0%). В то же время содержание жизнеспособных (эозино-резистентных) клеток оказалось меньшим (69 – 75%).

Наибольшее количество жизнеспособных ЯКК после размораживания сохранялось при использовании режима замораживания № 2. Так, общее количество клеток крови после размораживания оставалось на уровне 94,2 – 97,1% от исходного, а их жизнеспособность – 78 – 94%, что было выше, чем аналогичные показатели при применении программы замораживания № 1.

После анализа полученных данных можно заключить, что при криоконсервировании клеток крови под защитой ДМСО лучшим режимом замораживания является СТ +4÷+6°C, охлаждение со скоростью 1,8-3,2°C/мин до температуры кристаллизации, время фазового перехода – 3 минуты, дальнейшее охлаждение до температуры -80°C со скоростью 15°C/мин.

Нами проанализированы результаты морфо-функциональной сохранности донорских ЛК, замороженных по программе № 2, в зависимости от срока хранения – 6 и 12 месяцев (таблица 2).

Таблица 2.

Сохранность ЛК после замораживания-отогревания, определенная в % по сравнению с нативными ЛК (n=10)

Показатель	Нативный ЛК	Срок хранения	
		6 месяцев	12 месяцев
Количество ЯКК, в 1мкл	100	90,4±2,2	87,5±2,6
Жизнеспособность, %	100	94,8±3,2	92,5±2,7

Результаты исследований показывают, что замораживание донорских ЛК под защитой ДМСО до температуры - 80°C обеспечивает сохранность в течение 6 месяцев 90,4±2,2% клеток, которые характеризуются высокой жизнеспособностью (94,8±3,2%). После 1 года хранения в условиях низкой температуры сохранность количества ЯКК составила 87,5±2,6%, из которых 92,5±2,7% клеток были эозинорезистентными. При этом достоверных отличий в показателях количественной сохранности и жизнеспособности лейкоцитов при указанных сроках хранения не выявлено ($p>0,05$).

Результаты количественной сохранности и жизнеспособности лейкоцитов, замороженных по модернизированному режиму под защитой криофилактика на основе гидроксипроксиэтилкрахмала и диметилацетамида и хранившихся до 1 года при температуре -80°C, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Сохранность ЛК при замораживании по программам №№ 1 и 2

Показатель	Режимы замораживания	
	1	2
Количество ЯКК (% от исходного уровня)	85,5 – 92,1	93,9 – 96,7
Жизнеспособность, %	68 – 74	77 – 93

Было выявлено, что оба испытанных режима охлаждения позволили сохранить ЯКК на достаточно высоком уровне. При замораживании ЛК по режиму № 1 общее количество лейкоцитов после размораживания составило 85,5 – 92,1%, а их эозинорезистентность – 68 – 74%. Общее количество ЯКК, замороженных по режиму № 2, составило 93,9 – 96,7% от исходных данных, а их жизнеспособность – 77 – 93%, что было выше, чем аналогичные показатели при применении программы № 1.

Для подтверждения эффективности криоконсервирования донорских ЛК с криоконсервантом на основе ГЭК и ДМАЦ по усовершенствованной программе (№ 2) провели сопоставление их количественной и качественной сохранности с аналогичными показателями ЯКК, замороженных с 10% раствором ДМСО. Результаты определения количественных и качественных параметров ЛК представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Сохранность ЯКК при замораживании по программе № 2

Показатель	Криоконсервант	
	10% ДМСО	ГЭК + ДМАЦ
Количество ЯКК (% от исходных значений)	94,2 – 95,0	93,9 – 96,7
Жизнеспособность, %	79 – 85	77 – 93

Полученные результаты свидетельствуют, что в случае применения обоих криоконсервантов не выявлено существенных различий как в количестве размороженных лейкоцитов, так и по показателю их эозинорезистентности. Усовершенствованная программа (№ 2) замораживания донор-

ских ЛК позволяет сохранять ЯКК при их криоконсервировании как под защитой хладоограждающего раствора на основе ГЭК и ДМАЦ, так и под защитой ДМСО.

Выводы

1. Разработана и усовершенствована программа охлаждения ЛК, которая отличается стартовой температурой биоматериала (+4 ÷ +6°C), скоростью снижения температуры до начала кристаллизации биосреды (от 1,8 до 3,2°C/мин), длительностью холодовой остановки (3 минуты), а также темпом охлаждения (15°C/мин) до температуры последующего хранения.

2. Изменения в программе охлаждения ЛК позволили повысить количественную сохранность ядерных клеток крови до 93 - 96%, а их жизнеспособность - до 78 - 94% после замораживания под защитой различных криоконсервантов, хранения и декриоконсервирования.

Список литературы

1. Криоконсервирование клеточных суспензий / А.А. Цуцаева, В.А. Аграненко, Л.И. Федорова [и др.]; под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1983. – 240 с.
2. Багаутдинов Ш.М. Совершенствование методов долгосрочного хранения крови и костного мозга в замороженном состоянии в службе крови вооруженных сил: автореф. дис. ... докт. биол. наук - СПб, 1998. - 29 с.
3. Трансфузиология: клиническое руководство / под ред. М.Ф. Заривчацкого – Пермь: ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России, 2014. – с. 900 с илл.
4. Сведенцов, Е.П. Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из криоанабиоза [Текст] / Е.П. Сведенцов, Т.В. Туманова // Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 81 с.
5. Сведенцов, Е.П. Криоконсерванты для живых клеток / Е.П. Сведенцов; отв. ред. Ю.С. Оводов. – Сыктывкар, 2010. – 80 с.
6. Fuller B., Lane N., Benson E. Life in the frozen State. - London, New York, Washington: CRS Press, 2004. – 672 p.
7. Кробиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко – Киев: Наукова думка, 1994. – 431 с.
8. Гордиенко, Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наукова думка, 1994.- 143 с.
9. Количественная оценка оптимальной скорости охлаждения при замораживании клеточных суспензий / О.А. Стриха, А.Ю. Артуянц, О.И. Гордиенко, Е.А. Гордиенко // Теоретические и практические аспекты современной кробиологии: Материалы Международной научно-практической конференции (24 марта 2014 г. Россия - Украина). – Сыктывкар, 2014. – С. 64 - 68.
10. Кулешова, Л. Г. Механизмы действия внеклеточного льдообразования и связанных с ним явлений на биологические объекты: автореф. дисс. ... докт. биол. наук – Харьков, 2011. – 41 с.
11. Временная инструкция по криоконсервированию лейкоцитов с препаратом «Лейкокриодмац». – М., 1985. – 15 с.
12. Патент №2233589, А01N 1/02, дата публикации патента 10.08.2004 г. Автор патента: Лобынцева Г.С.
13. Патент № 2530149, дата публикации патента 12.08.2014. Авторы патента: С.В. Утемов, К.А. Ветошкин, А.А. Костяев.
14. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.; Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. - 368 с.



**ВОПРОСЫ
ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ**

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ БОЛЕЗНИ ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

Васильева М. Ю., Колосков А. В., Филиппова О. И., Чернова Е. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт – Петербург, Россия (191015 Санкт-Петербург, ул.Кировская, 41)

FEATURES OF DIAGNOSTIC METHODS OF VON WILLEBRAND DISEASE

Vasilyeva M. Yu., Koloskov A. V., Filippova O. I., Chernova E. V.

*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov Saint – Petersburg, Russia (191015 Saint – Petersburg, Kirovskaya street, 41)
E-mail: miss.m-vasilieva@yandex.ru*

Болезнь фон Виллебранда (БВ) является наследственным заболеванием, которое вызывается либо количественным, либо качественным дефицитом фактора фон Виллебранда. БВ проявляется классическими кожно-слизистых кровотечениями. Учитывая сложность заболевания, отсутствия методов, позволяющих быстро и точно диагностировать БВ, предпринимаются попытки в разработке новых методов диагностики заболевания.

***Ключевые слова:** болезнь фон Виллебранда, коллаген-связывающая способность фактора фон Виллебранда*

Von Willebrand disease (VWD) is a hereditary disease that is caused either by a quantitative or by qualitative deficiency of von Willebrand factor (VWF). VWD demonstrates a classic pattern of mucocutaneous mucosal bleeding in affected individuals. Given the complexity of the disease, the inability to always accurately and adequately diagnose people with VWD, attempts are being made to develop new methods for diagnosing the disease.

***Keywords:** von Willebrand disease, von Willebrand factor collagen binding assays*

Введение

Болезнь фон Виллебранда (БВ) является одним из наиболее распространенных наследственных нарушений свертываемости крови. В связи с тем, что зачастую возникают трудности в постановке диагноза БВ, предпринимаются попытки в разработке новых методов диагностики заболевания, и эта тема продолжает оставаться важной и широко обсуждаемой. Данная работа посвящена структурным и функциональным особенностям фактора фон Виллебранда, а также существующим лабораторным тестам, используемым для исследования фактора Виллебранда.

Фактор фон Виллебранда и его структура

Фактор фон Виллебранда (ФВ) является большим гликопротеином, синтезирующимся мегакариоцитами и эндотелиальными клетками и поступающим в кровоток на конституциональном уровне, а также в результате стимуляции. ФВ является продуктом гена ФВ на коротком плече 12 хромосомы. Зрелая выпущенная молекула имеет длину 2050-аминокислотных

остатка; в межклеточном пространстве она также имеет 741-аминокислотных остатка пропептида, который синтезируется, расщепляется, и реализуется в эквимольных концентрациях с мономером ФВ, который делает его полезным маркером для клиренса ФВ. Мономер ФВ имеет несколько доменов, которые обеспечивают его уникальные способности гемостаза, в том числе локализации тромбоцит-связывающих сайтов в А1, С1 и С2 доменах, коллаген-связывания в доменах А1 и А3, а также фактора VIII-связывающий сайт в доменах D9, D3 [1].

ФВ обладает выдающейся способностью к мультимеризации с помощью дисульфидных связей в остатках цистеина. Мультимеры высокого молекулярного веса являются наиболее эффективными формами ФВ при опосредовании адгезии тромбоцитов на участках повреждения сосудов. Биологическим модулятором ФВ является ADAMTS13 (дизинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином типа 1 движущей силы), который может расщеплять ФВ в домене А2, когда комплексы Виллебранда раскрываются при условиях высоких скоростей сдвига [1].

Реализация ФВ усиливается за счет участия некоторых модуляторов, таких как гистамин, фибрин и эстроген. Кроме того, выделение ФВ из альфа-гранул тромбоцитов стимулируется коллагеном, тромбоцитарным фактором активации, тромбином и АДФ. В случаях истощения запасов функционального ФВ имеет место некорректный первичный гемостаз, и могут появиться клинические признаки чрезмерной кровоточивости.

Болезнь фон Виллебранда

БВ, впервые описанная Эриком фон Виллебрандом в скандинавской семье, является аутомно-наследственным заболеванием нарушения свертывания крови, которое может быть унаследовано от любого родителя и может проявиться в равной степени как у мужчин, так и у женщин. БВ традиционно подразделяются на три типа.

Тип 1 (наиболее распространенная и самая мягкая форма БВ, характерно умеренное, волнообразное снижение количественных и/или качественных характеристик ФВ и фактора VIII).

Тип 2, который характеризуется качественным дефицитом ФВ. Тип 2 может быть дополнительно подразделен на четыре подтипа: 2А (встречается наиболее часто), 2В (редкий, характерно повышение ристоцетин-индуцированной агглютинации тромбоцитов при низкой концентрации ристоцетина), 2М (схож с подтипом 2В, характерно нарушение функции тромбоцитов из-за снижения активности ФВ) и 2N (редкий, характерна низкая аффинность ФВ к VIII фактору, клинически и лабораторно схож с мягкой формой гемофилии А).

Тип 3 (крайне редкая, самая тяжелая форма БВ, характерно значительное снижение или отсутствие ФВ, что приводит к развитию тяжелых кожно-слизистых кровотечений).

Некоторые авторы также выделяют еще и четвертый тип – тромбоци-

тарный, также известный как псевдо-БВ (диагностируется и рассматривается как тип 2В). Данный тип заболевания является результатом аномально высокого взаимодействия между средством тромбоцитов мембранного гликопротеина 1b/IX/V комплекса и ФВ [1].

Большинство пациентов с БВ наследуют особенности ФВ в соответствии с классической генетикой Менделя. Хотя БВ 1 и 2 типа, как правило, наследуется по аутосомно-доминантному типу, БВ 3 типа наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Интересно, что не у всех людей, которые имеют мутации в ФВ, проявляются клинические симптомы (неполная пенетрантность), и, хотя часто существует значительная семейная история кровотечений, связанных с диагнозом БВ, у многих членов семьи с низким уровнем ФВ, кровотечения могут реализоваться только узким временным диапазоном (переменная экспрессивность). Кроме того, поскольку умеренная кровоточивость широко представлена в общей популяции, и многие индивиды будут иметь близкий к пограничному (низкий) уровень ФВ, объединение этих 2 признаков может во многих случаях произойти случайно. В литературе обычно обсуждается распространенность БВ с частотой от 1: 100 до 1 в 10000 в зависимости от метода, используемого для обследования либо от показателей количества пациентов, наблюдаемых в медицинских центрах [2].

Скрининг болезни фон Виллебранда

Кожно-слизистые кровотечения

БВ демонстрирует классический образец кожно-слизистых кровотечений у пострадавших лиц. В частности, носовое кровотечение, кровотечение десен и значительные кровоподтеки являются общими жалобами для лиц с БВ. Многим молодым женщинам впервые диагностирована БВ во время их менархе, и меноррагия представляет собой одно из наиболее значимых проявлений БВ. Клиническое кровотечение при БВ может быть спровоцировано как травмами или хирургическими вмешательствами, так и легкой физической активностью, или могут быть просто спонтанным.

Для изучения проявлений кровоточивости в клинической практике широко используются специальные анкеты (известные как инструменты для оценки кровотечения) с целью выявления заболеваний, связанных с нарушением свертываемости крови. Набор определенного количества баллов (как правило 100 баллов и выше) является показанием для обследования пациента. Однако данный метод, как и любой другой, имеет свои недостатки. Речь идет о том, что они не являются единственным методом для постановки диагноза, а также отмечают ограниченность времени, необходимое для сбора информации о кровотечении в режиме реального времени при клиническом принятии решений [3]. Тем не менее, опубликованные данные свидетельствуют, что балльная оценка кровотечения полезна для идентификации пациентов с риском клинически значимого кровотечения [4].

Лабораторный скрининг

Клинический анализ крови не является ни чувствительным, ни специфичным в диагностике БВ, и нарушения, как правило, можно увидеть только в установлении значительного кровотечения, ведущего к железодефицитной анемии или в конкретных типах БВ, связанных с тромбоцитопенией, таких как тип 2В БВ.

Протромбиновое время и частичное тромбопластиновое время не являются надежными тестами в скрининге для диагностики БВ. Хотя частичное тромбопластиновое время может быть продлено в определенных типах БВ, таких как БВ типа 3 или типа 2N, оно традиционно не используется в качестве скринингового теста для БВ, поскольку в большинстве случаев оно будет нормальным.

Время кровотечения является исторически важным тестом для обследования пациентов со специфическими кожно-слизистыми кровотечениями и традиционно использовалось для выявления расстройств, связанных с нарушением функции тромбоцитов и ФВ. Тем не менее, время кровотечения редко используется в современной практике.

Анализатор функции тромбоцитов (PFA 100) является относительно новым тестом, который исследует адгезию тромбоцитов к коллагену и агрегацию тромбоцитов и, таким образом, позволяет судить о функции ФВ. Хотя PFA 100 является перспективным в оценке пациентов с БВ, он чаще используется для скрининга аномалий тромбоцитов, и было показано, что отсутствует единообразная высокая чувствительность и специфичность для БВ.

Таким образом, учитывая низкую чувствительность и специфичность перечисленных тестов, в случае реального подозрения на наличии БВ в связи со значительным личным и/или наследственным геморрагическим анамнезом, необходимо проводить ФВ-специфическое тестирование.

Лабораторные тесты для БВ

Текущая стандартная практика в лабораторной диагностике БВ опирается на ФВ-специфичные тесты, которые оценивают количество ФВ в плазме, функциональную активность ФВ в плазме и его способности связывать тромбоциты и измерение фактора свертывания VIII.

ФВ:Аг

Для количественного определения ФВ, выполняется исследование антигена ФВ (ФВ:Аг). Нормальный диапазон значения ФВ:Аг изменяется в зависимости от каждой лаборатории, но, как правило, принимается равным от 50 до 200 МЕ / дл. Уровни ФВ:Аг ниже 50 считаются низкими, хотя отсутствия однозначной информации о том, до какой степени этот показатель может бессимптомно снижаться в популяционном масштабе, порождает противоречия в диагностике БВ. Хорошо известно, что люди с группой крови 0(I) демонстрируют на 25% меньший уровень ФВ по сравнению с лицами с типом крови А(II), при этом геморрагические проявления также чаще

встречаются у лиц с группой крови 0(I).

ФВ:Ристоцетин кофактор

Анализ ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ: RCo) использует способность ристоцетина вызывать агглютинации тромбоцитов в присутствии ФВ. Первоначально применяемый как антибактериальный препарат, ристоцетин используется на протяжении десятилетий для оценки гликопротеина 1ba (GP1ba)-опосредованной связывающей роли ФВ, которая рассматривается как качественный тест, во многом схожий с ФВ:Аг. Нормальный диапазон у ФВ:РКо составляет от 50 до 200 МЕ/дл [5-7].

Фактор VIII

Исследование фактора VIII является важным тестом в диагностике БВ. Так, у лица с БВ 1 типа или 2 типа может быть выявлено снижение уровня фактора VIII, а у лица с БВ типа 3, имеет место выраженное снижение фактора VIII. Также значительное снижение фактора VIII наблюдаются у лиц с БВ типа 2N (Нормандский тип БВ).

Генетическое тестирование

Генетическое тестирование для диагностики БВ не используется. Исключения могут составлять случаи, в которых результаты теста могут существенно повлиять на принятия решения по планированию семьи.

Коллаген-связывающая способность ФВ (КССФВ)

Тест был разработан для оценки качественной характеристики ФВ – его способности связываться с коллагеном сосудистой стенки. Тест является чувствительным к наличию мультимеров высокой молекулярной массы. Исследование выполняется в двух модификациях: с коллагеном I и III типа.

На сегодняшний день нами исследовано 95 пациентов (основную часть которых составляли женщины в возрасте от 25 до 50 лет) с проявлениями геморрагического диатеза у них и ближайших родственников (скрининговым методом служило анкетирование), а также сниженным уровнем активности ФВ менее 50% при первичном исследовании.

В результате выполненного комплекса клинических и лабораторных исследований диагноз БВ 1 типа был подтвержден во всех наблюдениях.

В 74 случаях имело место мягкая форма БВ - снижение активности ФВ фиксировалось в диапазоне от 30 до 50%.

В 21 случае установлен диагноз БВ средней степени тяжести – снижение активности ФВ отмечалось в диапазоне от 10 до 29% случаев.

Во всех случаях БВ средней степени тяжести (21 пациент) нами зафиксировано снижение КССФВ, при этом в 13 случаях – снижение КССФВ с коллагеном I типа, а в 8 случаях – с коллагеном III типа.

У пациенток с мягкой формой БВ снижение КССФВ с коллагеном I типа было отмечено в 25 наблюдениях, а с коллагеном III типа – в 12 наблюдениях, при этом в 4 наблюдениях имело место снижение КССФВ с коллагеном I и III одновременно.

Таким образом, у 58 (61%) из 95 обследованных женщин с диагнозом БВ нами выявлено нарушение КССФВ с коллагеном I и/или коллагеном III типа, при этом случаи с нарушением КССФВ с коллагеном III типа составили 2:1.

Таким образом, выполнение исследований КССФВ с коллагеном I и III типов представляется целесообразным в рамках дифференциально-диагностического поиска у пациентов с признаками чрезмерной кровоточивости [8; 9].

Выводы

Несмотря на очевидные достижения, в диагностике БВ все еще остаются проблемы, требующие своего решения. Одним из направлений по улучшению диагностики наиболее часто встречающейся коагулопатии – БВ, является, по нашему мнению, апробация и внедрение в клиническую практику новых лабораторных тестов. В частности, в качестве такого перспективного теста может рассматриваться оценка коллаген-связывающей способности ФВ.

Список литературы

1. Md. Imtaiyaz Hassan, Aditya Saxena and Faizan Ahmad. Structure and function of von Willebrand factor: the protei that is deficient and/ or abnormal in inherited von Willebrand disease. - Blood Coagulation and Fibrinolysis, 2012. - Vol 23 No 1; p.11 – 15, 17 – 19.
2. Christopher Ng., David G. Motto, Jorge Di Paola. Diagnostic approach to von Willebrand disease. – Blood, 2015. - Volume 125. No 13; 2031.
3. O'Brien SH. Bleeding scores: are they really useful? - Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012. - 2012: 152-156.
4. Federici A.B., Bucciarelli P., Castaman G., et al. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. – Blood, 2014. -123(26): 4037-4044.
5. Vanhoorelbeke K., Cauwenberghs N., Vauterin S., Schlamadinger A., Mazurier C., Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. – Thromb Haemost, 2000. - 83(1): 107-113.
6. Chen D., Daigh C.A., Hendricksen J.I., et al. A highly sensitive plasma von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF: R Co) activity assay by flow cytometry. - J Thromb Haemost., 2008. - 6(2): 323-330.
7. Flood V.H., Gill J.C., Morateck P.A., et al. Gain - offunction GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. – Blood, 2011. - 117(6): e67-e74.
8. Колосков, А.В. Особенности течения болезни Виллебранда у женщин. – СПб: Издательство «Коста», 2014. – 32с.
9. Колосков, А.В. Диагностика болезни Виллебранда. – СПб: Издательство «Коста», 2014. – 40 с.

ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННЫЙ СИНДРОМ У БОЛЬНЫХ НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ

Игнатъев С. В., Зотина Е. Н., Ивашкина Е. П., Фокина Е. С., Лянгузов А. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)

HYPERCOAGULABLE SYNDROME IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

Ignatyev S. V., Zotina E. N., Ivashkina E. P., Fokina E. S., Ljanguzov A. V.

Federal State Budgetary Science Institution «Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov, Russia
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: feb74@yandex.ru, enzotina@mail.ru, ivashkinaep@mail.ru, yelena-med@mail.ru, dedalex@bk.ru

Проведена оценка гиперкоагуляционного синдрома у 36 больных неходжкинскими лимфомами (НХЛ). Показано, что у больных НХЛ на момент постановки диагноза, по данным тромбодинамики, наблюдаются нарушения системы гемостаза со склонностью к гиперкоагуляции, наиболее выраженные на продвинутых стадиях опухолевого процесса. При достижении ремиссии сохранялась склонность к гиперкоагуляции.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, гиперкоагуляционный синдром, тромбодинамика

An evaluation of hypercoagulation syndrome in 36 patients with non-Hodgkin's lymphomas (NHL) was performed. It was shown that in patients with NHL at the time of diagnosis based on thrombodynamics, hemostasis disorders with a tendency to hypercoagulable, most pronounced at advanced stages of the tumor process, are observed. In achieving remission remained a tendency to hypercoagulability.

Keywords: non-Hodgkin's lymphomas, hypercoagulable syndrome, thrombodynamics

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) – это гетерогенная группа злокачественных лимфопролиферативных заболеваний, различающихся по биологическим свойствам, морфологическому строению, клиническим проявлениям, ответу на терапию и прогнозу [1]. Одной из ведущих причин высокой смертности при НХЛ являются тромботические осложнения [2]. По данным литературы, венозные тромбозы при НХЛ встречаются у 8-15% пациентов, что значительно превосходит частоту в общей популяции [3, 4]. Этот факт является патогенетически обоснованным. Быстрорастущая опухоль может сдавливать и прорастать сосуды, а также повреждать их эндотелиальный слой, что является причиной гемодинамических нарушений и активации внешнего пути коагуляционного каскада. Сопутствующие основному заболеванию воспалительные процессы сопряжены с активацией системы комплемента (С3а, С5а, С6-С9 - мембраноатакующий комплекс) и с выработкой таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухоли- α

и интерлейкин-1 β , что, в свою очередь, усугубляет гиперкоагуляционные сдвиги [5]. Опухолевые клетки презентуют на своей поверхности тканевой фактор и продуцируют прокоагулянты; одни из них непосредственно активируют фактор X [6, 7], другие – обладают сходными свойствами с фактором XIII, что ускоряет формирование протромбиназного комплекса и усиливает прочность фибринового сгустка [8].

В последнее время все большее значение в развитии тромботических состояний отводится белково-фосфолипидным частицам клеточных мембран лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и эпителиальных клеток – микровезикулам, концентрация которых в крови значительно повышается у больных лимфопролиферативными заболеваниями [9]. Известно, что цитостатическая терапия, глюкокортикостероиды, применяющиеся при лечении гемобластозов, обладают прокоагулянтными свойствами и могут быть непосредственной причиной тромбоза [10-12]. Среди больных НХЛ преобладают лица старшего и пожилого возраста с сердечно-сосудистыми заболеваниями, что еще больше увеличивает риск развития тромботических осложнений [6].

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности изучения гиперкоагуляционных состояний и поиска прогностических лабораторных критериев тромботических осложнений у пациентов с НХЛ.

Цель исследования. Изучить гиперкоагуляционный синдром у больных НХЛ на разных стадиях заболевания по данным общепринятых коагуляционных и интегральных тестов исследования гемостаза.

Материалы и методы. В исследование включено 36 больных с В-клеточными НХЛ высокой степени злокачественности. Возраст пациентов варьировал от 18 до 76 лет. Медиана возраста составила 58 лет. Среди обследованных было 20 (56%) мужчин и 16 (44%) женщин. Диагноз НХЛ устанавливали на основании гистологического исследования биоптатов опухолевой ткани, преимущественно лимфатических узлов, с иммуногистохимической верификацией опухолевого процесса [13]. Были выделены следующие иммуноморфологические варианты НХЛ: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (75%), первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (11%), лимфома из клеток зоны мантии (14%). Стадию заболевания определяли согласно классификации Ann Arbor [14]. У 4 (11%) пациентов диагностирована II стадия, у 15 (42%) – III, у 17 (47%) – IV стадия НХЛ. У 22 (61%) больных выявлены симптомы опухолевой интоксикации (В-симптомы). Общий соматический статус пациентов оценивали по шкале ECOG: у 3 (8%) больных он соответствовал 0 баллам, у 10 (28%) – 1, у 15 (42%) – 2, у 8 (22%) – 3 баллам.

Параметры свертывающей системы крови оценивали по следующим показателям: протромбиновое время по Квику (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), концентрация фибриногена по Клауссу (Ф), тромбодинамика. Основными параметрами тромбодинамики

являются начальная (V_i) и стационарная скорость роста сгустка (V_s), размер сгустка (CS), наличие спонтанных сгустков вдали от активатора свертывания, плотность сгустка (D) и время задержки роста сгустка (T_{lag}).

Исследование показателей гемостаза пациентам проводили на этапе постановки диагноза до начала проведения специфической противоопухолевой терапии и при достижении ремиссии после 4-6 курсов полихимиотерапии. Больные получали стандартные режимы полихимиотерапии, включающими в себя моноклональные анти-CD20 антитела (ритуксимаб). Группу сравнения составили 207 практически здоровых жителей Кировской области – доноров крови и ее компонентов, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

Статистическую обработку данных проводили с помощью статистической программы Statistica 6.0. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Для изучения различий количественных признаков использовали t-критерий Стьюдента. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что у пациентов с НХЛ на этапе постановки диагноза скоростные параметры и размер сгустка, по данным тромбодинамики, были смещены в область гиперкоагуляции по сравнению с контрольной группой: $V_i = 52,3 \pm 1,57$ мкм/мин и $48,33 \pm 0,30$ мкм/мин, соответственно ($p = 0,014$), $V_s = 31,4 \pm 1,45$ мкм/мин и $25,5 \pm 0,17$ мкм/мин, соответственно ($p = 0,005$), $CS = 1274,6 \pm 38,37$ мкм и $1053,8 \pm 4,91$ мкм, соответственно ($p = 0,038$). Время задержки роста сгустка и плотность сгустка были в пределах нормальных значений: $T_{lag} = 1,4 \pm 0,06$ и $1,1 \pm 0,01$ мин ($p = 0,003$), $D = 2584,1 \pm 1026,39$ и $2511,2 \pm 267,62$ у.е. ($p = 0,736$). У 14 (39%) больных НХЛ наблюдалась выраженная гиперкоагуляция – появление спонтанных сгустков. Показатели свертывающей системы крови (ПВ, АЧТВ, Ф) у больных НХЛ на этапе постановки диагноза значимо не отличались от показателей группы сравнения и составили $86,2 \pm 4,78\%$, $23,5 \pm 1,69$ сек., $3,63 \pm 0,77$ г/л, соответственно ($p > 0,05$).

При анализе данных тромбодинамики в зависимости от стадии опухолевого процесса обнаружено, что склонность к гиперкоагуляции наиболее выражена у пациентов, имеющих продвинутые стадии (III-IV), по сравнению с больными с ранними стадиями (I-II): $V_i = 54,7 \pm 1,64$ мкм/мин и $50,26 \pm 1,78$ мкм/мин, соответственно ($p = 0,009$); $V_s = 32,1 \pm 1,72$ мкм/мин и $28,3 \pm 1,53$ мкм/мин, соответственно ($p = 0,012$); $CS = 1327,5 \pm 32,68$ мкм и $1168,4 \pm 29,05$ мкм, соответственно ($p = 0,005$).

При достижении ремиссии у больных НХЛ, по данным тромбодинамики, сохранялось состояние гиперкоагуляции: $V_i = 53,0 \pm 1,76$ мкм/мин., $V_s = 32,1 \pm 1,58$ мкм/мин, $CS = 1237,2 \pm 36,25$ мкм, $T_{lag} = 1,4 \pm 0,06$ мин. У 15 (41%) пациентов наблюдалось появление спонтанных сгустков. Происходил сдвиг показателей ПВ, АЧТВ, Ф в сторону гиперкоагуляции: $119,0 \pm 6,21\%$, $24,7 \pm 1,68$ с, $5,01 \pm 1,47$ г/л ($p < 0,05$).

Таким образом, у больных НХЛ на момент постановки диагноза, по данным тромбодинамики, наблюдались нарушения системы гемостаза со склонностью к гиперкоагуляции, наиболее выраженные на продвинутых стадиях опухолевого процесса. При достижении ремиссии у больных НХЛ склонность к гиперкоагуляции сохранялась. Стандартные показатели свертывающей системы крови (ПВ, АЧТВ, Ф) фиксировали нарушение гемостаза только после проведения химиотерапии.

Список литературы

1. Поддубная, И.В. Неходжкинские лимфомы [Текст] // Клиническая онкогематология / Под ред. Волковой М.А. – М.: Медицина, 2006. – С. 734-770.
2. Khorana, A.A. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy [Text] / A.A. Khorana, C.W. Francis, E. Culakova et al. // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, №3. – P. 632–634.
3. Липай, Н.В. Тромботические осложнения у детей с неходжкинскими лимфомами [Текст] / Н.В. Липай, А.С. Фёдорова, В.В. Дмитриев // Онкогематология. – 2013. – №2. – С. 41-45.
4. Lip, G.Y. Cancer and prothrombotic state [Text] / G.Y. Lip, B.S. Chin, A.D. Blann // Lancet Oncol. – 2002 – Vol. 3, №1. – P. 27–34.
5. Boral B.M. Disseminated Intravascular Coagulation [Text] / B.M. Boral, D.J. Williams, L.I. Boral // Am. J. Clin. Pathol. – 2016. – Vol. 146, №6. – P. 670-680.
6. Hillen, H.F. Thrombosis in cancer patients [Text] / H.F. Hillen // Ann. Oncol. – 2000. – Vol. 11, Suppl. 3. – P. 273-276.
7. Falanga, A. Isolation and characterization of cancer procoagulant: A cysteine proteinase from malignant tissue [Text] / A. Falanga, S.G. Gordon // Biochemistry. – 1985. – Vol. 24, №20. – P. 5558-5567.
8. Loreto, M.F. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management [Text] / M.F. Loreto, D.E. Martinis, M.P. Corsi // Pathol. Oncol. Res. – 2000. – Vol. 6, №4. – P. 302-312.
9. De Luca, L. Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia [Text] / L. De Luca, G. D’Arena, V. Simeon et al. // Leukemia & lymphoma. – 2017. – Vol. 58, №6. – P. 1424-1432.
10. Athale, U.H. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy [Text] / U.H. Athale, A.K. Chan // Thromb. Res. – 2003. – Vol. 111, №4-5. – P. 199-212.
11. Beinart, G. Thrombosis associated with L-asparaginase therapy and low fibrinogen levels in adult acute lymphoblastic leukemia [Text] / G. Beinart, L. Damon / Am. J. Hematol. – 2004. – Vol. 77, №4. – P. 331–335.
12. Zakarija, A. Adverse effects on hemostatic function of drugs used in hematologic malignancies [Text] / Zakarija A., Kwaan H.C. // Semin. Thromb. Hemost. – 2007. – Vol. 33, №4. – P. 355-364.
13. Jiang, M. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas [Text] / M. Jiang, N.N. Bennani, A.L. Feldman // Expert Rev. Hematol. – 2017. – Vol. 10, №5. – P. 405-415.
14. Armitage, J.O. Staging non-Hodkin lymphoma [Text] / J.O. Armitage // CA Cancer J. Clin. – 2005 – Vol. 55, №6. – P. 368-376.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО VIII ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ

Игнатъев С.В., Вязникова О.Э., Тимофеева М.А., Ивашкина Е.П., Лянгузов А.В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)*

EXPERIENCE OF USING THE RUSSIAN CONCENTRATE OF BLOOD COAGULATION FACTOR VIII IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA

Ignatyev S. V., Vyaznikova O. E., Timofeeva M. A., Ivashkina E. P., Lyanguzov A. V.

*Federal State Budget Institution of Science «Kirov Research Institute of Haematology and Blood Transfusion of Federal Medicobiological Agency»
(610027, Kirov, Russia, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: feb74@yandex.ru, chempiolya@yandex.ua, timofeevamargaret@list.ru,
ivashkinaep@mail.ru, yelena-med@mail.ru, dedalex@bk.ru*

За последние два года в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России заместительную терапию мороктокогом альфа получали 17 больных гемофилией А, 12 - с острым геморрагическим синдромом и 5 - оперированных. Всего выполнено 122 вливания, введено 344500 МЕ фактора. Эффективность и безопасность препарата оценивались на основании клинико-лабораторных показателей. Полученные данные свидетельствуют о безопасности отечественного рекомбинантного концентрата ф.VIII и его клинической и лабораторной эффективности, сопоставимой с аналогичными концентратами факторов свертывания крови других производителей, полученными как из плазмы крови, так и рекомбинантным способом.

Ключевые слова: мороктоког альфа, гемофилия, эффективность, безопасность

Over the past two years in to the clinic of FSBIS KRIH&BT FMBA of Russia, 17 patients with hemophilia A were receiving substitution treatment for the moroctocog alfa, 12 patients with acute hemorrhagic syndrome and 5 - operated. A total of 122 infusions were performed, 344,400 IU of the drug was administered. The efficacy and safety of the drug was evaluated on the basis of clinical and laboratory indicators. The obtained data testify to the safety of the Russian recombinant concentrate FVIII and its clinical and laboratory efficacy comparable with similar concentrates of coagulation factors of other manufacturers, obtained both from blood plasma and recombinantly.

Keywords: moroctocog alfa, hemophilia, efficacy, safety

Гемофилия представляет собой наследственное заболевание, характеризующееся нарушением синтеза факторов свертывания крови VIII (гемофилия А) или IX (гемофилия В). Наследование патологии происходит по рецессивному признаку, сцепленному с половой X-хромосомой, поэтому клиника его проявляется преимущественно у лиц мужского пола. Заболеваемость гемофилией колеблется от 6,6 до 18 случаев на 100 000 жителей мужского пола [1, 2, 3]. В 10-13% встречаются спорадические формы болезни, которые связаны с реализацией скрытого гетерозиготного носительства или со спонтанными генетическими мутациями [1]. Согласно международной классификации болезней, выделяют тяжелую форму с активностью

факторов меньше 1%, средней тяжести – от 1 до 5% и легкую – выше 5%. Основным клиническим проявлением заболевания является геморрагический синдром, который протекает по гематомному типу, капиллярные кровотечения выявляются значительно реже. Наиболее часто встречаются рецидивирующие кровоизлияния в крупные суставы. Реже развиваются обширные подкожные, межмышечные, субфасциальные и забрюшинные гематомы, которые могут осложняться инфицированием и приводить к формированию абсцессов, флегмон, сепсиса. Может также наблюдаться асептический некроз с замещением гематом соединительной тканью, что является причиной деформирующих артрозов и множественных контрактур с последующей инвалидизацией.

Основным методом лечения гемофилии до настоящего времени остается заместительная терапия дефицитными факторами свертывания крови. С момента открытия криопреципитата (КП) в 1965 г. и разработки технологии получения концентратов факторов свертывания крови из донорской плазмы в 1968 г. в терапии геморрагических осложнений при гемофилии были достигнуты удовлетворительные результаты. Однако их применение сопряжено с риском инфицирования гемотрансмиссивными инфекциями, частыми аутоиммунными реакциями, в том числе появлением ингибиторов к дефицитным факторам свертывания крови. В подавляющем большинстве случаев ингибитор возникает в ответ на повторные введения антигемофильных препаратов. Отличительная особенность ингибиторных форм гемофилии заключается в том, что заместительная терапия становится неэффективной, а введение недостающего фактора приводит к повышению титра ингибитора и требует большей дозы препарата (создается порочный круг). В период с 1979 по 1985 гг. большое количество больных гемофилией, которым вводили КП, было инфицировано вирусом иммунодефицита человека; многие умерли по этой причине. Вирус гепатита С начали определять только в 1989 г.; тогда стало понятно, что большинство больных гемофилией уже заражены им. Впоследствии список гемотрансмиссивных инфекций был расширен. По данным литературы (2001 – 2005 гг.), посттрансфузионный вирусный гепатит встречался у 60-80% взрослых больных гемофилией и у 41-56% детей, получавших компоненты крови, не прошедших вирусинактивацию [2-5].

За последние десятилетия произошли значительные изменения в лечении гемофилии, что связано с развитием рекомбинантной ДНК-технологии получения белков. Созданы более безопасные и эффективные концентраты факторов свертывания крови. Однако, несмотря на меры, направленные на вирусную инактивацию (термическая и сольвент-детергентная обработка, очищающая хроматографическая сепарация и ультрафильтрация), ни один препарат, производимый из плазмы крови, не дает полной гарантированной безопасности. Данный факт применим и к некоторым рекомбинантным препаратам факторов свертывания, которые в качестве стабилизатора со-

держат человеческий альбумин.

Долгое время препараты факторов свертывания крови на территории Российской Федерации в должном объеме не производились. В связи с этим представляет собой интерес новый отечественный концентрат VIII фактора свертывания крови – мороктокога альфа, полученный рекомбинантным путем, выпускаемый компанией ЗАО «ГЕНЕРИУМ». На рынке данное лекарственное средство стало доступным с 2015 г.

Цель исследования. Оценить эффективность и безопасность применения мороктокога альфа у больных гемофилией А с геморрагическими осложнениями на фоне малых инвазивных вмешательств и операций.

Материалы и методы

За последние два года в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России заместительную терапию мороктокогом альфа получали 17 больных гемофилией А, медиана возраста составила 29 лет. У 11 из них была установлена тяжелая (ф. VIII менее 1%), у 3 – среднетяжелая (ф. VIII 1-5%) и у 3 – легкая (ф. VIII более 5%) форма заболевания.

Пациенты были разделены на две группы. В первую вошли 12 больных гемофилией с острым геморрагическим синдромом в виде гемартрозов различной локализации, во вторую – 5 оперированных больных. У всех пациентов до и после трансфузии мороктокога альфа проводился мониторинг показателей коагулограммы (АПТВ, протромбин по Квику, тромбиновое время, количество фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов, Хагеман-зависимый фибринолиз, активность фактора VIII и ингибитор к нему) и биохимических параметров крови (активность аминотрансфераз, концентрация билирубина, мочевины, креатинина, общего белка). Эффективность заместительной терапии мороктокогом альфа также оценивали и по клиническим данным: у больных с регрессированием геморрагического синдрома без дополнительного назначения препарата результат расценивали как отличный, хороший – с дополнительным введением концентрата ф. VIII, удовлетворительный – при рецидивировании кровотечений на фоне проводимого лечения.

В первой группе всем пациентам на фоне заместительной терапии выполнялись малые инвазивные вмешательства – пункционная аспирация излившейся крови в полость сустава. Произведено 64 вливания – 156000 МЕ мороктокога альфа, средняя кратность введений препарата на одного больного за госпитализацию составила 5,4; средняя разовая доза концентрата ф. VIII на одно введение – 34,5 МЕ/кг. Благодаря комплексной терапии уменьшение отечности, болезненности в области пораженного сустава и восстановление активных и пассивных движений отмечалось на 2-3 сутки; купирование всех признаков воспаления происходило на 7 сутки. Клиническая эффективность препарата у пациентов данной группы была отличной. При анализе активности ф. VIII в плазме обследованных установлено, что через час после введения мороктокога альфа, в перерасчете на дозу 1 МЕ/кг

массы тела, в среднем происходило увеличение уровня фактора на 2,2%.

Во второй группе 5 пациентам были выполнены ампутация средней фаланги II пальца левой кисти, остеосинтез DHS-пластиной при чрезвертельном переломе левой бедренной кости, экстракция зуба 3.7 (нижний левый моляр), удаление металлоконструкции после остеосинтеза и грыжесечение паховой грыжи. Всем больным в периоперационный период проводилась заместительная терапия мороктокогом альфа, произведено 58 вливаний – 188500 МЕ, средняя кратность введения препарата на одного пациента за госпитализацию составила 11,6; средняя разовая доза концентрата ф. VIII на одно введение – 50,4 МЕ/кг. При анализе активности ф. VIII в плазме пациентов установлено, что через час после введения мороктокога альфа – доза 1 МЕ/кг массы тела в среднем повышала уровень фактора на 1,8%. Клиническая эффективность препарата у 4 пациентов была отличной. Одному больному интраоперационно, ввиду большой травматичности хирургического пособия – остеосинтеза, потребовалась дополнительная инъекция препарата, при этом превышения рекомендуемых производителем доз не было. Объем кровопотери в процессе и после операций ни у одного из пациентов значимо не превышал таковых при сопоставимых манипуляциях у лиц, не страдающих нарушениями гемостаза. Рецидивного геморрагического синдрома не наблюдалось.

В обеих группах достоверных изменений биохимических показателей до и после введения фактора не установлено. Инфекционные осложнения, аллергические реакции, появление ингибитора и другие нежелательные явления на введение лекарственного средства не зарегистрированы.

Таким образом, проанализированные лабораторные и клинические данные, полученные до и на фоне заместительной терапии мороктокогом альфа (122 вливания – 344500 МЕ), свидетельствуют о безопасности отечественного рекомбинантного концентрата ф. VIII. Эффективность препарата практически у всех пациентов оценена на отлично, и только в одном случае, ввиду большой травматичности операции, эффект расценен как хороший. Повышение активности ф. VIII на 2,2% в первой и на 1,8% во второй группе при расчете на введение 1 МЕ/кг мороктокога альфа сопоставимо с результатами применения аналогичных концентратов факторов свертывания крови других производителей, полученных как из плазмы, так и рекомбинантным способом.

Список литературы

1. Поддубная, И.В. Неходжкинские лимфомы [Текст] // Клиническая онкогематология / Под ред. Андреев Ю.Н. Протокол ведения больных: Болезнь Виллебранда (ГОСТ Р 52600.1 - 2008). Гемофилия (ГОСТ Р 52600. 3 - 2008) [Текст] / Андреев Ю.Н., Баркаган З.С., Буевич Е.И. и др. – М.: НБЮДИАМЕД, 2009. – 197с.
2. Стрельцов, А.Г. Особенности течения вирусного гепатита С у больных гемофилией [Текст]: автореф. дис... канд. мед., наук / А.Г. Стрельцов. – СПб, 2005. – 24с.
3. Яценко, Е.А. Гемофилия у детей и ассоциированный с ней вирусный гепатит С [Текст]: автореф. дис... канд. мед. наук / Е.А. Яценко. – Москва, 2001. – 22с.

4. Posthouwer, D. Hepatitis C infection among Dutch hemophilia patients: a nationwide cross-sectional study of prevalence and antiviral treatment [Text] / D. Posthouwer, I. Plug, J.G. Van Der Bom // Hemophilia. 2005. - Vol. 11. -P. 270-275.

5. Яценко, Е.А. Частота и клинические особенности вирусного гепатита С у детей, страдающих гемофилией [Текст] / Е.А. Яценко, А.В. Мазурин, Л.Н. Якунина, А.Р. Рейзис, Т.Г. Плахута, Г.И. Сосков // Гематология и трансфузиология. 2001, Т. 46; 1: - с. 28 – 29.

**ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ,
ПРЕДРАСПОЛАГАЮЩИХ К ТРОМБОФИЛИИ,
ПРОТРОМБОТИЧЕСКИМ СОСТОЯНИЯМ И НАРУШЕНИЯМ
ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНОЙ
ДИСФУНКЦИЕЙ**

Киселева А.Н., Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Попонина Е.А., Игнатъев С.В., Ярыгин Д.Н.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства» 610027, Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

**SIGNIFICANCE OF GENETIC POLYMORPHISMS PREDISPOSING TO
THROMBOPHILIA, PROTHROMBOTIC CONDITIONS AND DISORDERS OF
FOLATE METABOLISM, IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE DYSFUNCTION**

Kiseleva A.N., Butina E.V., Zaitseva G.A., Poponina E.A., Ignatyev S.V., Yarygin D.N.
Federal State Budget Institution of Science «Kirov Research Institute of Haematology and Blood
Transfusion of Federal Medicobiological Agency»
(610027, Kirov, Russia, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: kiseleva@niigpk.ru, butina@niigpk.ru, zaytseva@niigpk.ru,
senkina.elena@rambler.ru, feb74@yandex.ru, denisny.kirov@gmail.com

Представлены данные о частоте выявления генетических мутаций, ассоциированных с тромбофилией, протромботическими состояниями и нарушениями ферментов фолатного цикла (F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTFFR, MTR, MTRR), у женщин с первичным бесплодием, осложненными родами, замершими беременностями и у женщин без нарушений процессов репродукции.

Ключевые слова: полиморфизм, фертильность, тромбофилия, протромботические состояния, фолатный обмен

Presents data on the prevalence of genetic mutations associated with thrombophilia, prothrombotic conditions and disorders of folate cycle enzymes (F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTFFR, MTR and MTRR). Assess the nature of the distribution of mutant alleles in women with primary infertility, defective pregnancy, recurrent pregnancy loss and in women without violations of reproduction processes.

Keywords: polymorphism, fertility, thrombophilia, prothrombotic conditions, folate metabolism

Несмотря на активное развитие новых репродуктивных технологий, частота гестационных потерь у женщин остается на высоком уровне - 15-20%. Доля инфертильных супружеских союзов в целом составляет 8,0-17,5% и с каждым годом только возрастает [1, 2].

При вынашивании ребенка у женщины происходит перестройка всех систем организма [3, 4], в том числе свертывающей системы крови: увеличивается активность коагуляционных факторов I, VII, VIII, IX, X; наблюдается недостаток белка S и снижение активности фибринолитической системы; развивается резистентность к активированному протеину C [5, 6].

К основным факторам наследственной тромбофилии относятся мутации генов протромбина (F2), фактора V (Лейдена) (F5), ингибитора сериновых протеаз (PAI-1) и фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) [7, 8, 9]. Мутация MTHFR предрасполагает к развитию гипергомоцистеинемии - биомаркера тромбозов, в том числе при невынашивании беременности. Установлена также ассоциация гена MTHFR с ослаблением ответа яичников на стимуляцию овуляции и «плохим» качеством ооцитов у женщин, обратившихся к методам искусственного оплодотворения [10].

Сведения о влиянии отдельных факторов на течение и исход беременности противоречивы и требуют дальнейшего уточнения с проведением сравнения частоты встречаемости мутаций в группах женщин с определенной акушерской патологией с частотой встречаемости мутаций в группе женщин без фертильных нарушений.

Выполнено исследование полиморфизмов генов, связанных с тромбофилией и протромботическими состояниями, у 538 женщин и генов фолатного цикла - у 236 женщин с расстройствами системы репродукции. Главными условиями отбора пациенток для анализа являлись неудачные исходы беременностей в анамнезе, отсутствие беременностей; невозможность забеременеть или выносить ребенка до срока после рождения нескольких детей; наличие рецидивирующих выкидышей, а также осложненные роды (роды раньше срока, отслоение плаценты, преэклампсия).

На основании данных акушерского анамнеза обследованные были дифференцированы на несколько групп:

1 группа – женщины с первичным бесплодием, без анатомических, гормональных и инфекционных этиологических факторов (114/35)*;

2 группа – женщины со срочными родами и репродуктивными неудачами (183/102)*;

3 группа – женщины с осложненными беременностями (рождение детей до 37 недель, отслоение плаценты, умеренная преэклампсия) (72/35)*;

4 группа – женщины с 2 неразвивающимися беременностями (99/44)*;

5 группа – женщины с 3 и более замершими беременностями (69/20)*.

Группы 4 и 5 сформированы в соответствии с национальным руководством «Акушерство» и рекомендациями ВОЗ.

Группа сравнения - женщины с несколькими срочными родами (2 и более), без отягощенного акушерского анамнеза и наследственной предрасположенности к тромбозам (119/76).*

*В скобках приведено количество женщин, обследованных на наличие полиморфизмов генов, ассоциированных с тромбофилией/ генов фолатного обмена.

Исследование генетических мутаций (F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR, MTR, MTRR) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-96 с наборами «Кардио Генетика Тромбофилия» и «Генетика Метаболизма

Фолатов» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Статистический анализ полученных результатов выполняли с помощью программ Microsoft Excell 2010, Biostat, расчета критерия χ^2 .

Распределение полиморфных генов, ассоциированных с тромбофилией и протромботическими состояниями у женщин с расстройствами репродуктивной системы и без нарушений фертильности представлено в таблице 1.

Таблица 1.

Частота встречаемости генетических полиморфизмов, связанных с тромбофилией и протромботическими состояниями у женщин с проблемами фертильности и без репродуктивных нарушений

Полиморфизмы	Генотипы	Частота выявления генотипа у обследуемых лиц, %					
		1 группа (n=35)	2 группа (n=183)	3 группа (n=72)	4 группа (n=99)	5 группа (n=69)	группа сравнения (n=119)
F2:20210 G/A	G/G	95,6	97,8	95,8	98,0	98,6	97,5
	G/A	4,4	2,2	4,2	2,0	1,4	2,5
	A/A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F5:1691 G/A	G/G	96,5	95,6	95,8	93,9	98,6	95,0
	G/A	3,5	4,4	4,2	6,1	1,4	4,2
	A/A	0,0	0,0	0,0	0	0	0,8
F7:10976 G>A	G/G	71,1	77,5	79,2	81,8	82,4	79,0
	G/A	25,4	21,4	19,4	18,2	17,6	19,3
	A/A	3,5	1,1	1,4	0	0	1,7
F13:G>T	G/G	44,7	50,3	56,3	49,5	43,5	46,2
	G/T	44,7	41,5	35,2	40,4	52,2	46,2
	T/T	9,6	8,2	8,5	10,1	4,3	7,6
FGB:-455 G>A	G/G	50,9	53,6	48,6	58,6	68,2	53,8
	G/A	45,6	39,9	48,6	34,3	27,5	40,3
	A/A	3,5	6,6	2,8	7,1	4,3	5,9
ITGA2:807 C/T	C/C	33,3	41,1	40,6	39,6	37,3	42,2
	C/T	50,0	41,7	47,9	52,1	46,3	47,4
	T/T	10,5	17,1	12,7	8,3	16,4	10,3
ITGB3:1565 T/C	T/T	65,8	69,8	62,5	69,4	69,6	78,2
	T/C	34,2*	27,5	36,1*	26,5	29,0	18,5*
	C/C	0,0	2,7	1,4	4,1	1,4	3,4
PAI-1:-675 5G/4G	5G/5G	14,0	13,7	15,5	18,2	13,0	16,8
	5G/4G	54,4	49,2	47,9	53,5	55,1	52,1
	4G/4G	31,6	37,2	36,6	28,3	31,9	31,1

Примечание: * $p < 0,05$, достоверные различия с группой сравнения.

Мутация гена F2 встречается в популяции в единичных случаях, ее частота составляет 1-4% [20]. В нашем исследовании в гетерозиготном со-

стоянии она была установлена у 5 (4,4%) женщин с первичным бесплодием, у 4 (2,2%) - имевших срочные роды и репродуктивные неудачи, у 3 (4,2%) - с осложненными родами, у 2 (2,0%) - с двумя неразвивающимися беременностями. Среди женщин с 3 и более гестационными потерями мутантная форма полиморфизма гена F2 была обнаружена только в одном случае (1,4%). Частота выявления гена F2 в гетерозиготной форме в группе сравнения составила 2,5%. Таким образом, не установлено статистически значимых различий в частоте распределения генотипа G/A гена протромбина в исследованных группах и группе сравнения ($p > 0,05$).

Гетерозиготная форма Лейденской мутации была идентифицирована у 4,2% женщин без репродуктивных расстройств. У женщин с первичным бесплодием и гестационными потерями частота выявления мутации гена F5 составила от 3,5% до 6,1%. Ввиду отсутствия статистически значимых различий между группами не представляется возможным сделать вывод о роли Лейденской мутации в течении и исходах беременности.

Установлена высокая частота встречаемости полиморфизмов генов F13, FGB, ITGA2, PAI-1, отвечающих за нарушения в системе фибринолиза во всех группах. Мы не обнаружили связи между наличием гомо/гетерозиготных форм указанных полиморфизмов и риском возникновения гестационных неудач. Характер распределения этих генов существенно не отличался у женщин с первичным бесплодием, регрессирующими беременностями, осложненными родами от женщин из группы сравнения без нарушения фертильности ($p > 0,05$).

При анализе частоты распространения аллелей гена ITGB3 было установлено, что в группах женщин с первичным бесплодием и осложненными родами встречаемость гетерозиготной формы данного гена составила 34,2% и 36,1%, соответственно, а в группе сравнения – 18,5% ($p < 0,05$). Возможно, это связано с тем, что ген ITGB3 кодирует белок ITGB3, определяемый как гликопротеин IIIa (GPIIIa) тромбоцитарного звена гемостаза. У женщин-носителей гена ITGB3 в гетерозиготном состоянии цитозин занимает место тимина в положении 1565 (T1565C), вследствие чего осуществляется модификация биохимических свойств белка GPIIIa и лейцин встает на место пролина в позиции 59 (Leu59Pro). У носителей генотипов T/C и C/C наблюдается склонность тромбоцитов к агрегации, что может содействовать увеличению риска образования тромбов, приводящего к заболеваниям сердечно-сосудистой системы, тромбоэмболии и нарушениям гестационного процесса ввиду тромбоза плаценты, а также нарушению погружения эмбриона в слизистую оболочку матки.

Частота выявления полиморфных генов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, у женщин с расстройствами системы репродукции и без нарушений фертильности приведена в таблице 2.

Таблица 2.

Характер распределения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного обмена, у женщин с репродуктивными расстройствами и без нарушений фертильности

Полиморфизмы	Генотипы	Частота выявления генотипа у обследуемых лиц, %					
		1 группа (n=35)	2 группа (n=102)	3 группа (n=35)	4 группа (n=44)	5 группа (n=20)	группа сравнения (n=76)
MTHFR:677 C>T	C/C	54,3	54,9	60,0	36,4	25,0	52,6
	C/T	34,3	40,2	37,1	56,8	55,0	39,5
	T/T	11,4	4,9	2,9	6,8	20,0	7,9
MTHFR:1298 A>C	A/A	51,4	49,0	42,9	45,5	40,0	53,3
	A/C	45,7	43,1	37,1	47,7	55,0	41,3
	C/C	2,9	7,8	20,0*	6,8	5,0	5,3
MTR:2756 A>G	A/A	54,3	45,1	48,6	54,5	75,0	69,3
	A/G	42,9*	51,0*	37,1	45,5*	25,0	22,7
	G/G	2,9	2,9	14,3	0	0	8,0
MTRR:66 A>G	A/A	25,7	17,6	22,9	6,8	30,0	12,0
	A/G	45,7	50,0	51,4	50,0	50,0	46,7
	G/G	28,6	32,4	25,7	43,2	20,0	41,3

Примечание: * $p < 0,05$, достоверные различия с группой сравнения.

Относительно чаще регистрировался полиморфизм MTHFR:677 в гетерозиготном состоянии у женщин с 2 регрессирующими беременностями – 56,8% и с 3 и более гестационными потерями – 55,0%. В группе сравнения встречаемость генотипа C/T составила 39,5%. Генотип T/T полиморфизма MTHFR: 677 был идентифицирован у 20,0% женщин с 3 и более гестационными неудачами, тогда как у женщин без нарушений фертильности его частота составила 7,9%. Однако и в первом, и во втором случаях статистические различия не обнаружены ($p > 0,05$).

Генотип C/C полиморфизма MTHFR:1298 достоверно чаще выявлялся у женщин с осложненными родами - 20,0% (в группе сравнения – 5,3%) ($p < 0,05$). Замена аденина на цитозин в позиции 1298 приводит к снижению активности фермента метилентетрагидрофолат редуктазы, нарушению метилирования ДНК и повреждению плода. В свою очередь, это может способствовать привычной потере беременности [20].

Гетерозиготная форма полиморфизма MTR:2756 регистрировалась достоверно чаще у женщин с первичным бесплодием, срочными родами и гестационными неудачами, с 2 неразвивающимися беременностями в 42,9%, 51,0% и 45,5% случаев, соответственно. В группе сравнения ее частота составила 22,7% ($p < 0,05$). В результате замены аденина на гуанин в позиции 2756 происходит снижение активности фермента метионинсинтазы, нарушение метаболизма гомоцистеина за счет увеличения его концентрации в плазме

крови. Гипергомоцистеинемия может стать причиной ранней отслойки плаценты, умеренной и тяжелой преэклампсии, кислородного голодания плода, врожденной патологии развития сердечно-сосудистой системы и как следствие - прерывания беременности [20].

Частота встречаемости генотипов A/G и G/G полиморфизма MTRR:66 была соизмерима в группах женщин с гестационными неудачами и в группе сравнения ($p > 0,05$).

Суммируя полученные данные, можно сделать заключение о неблагоприятном влиянии мутаций в генах ITGB3, MTHFR:1298, MTR на наступление, течение и исход беременности. Клиническое значение других полиморфных генов, ассоциированных с тромбофилией и нарушениями фолатного обмена (F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, PAI-1, MTHFR:677, MTRR), в представленном исследовании не подтверждено.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) в рамках НИР по теме «Исследование роли иммуногенетических факторов при репродуктивных неудачах».

Список литературы

1. Кузнецов, Н.Н. Молекулярно-генетическая диагностика тромбофилических состояний - генетические основы материнской, плодовой и неонатальной патологии / Н.Н. Кузнецов, А.Н. Плаксина, О.П. Ковтун и др. // Системная интеграция в здравоохранении. – 2012. – №3(17). – С. 40-51.
2. Лазаренко, В.А. Распространенность тромбофилических полиморфизмов у женщин с репродуктивными потерями в анамнезе, проживающих на территории Курской области / В.А. Лазаренко, М.В. Хруслов, М.И. Боева и др. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2014. – №2. – С. 46-49.
3. Бутина, Е.В. Диагностика иммунологического конфликта при беременности / Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2014. – №3. – С. 16-19.
4. Киселева, А.Н. Полиморфизм генов тромбофилии и фолатного обмена у женщин с привычным невынашиванием беременности / А.Н. Киселева, Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №2. – С. 32.
5. Киселева, А.Н. Полиморфизм генетических мутаций, ассоциированных с тромбофилией и протромботическими состояниями, у женщин с первичным бесплодием / А.Н. Киселева, Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева, С.В. Игнатъев, Д.Н. Ярыгин // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – №3(67) (прил. 1). – С. 196-197.
6. Sibai, B. M. Thrombophilia in pregnancy: Whom to screen, when to treat / B.M. Sibai, H.Y. How, C.L. Stella // OBG Management. – 2007 – Vol. 19(1). – P. 50-64.
7. Самышкина, Н.Е. Полиморфизм генов гемостаза и фолатного цикла у женщин с невынашиванием беременности / Н.Е. Самышкина // «Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании». – 2012. – С. 45-47.
8. Kuperman, A. Fertility, infertility and thrombophilia / A. Kuperman, P. Micco, B. Brenner // Women's Health (long Engl). – 2011. – Vol. 7(5) P. 545-553. doi: 10.2217/whe.11.61
9. Incebiyik, A. Prevalence of thrombogenic gene mutations in women with recurrent miscarriage: a retrospective study of 1507 patients / Incebiyik, N. Hilani, A. Camuzcuoglu et al // Obstet Gynecol Sci. – 2014. – Vol. 57(6). – P. 513-517.
10. Alexandru, F. Genetic and biochemical thrombosis risk markers in pregnancy. II. Homocysteine metabolism / F. Alexandru, C. Ionescu, A. Cosmin et al. // Romanian Biotechnological Letters. – 2015. – Vol. 20(35). – P. 10486-10495.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА ПАЦИЕНТА КАК ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЙ ЭТАП ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИИ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

Колосков А. В., Филиппова О. И., Васильева М. Ю., Чернова Е. В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия
(191015 Санкт-Петербург, ул.Кирочная, 41)*

STUDY OF THE HEMORRHAGIC ANAMNESIS OF THE PATIENT AS A FUNDAMENTAL STAGE OF DIAGNOSIS BLOOD COAGULATION DISORDERS

Koloskov A. V., Philippova O. I., Vasil'eva M. Yu., Chernova E. V.

*Federal state budgetary educational institution of higher professional education «North-Western state medical University n. a. I. I. Mechnikov», Saint-Petersburg, Russia (191015 Saint-Petersburg, Kirochnaya street, 41)
E-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru; Olga.Philippova@szgmu.ru;
Marina.Vasileva@szgmu.ru; Ecaterina.Chernova@szgmu.ru*

Изучение личного и семейного анамнеза чрезмерной кровоточивости является ключевым компонентом в диагностике врожденных и приобретенных нарушений свертываемости крови. Объективная оценка геморрагических симптомов является непростой задачей, поскольку рассказ о кровоточивости и толкование проявлений кровоточивости является субъективным процессом. Значимые симптомы чрезмерной кровоточивости могут быть пропущены, поскольку их могут посчитать обыденным явлением, и, с другой стороны, минимальные и незначительные симптомы могут вызвать слишком большое внимание. Для решения этой задачи проводятся многочисленные исследования, направленные на стандартизацию методов сбора и оценки геморрагического анамнеза.

Ключевые слова: *кровотечения, количественная оценка кровоточивости, меноррагия, болезнь Виллебранда*

The study of personal and family anamnesis of excessive bleeding is a key component in the diagnosis of congenital and acquired coagulation disorders. However, the evaluation of hemorrhagic symptoms is a well-recognized challenge, because the reporting and interpretation of bleeding symptoms is subjective. Significant symptoms may be overlooked because they are considered normal and minimal symptoms may be given undue consideration. In response to these challenges a number of attempts have been made to standardize bleeding histories.

Keywords: *bleeding, bleeding scores, menorrhagia; von Willebrand disease*

Изучение личного и семейного анамнеза чрезмерной кровоточивости (геморрагический анамнез) является ключевым компонентом в диагностике врожденных и приобретенных нарушений свертываемости крови, таких как дефицит факторов свертывания, например, гемофилия А (наследственный дефицит фактора VIII) или аутоиммунная гемофилия А (приобретенный дефицит фактора VIII, развивающийся вследствие выработки специфических антител на фоне вторичного, по отношению к свертывающей системе крови, заболевания) [1]. Еще более значимую роль изучение геморрагического

анамнеза играет в диагностике мягких нарушений свертывающей системы крови, таких как тромбоцитопатия и, особенно, самого частого геморрагического расстройства - болезни Виллебранда. Как известно, для генетически детерминированной качественно-количественной особенности фактора Виллебранда, обозначаемой термином «болезнь Виллебранда», характерно волнообразное изменение результатов лабораторных тестов, таких как антиген фактора Виллебранда (VWF:Ag), активность фактора Виллебранда (VWF:Act), ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда (VWF:RCo), коллаген-связывающая способность фактора Виллебранда (VWF:CB), коагуляционная активность фактора VIII (FVIII:C). Клинически конституциональные (генетически и, возможно, эпигенетически детерминированные) изменения качественно-количественных показателей фактора Виллебранда проявляются волнообразными периодами чрезмерной кровоточивости, при этом, как известно, полная прямая корреляционная связь между клиническими проявлениями и результатами лабораторных тестов отсутствует. Эта особенность биологии фактора Виллебранда (наличие у пациента периодов спонтанного снижения активности фактора Виллебранда и такого же спонтанного, без какой-либо специфической терапии, повышения его активности, когда показатели количественных и качественных тестов находятся в диапазоне нормальных величин) является основной причиной неверной диагностики, а точнее сказать, ошибочного исключения диагноза.

В последнее десятилетие в некоторых медицинских учреждениях нашей страны сформировался и закрепился «лабораторно-ориентированный» подход к обследованию пациентов при подозрении на наличие у них патологии свертывающей системы крови. При данном подходе пациенту хаотически назначаются клоттинговые (исследование показателей активности факторов свертывания), молекулярно-генетические (исследования точечных мутаций генов «тромбофилии»), агрегационные и паракоагуляционные тесты (исследование D-димера, растворимых фибрин-мономерных комплексов, тест генерации тромбина) с целью поиска, главным образом, предпосылок исключительно к чрезмерному тромбообразованию. Дополнением цифровым результатам тестов, может выступать заключение, выдаваемое сотрудниками лаборатории, включающее множество терминов из коагуляционного глоссария, но не содержащее нозологического диагноза. Более технически и экономически доступной альтернативой «развернутой коагулограмме», выступает «простая коагулограмма», включающая, как правило, минимальный набор тестов (обычно – международное нормализованное отношение (МНО), анахроничный протромбиновый индекс (ПИ), фибриноген и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)). Неудивительно, что выполнение данных исследований, не имеющих скрининговой ценности, не дает какой-либо клинически значимой информации, за исключением контроля подбора дозировки при терапии варфарином (тест

МНО) или терапии нефракционированным гепарином (АЧТВ).

Безусловно, что подобный подход не отражает научно-практические достижения ведущих отечественных и иностранных гематологических школ и не имеет ничего общего с общепринятой методологией обследования пациентов при подозрении на наличие патологии свертывающей системы крови, в основе которой находится клиническая оценка признаков чрезмерной кровоточивости и/или тромбообразования.

Тем не менее, объективная оценка геморрагических симптомов является непростой задачей как для пациентов, так и для врачей, поскольку рассказ о кровоточивости и толкование проявлений кровоточивости является субъективным процессом. Значимые симптомы чрезмерной кровоточивости могут быть пропущены, поскольку их могут посчитать обыденным явлением, и, с другой стороны, минимальные и незначительные симптомы могут вызвать слишком большое внимание. Реализация последнего сценария обусловлена высокой частотой встречаемости симптомов кровоточивости в общей популяции [2]. Для решения этой задачи проводятся многочисленные исследования, направленные на стандартизацию методов сбора и оценки геморрагического анамнеза с целью: 1) улучшить диагностическую точность и, таким образом, избежать необоснованного назначения лабораторных исследований; 2) прогнозировать риск кровотечения у конкретного больного; 3) описывать тяжесть и значимость симптомов и 4) выбирать необходимое лечение.

На протяжении многих лет исследователи работают над стандартизацией методики сбора геморрагического анамнеза путем совершенствования формулировок вопросов, которые позволяли бы разграничить пациентов с нарушениями свертывающей системы крови и здоровых лиц. В 1995 году Sramek с соавторами опубликовали свой опыт работы с опросником, который применяли у пациентов с известными нарушениями свертывающей системы крови и у контрольной группы здоровых лиц [3]. Наиболее информативными оказались вопросы о развитии кровотечения после удаления миндалин или удаления зубов и о наличии кровотечений у членов семьи пациента. Интересно, что эти вопросы имели наибольшую информативность при дискриминационном анализе (поиск отличий между известными группами), но не при проспективной оценке общей популяции, в которой, как уже отмечалось выше, имеет место высокая частота встречаемости симптомов кровоточивости. В 2005 году международное общество по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH), научный комитет по стандартизации исследований фактора Виллебранда (SSC) разработали набор временных критериев для диагностики болезни Виллебранда 1 типа, включая критерии значимости для кровотечений из слизистых оболочек [4]. С этого момента были сосредоточены усилия на разработке критериев количественной оценки кровоточивости и стандартизации этих критериев.

Как свидетельствуют результаты выполненных исследований, 5-10%

женщин обращаются за медицинской помощью в связи с жалобами на чрезмерные менструальные кровотечения, появляющиеся в тот или иной период их репродуктивной жизни [5] и, что 15% из них имеют заболевания свертывающей системы крови [6]. Несмотря на это, временной период от момента появления симптомов до постановки нозологического диагноза составляет около 16 лет [7]. Меноррагии являются вторым, после носовых кровотечений, по частоте встречаемости, геморрагическим симптомом у пациентов с болезнью Виллебранда, и наиболее часто встречающимся геморрагическим симптомом у женщин. Таким образом, инструменты (опросники), разработанные для оценки меноррагии, представляют значительную диагностическую ценность. Опросник Pictorial Bleeding Assessment Chart (РВАС) позволяет женщинам отслеживать количество прокладок или тампонов, использованных за менструальный период, а также степень их пропитывания кровью. Данный инструмент позволяет достаточно точно оценить объем менструальной кровопотери, так 100 баллов по опроснику РВАС соответствует менструальной кровопотери в объеме 80 мл [8]. Опросник разработанный Phillipp с соавторами [9,10] был апробирован у женщин без патологии тазовых органов и имеющих меноррагию ≥ 100 баллов по опроснику РВАС. Опросник состоит из 11 вопросов о личных и семейных симптомах кровоточивости. Он имеет чувствительность 89% для патологии свертывающей системы крови. Чувствительность этого инструмента была повышена до 93% при добавлении информации о дефиците железа и до 95%, если предшествующая оценка по опроснику РВАС превышала 185 баллов.

Таким образом, изучение личного и наследственного геморрагического анамнеза с использованием соответствующих инструментов (опросников) является отправной точкой в работе врача-гематолога, обследующего пациента на предмет возможной патологии свертывающей системы крови. Практика бездумного назначения «коагулограммы» и/или «исследования генов гемостаза» и интерпретации лабораторных результатов в отрыве от клинической информации является грубейшей методологической ошибкой, закономерно приводящей к последующим серьезным ошибкам диагностики и лечения.

Список литературы

1. Rydz N., James P.D. The evolution and value of bleeding assessment tools // Journal of thrombosis and haemostasis. – 2012. - V.10. - P. 2223-2229.
2. Impact of sex, age, race, ethnicity and aspirin use on bleeding symptoms in healthy adults / A.C. Mauer [at al.] // Journal of thrombosis and haemostasis. - 2011. - V.9. - P. 100-108.
3. Usefulness of patient interview in bleeding disorders / A. Sramek [et al.] // Archives of internal medicine. – 1995. – V. 155. – P. 1409-1415.
4. Sadler J.E., Rodeghiero F. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1 / Journal of thrombosis and haemostasis. – 2005. – V. 3 – P.775-777.
5. McKay H.et al. Bleeding risks associated with inheritance of the Quebec platelet disorders // Blood. – 2004. – V. 104. – P.159-165.
6. Edlund M., Blombäck M., von Schoultz B., Andersson O. On the value of menorrhagia

as a predictor for coagulation disorders // American journal of hematology. – 1996. – V. 53. – P.234-238.

7. Kirtava A. et al. Trends in clinical management of women with von Willebrand disease: a survey of 75 women enrolled in haemophilia treatment centres in the United States // Haemophilia. – 2004. – V. 10. – P.158-161.

8. Higham J.M., O'Brien P.M., Shaw R.W. Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart. British journal of obstetrics and gynaecology // - 1990. – V. 97. – P.734-739.

9. Development of a screening tool for identifying women with menorrhagia for hemostatic evaluation / C.S. Philipp [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2008. – V. 198. P. 163e1-163e8.

10. Evaluation of a screening tool for bleeding disorders in a US multisite cohort of women with menorrhagia/C.S.Philipp[etal.]//Americanjournalofobstetricsandgynecology.–2011.–V.204.– P. 209.e1-209.e7.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННУЮ ДИНАМИКУ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА И РОСТА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА В ДОНОРСКОЙ ПЛАЗМЕ

Купряшов А. А., Рафиев И. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Россия (121552, Москва, Рублёвское шоссе, 135)

EFFECTS OF STORAGE CONDITIONS ON SPACE-TEMPORARY DYNAMICS OF THROMBIN GENERATION AND FIBRIN CLOT FORMATION IN FRESH PLASMA

Kupryashov A. A., Rafiev I. A.

*A. N. Bakulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia (121552 Moscow, Rublevskoye shosse, 135)
E-mail: kupriashov2007@rambler.ru, iltimas8@mail.ru*

Изучение пространственно-временных показателей генерации тромбина и роста фибринового сгустка в донорской плазме показало, что хранение при температуре +4 °С в течение 7 дней как талой, так и жидкой плазмы не приводит к критическому снижению ее потребительских свойств, что расширяет возможности управления банком донорской плазмы.

Ключевые слова: *донорская плазма, условия хранения, коагуляционный потенциал, тромбодинамика*

A study of the spatio-temporal indices of thrombin generation and fibrin clot formation in fresh plasma does not identify to a critical decrease of consumer properties of both thawed and liquid plasmas that storage at a temperature of +4 °C for 7 days.

Keywords: *fresh plasma, storage, coagulation, thrombodinamics*

Введение

Логистика трансфузионного обеспечения вмешательств, имеющих высокий риск массивной кровопотери, требует решения вопроса разумного баланса между наличием достаточного количества готовой к переливанию донорской плазмы и исключением ее утилизации в случаях невостробованности. Также встает вопрос оптимальных условий хранения и целесообразности замораживания аутоплазмы при условии выполнения оперативного вмешательства в краткосрочной (до 7 дней) перспективе.

В настоящее время качество донорской плазмы определяется в первую очередь путем оценки активности уязвимых факторов свертывания крови или ингибиторов, таких как фактор VIII или протеин S. Однако эти селективные тесты не способны оценить суммарный коагуляционный потенциал плазмы, который является результатом баланса про- антикоагулянтов. Более объективное представление о нем можно получить при использовании глобальных методик исследования гемостаза, дефицит применения кото-

рых с этой целью очевиден.

В связи с выше сказанным представляет интерес оценка изменения коагуляционного потенциала заготовленной плазмы при замораживании и в процессе ее хранения при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ путем исследования пространственно-временной динамики образования тромбина и роста фибринового сгустка.

Материал и методы

Исследовано 60 образцов донорской плазмы, полученных методом плазмафереза на аппарате Autoferesis-C с использованием системы Plasmacell (Fenwal Blood Technologies, США) и антикоагулянта ACD (от 150 до 180 мл на процедуру). Все образцы первоначально исследовались в течение 1 часа после завершения процедуры плазмафереза. Тридцать образцов не замораживались и хранились в течение всего времени исследования при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Лабораторные исследования повторяли на следующий день после донации, через 3 и 7 суток после заготовки. Другие 30 образцов были заморожены в течение 6 часов после заготовки при температуре -50°C , сохранялись в течение суток при температуре -30°C , были разморожены на следующий день при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и в дальнейшем хранились при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Их лабораторные исследования проводили после размораживания, через 3 и 7 суток после заготовки.

Исследование пространственно-временной динамики образования тромбина и роста фибринового сгустка проводили в специальной системе видеомикроскопии (Nemascope, Россия). Образец плазмы помещался в экспериментальную камеру. Свертывание инициировали тканевым фактором, нанесенным на вкладыш-активатор. Исследование проводилось при $+37^{\circ}\text{C}$. Камера освещалась красным (625 нм) или ультрафиолетовым (365 нм) излучением. Рост сгустка обнаруживался по рассеянию красного света, образование тромбина – по флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина (AMC), образующегося после расщепления Z-Gly-Gly-Arg-AMC тромбином. Изображение регистрировали каждую минуту [1]. На основе полученных изображений рассчитывались численные параметры пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка: время задержки роста (T_{lag}), начальная (V_i) и стационарная скорости роста сгустка (V_{st}), размер сгустка через 30 минут (CS), оптическая плотность сгустка (D), а также генерации тромбина: стационарная амплитуда пика тромбина (A_{st}), скорость распространения пика тромбина (V_t), активаторный тромбиновый потенциал (ETP), пик тромбина (C_{max}), лаг период (Lag), время о достижения пика тромбина (T_{max}).

Полученные показатели тромбодинамики сравнивались на разных этапах исследования, между группами с и без замораживания, а также со значениями, полученными в образцах здоровых добровольцев ($n=60$).

Для статистического анализа результатов использовался пакет статистических программ SPSS 22.0. Для описания распределения полученных

результатов использовались среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, коэффициенты вариации, асимметрии, эксцентриситета. Сравнение результатов между двумя независимыми выборками производили при помощи критерия Манна-Уитни, между различными этапами исследования – критерия Уилкоксона.

Результаты

Сравнение показателей пространственно-временной динамики генерации тромбина и роста фибринового сгустка у волонтеров и в заготовленной аферезом плазме

При сравнении показателей динамики роста сгустка в образцах, полученных у здоровых волонтеров, и в образцах плазмы, полученных при плазмаферезе, в последних отмечается отчетливая гиперкоагуляция, проявляющаяся достоверно более высокими скоростями роста сгустка и размером сгустка через 30 минут (табл. 1). При этом в образцах плазмы при невысоком коэффициенте вариации всех значений отмечена компактное распределение V_s и CS с заметной правой асимметрией.

В образцах плазмы отмечались достоверно большие показатели генерации тромбина на активаторе (ETP, St_{max}) при заметном угнетении пространственно-временных показателей генерации тромбина (V_t , T_{max}) (табл.1). Стационарная амплитуда пика тромбина характеризуется достаточно большой вариабельностью. При том, несмотря на значимо меньшие абсолютные значения этого показателя в образцах плазмы по сравнению с образцами волонтеров, и в тех, и других отмечается два отчетливых пика (рис. 1).

Таблица 1.

Показатели пространственно-временной динамики генерации тромбина и роста фибринового сгустка у волонтеров и в донорской плазме

Показатели		Среднее арифметическое	Среднее квадратичное отклонение	Коэффициент вариации	Медиана	Коэффициент асимметрии	Коэффициент эксцентриситета	Р
Tlag, мин	доноры	0,86	0,12	14,0	0,85	0,404	-0,173	0,571
	плазма	0,85	0,09	10,6	0,85	0,676	0,990	
V_i , мкм/мин	доноры	51,45	5,48	10,7	50,2	0,287	-0,671	<0,0001
	плазма	64,80	2,73	4,2	64,4	0,022	-0,182	
V_s , мкм/мин	доноры	29,21	5,26	18,0	27,5	1,668	3,685	<0,0001
	плазма	35,50	3,91	11,0	35,0	2,201	7,502	
CS, мкм	доноры	1137,1	136,3	12,0	1089	0,992	0,725	<0,0001
	плазма	1409,3	81,8	5,8	1401	0,773	1,875	
D, усл.ед.	доноры	21896	2759	12,6	21623	0,723	0,461	0,159
	плазма	20838	3434	16,5	20794	-0,4	0,117	

Ast, Ед/л	доноры	118,9	85,9	72,2	81,4	1,208	0,806	<0,0001
	плазма	48,5	25,8	53,2	40,2	0,319	1,154	
Vt, мкм/ мин	доноры	41,9	11,4	27,2	39,4	0,324	-0,68	<0,0001
	плазма	28,5	9,6	33,7	27,7	0,139	1,259	
ЕТР, Ед×мин./л	доноры	1461,1	240,3	16,4	1417,1	0,642	-0,207	<0,0001
	плазма	1647,8	285,2	17,3	1641,3	0,243	1,443	
Cmax, Ед/л	доноры	357,9	52,5	14,7	352,9	0,599	0,826	<0,0001
	плазма	391,9	60,6	15,5	391,1	-0,129	0,658	
Lag, мин.	доноры	0,09	0,03	0,33	0,1	-1,784	4,483	0,514
	плазма	0,095	0,047	49,5	0,1	-0,184	1,823	
Tmax, мин.	доноры	1,54	0,19	12,4	1,5	5,688	37,915	<0,0001
	плазма	1,82	0,28	15,4	1,6	0,382	-1,074	

Влияние условий хранения на показатели пространственно-временной динамики генерации тромбина и роста фибринового сгустка

При хранении при +4°C время задержки роса сгустка увеличивалась в течение первых суток, но в дальнейшем менялась мало. Криоконсервация тормозила этот процесс, но при хранении талой плазмы различия достаточно быстро нивелировались (рис. 2А). Любопытным является уменьшение времени задержки роста сгустка в талой плазме к 7 суткам.

Инициальная скорость роста сгустка при хранении при +4°C прогрессивно снижалась в течение первых 3 суток. При замораживании эти процессы тормозились, и, несмотря на снижение Vi после размораживания на 3 сутки исследования, сохранялась существенная разница между размороженными и жидкими образцами (рис. 2Б).

Стационарная скорость роста сгустка в образцах, хранившихся при +4°C, в целом повторяет динамику Vi. После размораживания отмечено резкое увеличение Vs с последующим ее постепенным снижением при хранении в холодильнике. При этом в талой плазме сохранялись значимо более высокие показатели стационарной скорости роста сгустка по сравнению с жидкой плазмой (рис. 2В).

Динамика размера сгустка через 30 минут являлось суммой выше описанных процессов (рис. 2Г).

Оптическая плотность сгустка как в процессе хранения в течение суток при +4°C, так и при замораживании не претерпевала существенных изменений. Однако к 3 суткам D существенно снизилась в образцах жидкой плазмы, но увеличилась в образцах талой плазмы (рис. 2Д).

В образцах жидкой плазмы отмечалось угнетение прежде всего пространственно-временных показателей генерации тромбина (Ast, Vt, Tmax), при этом показатели генерации тромбина либо не изменялись (Cmax), либо снижались только к 3 суткам (ЕТР) (рис. 3).

В образцах талой плазмы после размораживания отмечалось нарастание пространственно-временных показателей генерации тромбина (Ast,

Vt). К 3 суткам эти значения либо приближались к уровню образцов жидкой плазмы (Ast), либо несколько превосходили их (Vt). Показатели генерации тромбина на активаторе мало отличались между группами, за исключением пика тромбина к 7 суткам, который существенно возрос в образцах талой плазмы (рис. 3).

Доля изменения лабораторных параметров между исходными образцами и через 3 и 7 суток хранения, несмотря на значимость различий, в большинстве случаев не превышала 10% (табл. 2).

Таблица 2.

Доля изменения показателей пространственно-временной динамики генерации тромбина и роста фибринового сгустка между исходными образцами и через 3 и 7 суток хранения

Показатели		Доля изменения к 3 суткам (%)	Доля изменения к 7 суткам (%)
Tlag	жидкая	-15,4	-20,8
	талая	-6,2	-19,8
Vi	жидкая	7,8	8,8
	талая	5,7	6,1
Vs	жидкая	11,1	11,5
	талая	2,8	4,4
CS	жидкая	8,6	9,8
	талая	4,0	5,2
D	жидкая	10,9	8,5
	талая	5,1	6,4
Ast	жидкая	27,0	24,6
	талая	6,2	-8,4
Vt	жидкая	6,7	3,6
	талая	-1,4	4,8
ETP	жидкая	6,3	5,4
	талая	-1,5	-5,8
Cmax	жидкая	7,2	8,1
	талая	2,1	-5,6
Lag	жидкая	4,8	-19,1
	талая	-20,4	-5,8
Tmax	жидкая	-4,8	-9,8
	талая	-2,7	-4,9

Стационарная амплитуда пика тромбина

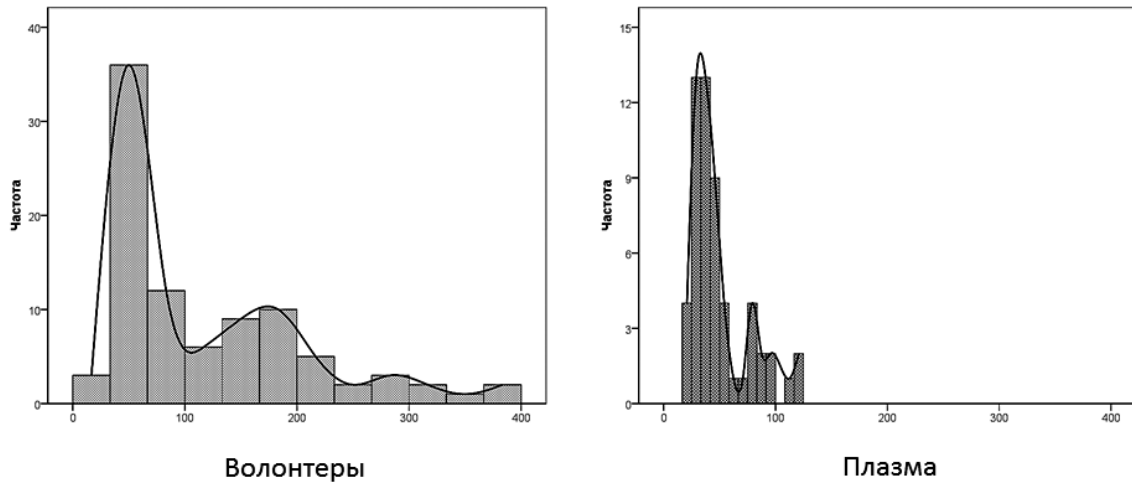
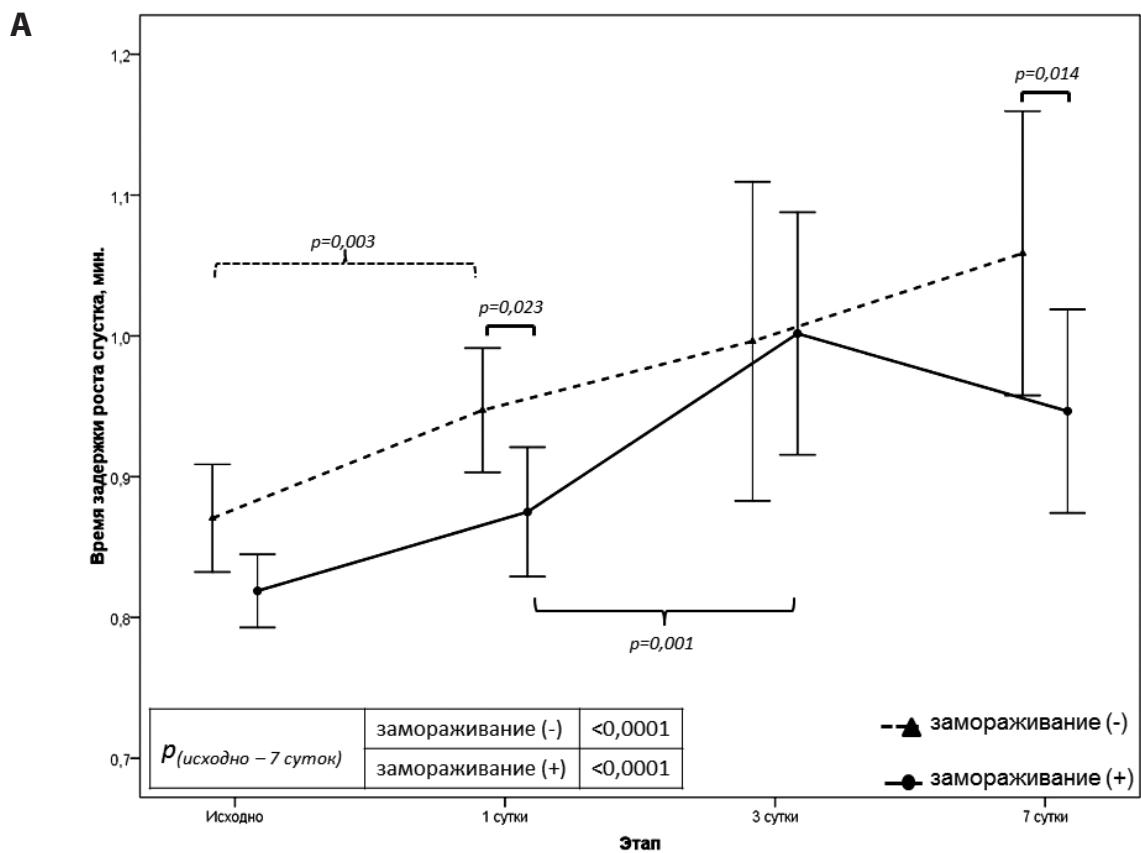
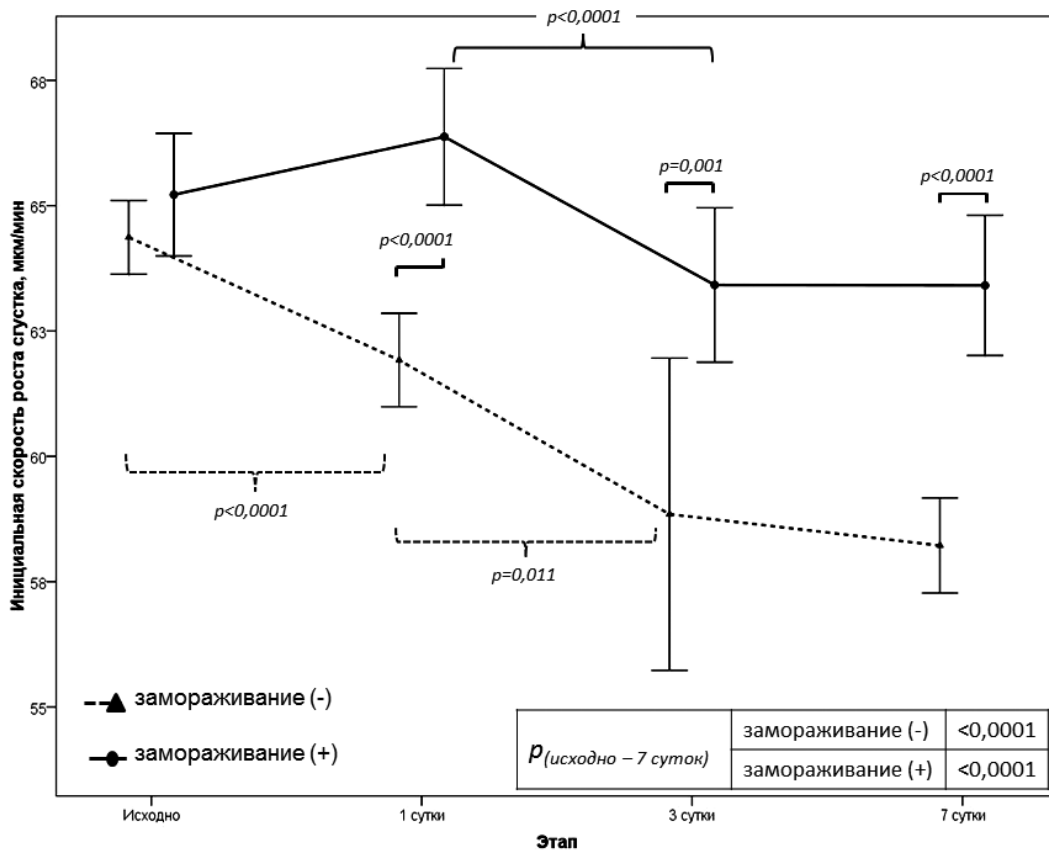


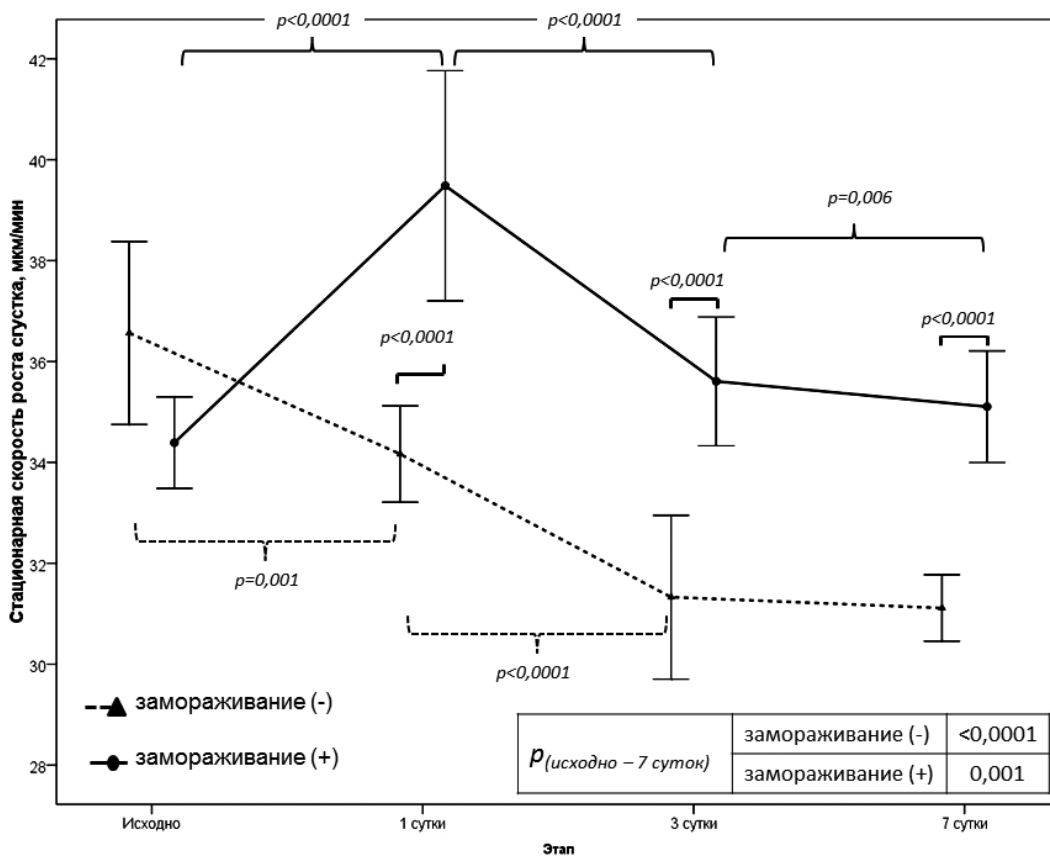
Рисунок 1. Гистограмма распределения значений стационарной амплитуды пика тромбина у волонтеров и в плазме доноров



Б



В



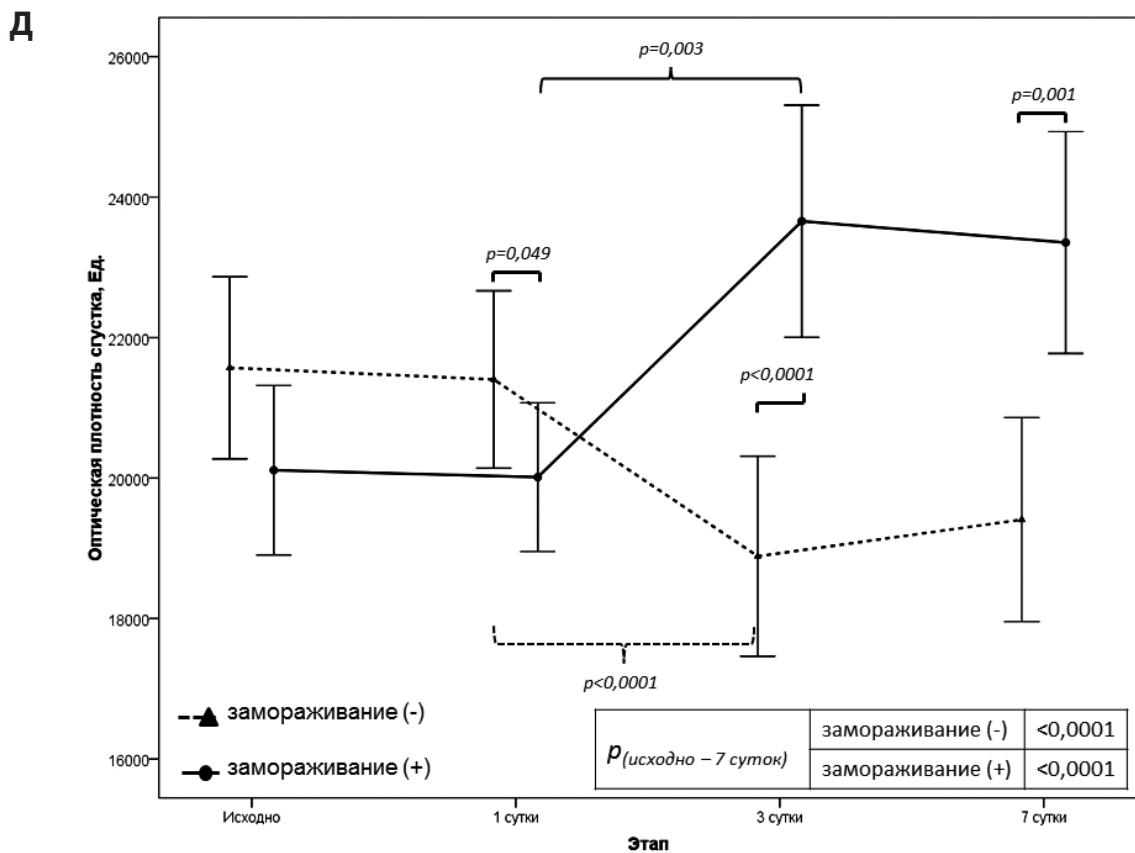
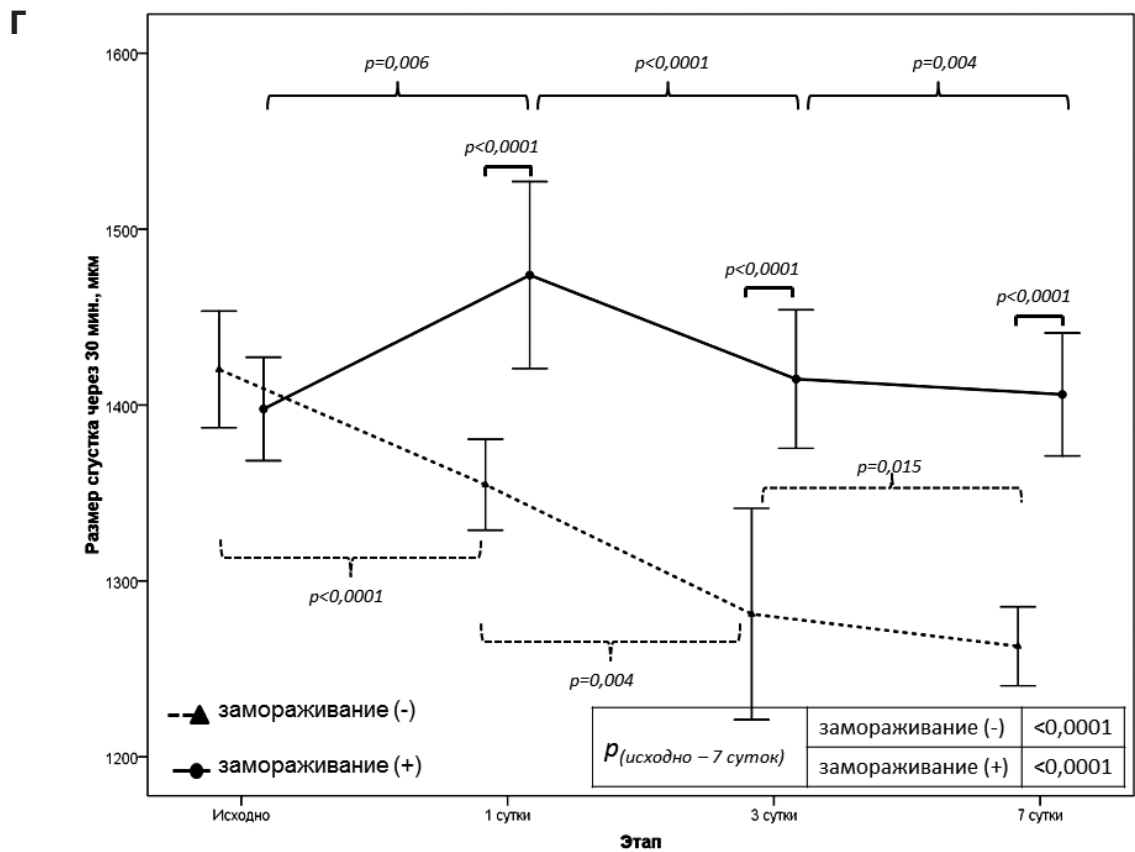
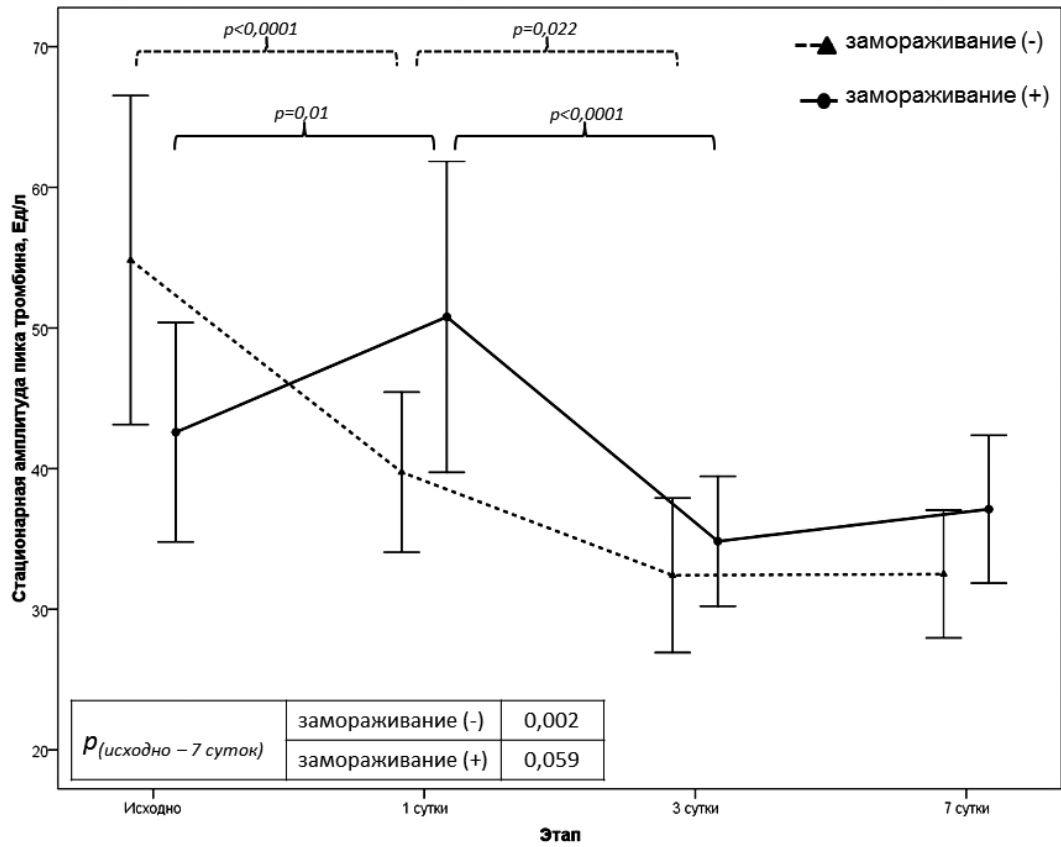
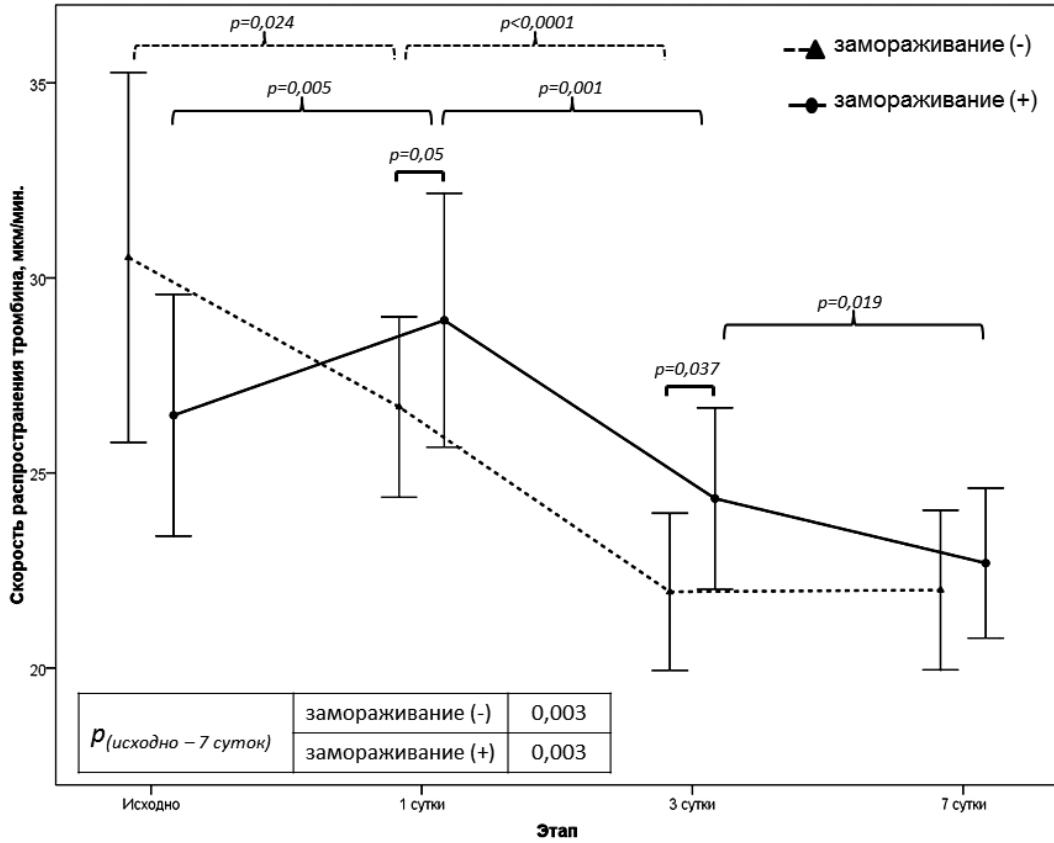


Рисунок 2. Изменение показателей пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка в зависимости от срока и условий хранения: время задержки роста сгустка (А), инициальная скорость роста сгустка (Б), стационарная скорость роста сгустка (В), размер сгустка через 30 минут (Г), оптическая плотность сгустка (Д)

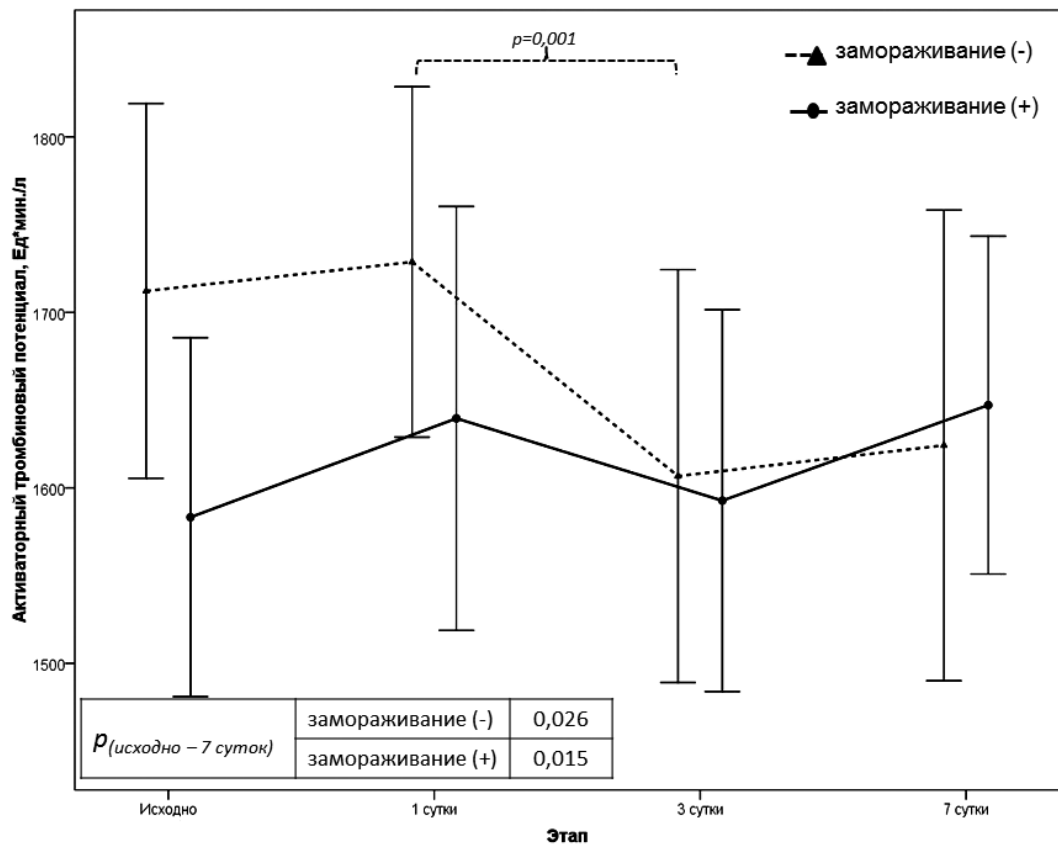
А



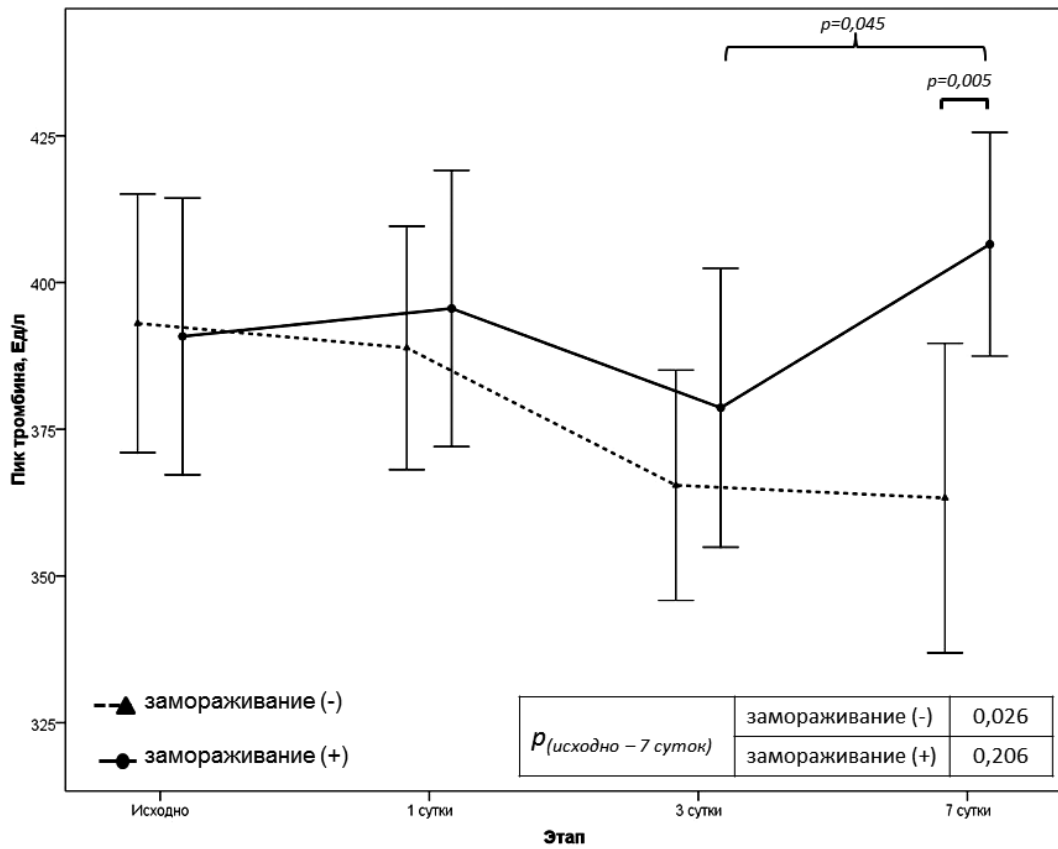
Б



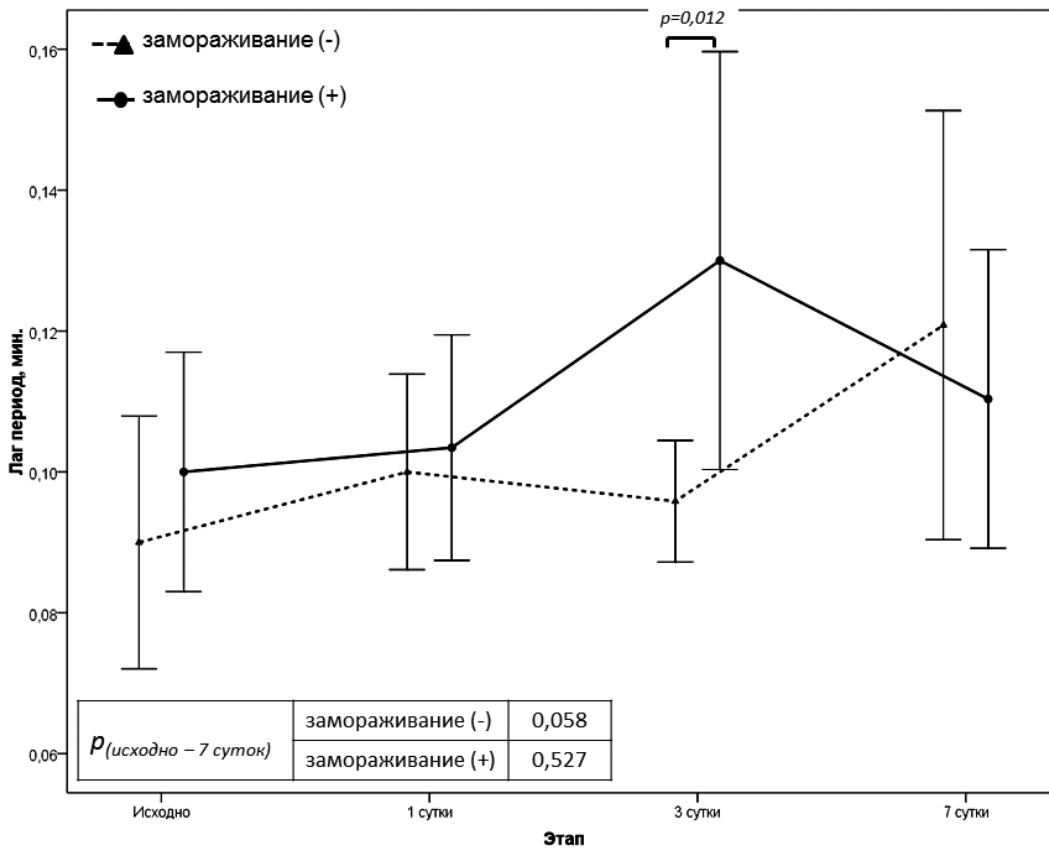
В



Г



Д



Е

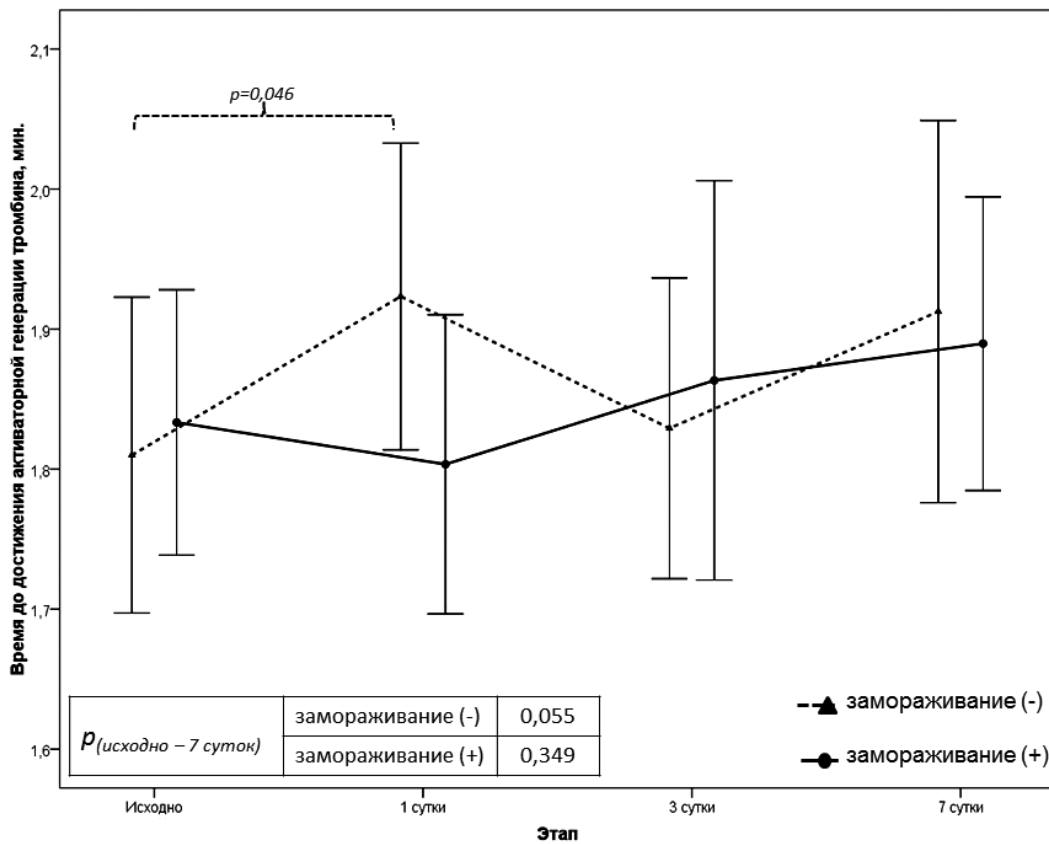


Рисунок 3. Изменение показателей пространственно-временной динамики генерации тромбина в зависимости от срока и условий хранения: стационарная амплитуда пика тромбина (А), скорость распространения пика тромбина (Б), активаторный тромбиновый потенциал (В), пик тромбина (Г), лаг период (Д), время до достижения пика тромбина (Е)

Обсуждение

Исходя из опубликованных данных о динамике клоттинговых показателей свертывания размороженной плазмы в процессе хранения, можно определить ее как прогрессирующую гипокоагуляцию. Так, по данным Gosselin RC с соавт. протромбиновое время (референсный интервал 9,8-11,9 с) в первые 10 дней хранения удлинялось с 12,8 с до 14,2 с ($p < 0,05$) на фоне снижения активности факторов VII и VIII, а также активности протеина S [2]. Thiele T. с соавт. наряду с удлинением протромбинового времени отметили и удлинение АЧТВ [3].

Внести ясность в изменения, происходящие с донорской плазмой, мог бы тест генерации тромбина. При его использовании показано, что в течение 7-10 дней хранения талой плазмы снижается скорость образования тромбина [4], удлиняется лаг-период и время до достижения пика тромбина [4], снижается пик тромбина [2,4], уменьшается эндогенный потенциал тромбина [2]. Однако в исследовании Cookson P. с соавт. не показано существенных изменений лаг-периода, пика тромбина и эндогенного потенциала тромбина при хранении талой плазмы при $+4^{\circ}\text{C}$ на протяжении 6 суток [5]. Таким образом, на сегодняшний день данные теста генерации тромбина в донорской плазме несколько противоречивы.

Наше изучение динамики образования тромбина не вполне линейно. Нами отмечено исходно большие показатели активаторной генерации тромбина в донорской плазме (по сравнению с образцами волонтеров) при угнетении пространственно-временных. Замораживание плазмы приводило к всплеску последних, и именно эти показатели оказывались наиболее чувствительны ко времени хранения.

Наше изучение пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка указывает на наличие в донорской плазме исходной гиперкоагуляции, которая усиливается в ответ на замораживание. Учитывая то, что V_i , V_s и CS являются увеличенными в исходных пробах, еще не подвергнутых временному и температурному влиянию, гиперкоагуляция может быть связана с контактной активацией [6]. Цитолиз остаточных клеток, вызванный замораживанием, может обуславливать всплеск генерации тромбина и роста сгустка после размораживания. Свой вклад в усиление свертывания может вносить изменение активности антикоагулянтов: системы протеина С [3,6] и ингибитора пути тканевого фактора, угнетение которого может сопровождаться возрастанием активности факторов VII и X [3].

Дискуссионным может являться и вопрос о влиянии этой гиперкоагуляции на потребительские свойства донорской плазмы. С одной стороны, применение субстанции с более высокой коагуляционной активностью позволяет надеяться на более высокую ее эффективность, с другой, нельзя исключить потребления тех или иных факторов свертывания с истощением отдельных коагуляционных реакций в процессе хранения.

Несмотря на снижение большинства пространственно-временных

показателей генерации тромбина и роста сгустка в течение 7 дней хранения в холодильнике, доля изменения большинства показателей не превышала 10%. При этом показатели роста сгустка сохранялись в диапазоне гиперкоагуляции.

Таким образом, в процессе заготовки и последующей переработки в донорской плазме происходят многочисленные процессы, приводящие к разнонаправленным изменениям ее коагуляционного потенциала. Хранение при температуре +4°C в течение 7 дней как талой, так и жидкой плазмы не приводит к критическому снижению ее потребительских свойств, что расширяет возможности управлению банком донорской плазмы.

Список литературы

1. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave / N.M. Dashkevich, M.V. Ovanesov, A.N. Balandina [et al.] // *Biophys J.* 2012 Nov 21; 103 (10): 2233-40.
2. Coagulation profile of liquid-state plasma / R.C. Gosselin, C. Marshall, D.M. Dwyre [et al.] // *Transfusion.* 2013 Mar; 53 (3): 579-90.
3. Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation / T. Thiele, S. Kellner, G. Hron [et al.] // *Transfusion.* 2012 Mar; 52 (3): 529-36.
4. Thrombin generation, ProC(®)Global, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in thawed plasma stored for seven days and after methylene blue/light pathogen inactivation / T. Thiele, G. Hron, S. Kellner [et al.] // *Blood Transfus.* 2016 Jan; 14 (1): 66-72.
5. Thrombin generation and coagulation factor content of thawed plasma and platelet concentrates / P. Cookson, A. Lawrie, L. Green [et al.] // *Vox Sang.* 2015 Feb; 108(2): 160-8.
6. Willebrand factor, clotting factors, and clotting inhibitors in apheresis platelet concentrates / D.R. Weiss, D. Franke, E.F. Strasser [et al.] // *Transfusion.* 2014 Mar; 54(3): 633-9.

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА И РОСТА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА ВО ВРЕМЯ ОПЕРАЦИЙ С ИСКУССТВЕННЫМ КРОВООБРАЩЕНИЕМ У ДЕТЕЙ С УНИВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ГЕМОДИНАМИКОЙ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Купряшов А. А., Гущин Д. К., Зеленикин М. М.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева»
Минздрава России, Москва, Россия
(121552, Москва, Рублёвское шоссе, 135)*

SPACE-TEMPORARY DYNAMICS OF THROMBIN GENERATION AND FIBRIN CLOT FORMATION DURING OPERATIONS WITH CARDIOPULMONARY BYPASS IN CHILDREN WITH UNIVENTRICULAR HEMODYNAMICS: PILOT STUDY

Kupryashov A. A., Gushchin D. K., Zelenikin M. M.

*A. N. Bakulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia
(121552 Moscow, Rublevskoye shosse, 135)
E-mail: kupriashov2007@rambler.ru,
medikum@inbox.ru, mzelenikin@yandex.ru*

Изучение пространственно-временных показателей генерации тромбина и роста фибринового сгустка во время искусственного кровообращения (ИК) у детей показало, что персистирующее во время ИК образование тромбина – один из важнейших механизмов постперфузионного истощения ферментативного и тромбоцитарного гемостаза и активации антикоагулянтных систем, требующее пересмотра традиционной тромбопрофилактики во время ИК.

Ключевые слова: *искусственное кровообращение, дети, кровотечения, тромбозы, тромбодинамика*

A study of the spatio-temporal indices of thrombin generation and fibrin clot formation during cardiopulmonary bypass (CPB) in infants has shown that persistent thrombin generation during CPB is one of the most important mechanisms of postperfusion depletion of enzymatic and platelet hemostasis and activation anticoagulation systems, so it is necessary to change the traditional algorithms of thrombosis prevention during CPB.

Keywords: *cardiopulmonary bypass, infants, bleeding, thrombosis, thrombodinamics*

Введение

Немногочисленность работ, касающихся оценки системы гемостаза у детей во время операций с искусственным кровообращением (ИК) и существование лишь эмпирических, не подтвержденных доказательствами, антитромботических схем во время подобных вмешательств, наряду с фактом существования проблемы тромбоэмболических осложнений у пациентов с унивентрикулярной гемодинамикой, предопределили актуальность настоящего исследования.

Цель работы – изучить изменения пространственно-временных показателей генерации тромбина и роста фибринового сгустка во время и после

операций с ИК у детей с одножелудочковым кровообращением.

Материалы и методы

В пилотное проспективное исследование включено 9 детей, перенесших выполнение операций обхода правого сердца в условиях искусственного кровообращения. Характеристика пациентов и условий выполнения операций представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Исходная характеристика пациентов и условия выполнения операций

Параметр		M±σ/n(%)
Возраст, мес.		30,4±20,7
Вес, кг		11,2±3,6
Диагноз	единственный желудочек сердца	3 (33%)
	атрезия трехстворчатого клапана	2 (22%)
	отхождение аорты и легочной артерии от правого желудочка	1 (11%)
	отхождение аорты и легочной артерии от правого желудочка, общий атриовентрикулярный канал	1 (11%)
	тетрада Фалло, общий атриовентрикулярный канал	1 (11%)
	корригированная транспозиция магистральных артерий	1 (11%)
Ранее перенесенные вмешательства	системно-легочный анастомоз	7 (77,8%)
	двунаправленный кавопульмональный анастомоз	4 (44,4%)
	суживание легочной артерии, перевязка открытого артериального протока	2 (22%)
	процедура Рашкинда	2 (22%)
	транслюминальная баллонная вальвулопластика клапана легочной артерии	1 (11%)
Гемоглобин, г/л		141,8±40,9
Тромбоциты, x10 ⁹ /л		180,0±80,0
SatO ₂ , %		76,6±2,0
Операция	двунаправленный кавопульмональный анастомоз	5 (55,6%)
	операция Фонтена, экстракардиальный кондуит (фенестрация)	4 (44,4%)/1
ИК, мин.		77,9±40,0
Гипотермия, °C		32,3±2,2

В одном наблюдении для коррекции сопутствующего тотального аномального дренажа легочных вен потребовалось пережатие аорты на 40 минут под защитой кардиopleгии (Custodiol™). В качестве экстракардиального кондуита при операции Фонтена использовался синтетический бесклапанный сосудистый протез из политетрафторэтилена.

До подключения аппарата искусственного кровообращения выполнялось введение гепарина в дозе 300 Ед/кг. Контроль адекватности дозы и активности гепарина во время ИК осуществлялась при помощи оценки активированного времени свертывания, которое во время ИК составляло не менее 400 сек. Для последующей инактивации гепарина использовался протамина сульфат в дозе 1 мг на каждые 100 Ед гепарина.

Исследование пространственно-временной динамики образования тромбина и роста фибринового сгустка проводили в специальной системе видеомикроскопии (Nemascore, Россия). Образец плазмы помещался в экспериментальную камеру. Свертывание инициировали тканевым фактором, нанесенным на вкладыш-активатор. Исследование проводилось при +37°C. Камера освещалась красным (625 нм) или ультрафиолетовым (365 нм) излучением. Рост сгустка обнаруживался по рассеянию красного света, образование тромбина – по флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина (АМС), образующегося после расщепления Z-Gly-Gly-Arg-АМС тромбином. Изображение регистрировали каждую минуту [1]. На основе полученных изображений рассчитывались численные параметры пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка: время задержки роста (T_{lag}), начальная (V_i) и стационарная скорости роста сгустка (V_{st}), размер сгустка через 30 минут (CS), оптическая плотность сгустка (D), а также генерации тромбина: стационарная амплитуда пика тромбина (A_{st}), скорость распространения пика тромбина (V_t), активаторный тромбиновый потенциал (ETP), пик тромбина (C_{max}), лаг период (Lag), время о достижения пика тромбина (T_{max}).

Отбор проб крови пациентов проводили на шести этапах: после интубации пациента и постановки центрального венозного катетера (1 этап), через 5 минут после введения расчетной дозы гепарина (2 этап), через 5 минут после начала ИК (3 этап), перед окончанием ИК (4 этап), после введения протамина сульфата (5 этап), через 1 час после окончания ИК (6 этап).

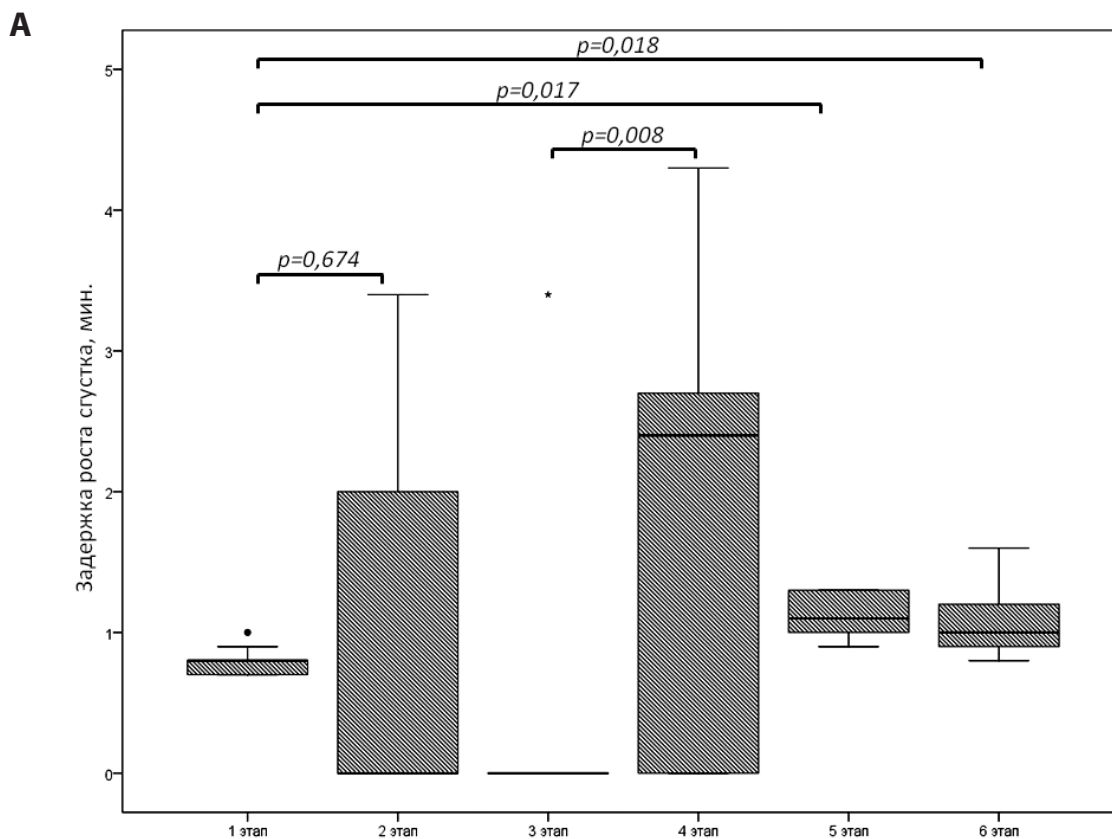
Для статистического анализа результатов использовался пакет статистических программ SPSS 22.0. Для описания распределения количественных переменных использовались среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение, качественных – абсолютное количество и доли. Сравнение результатов между различными этапами исследования производили при помощи критерия Уилкоксона.

Результаты

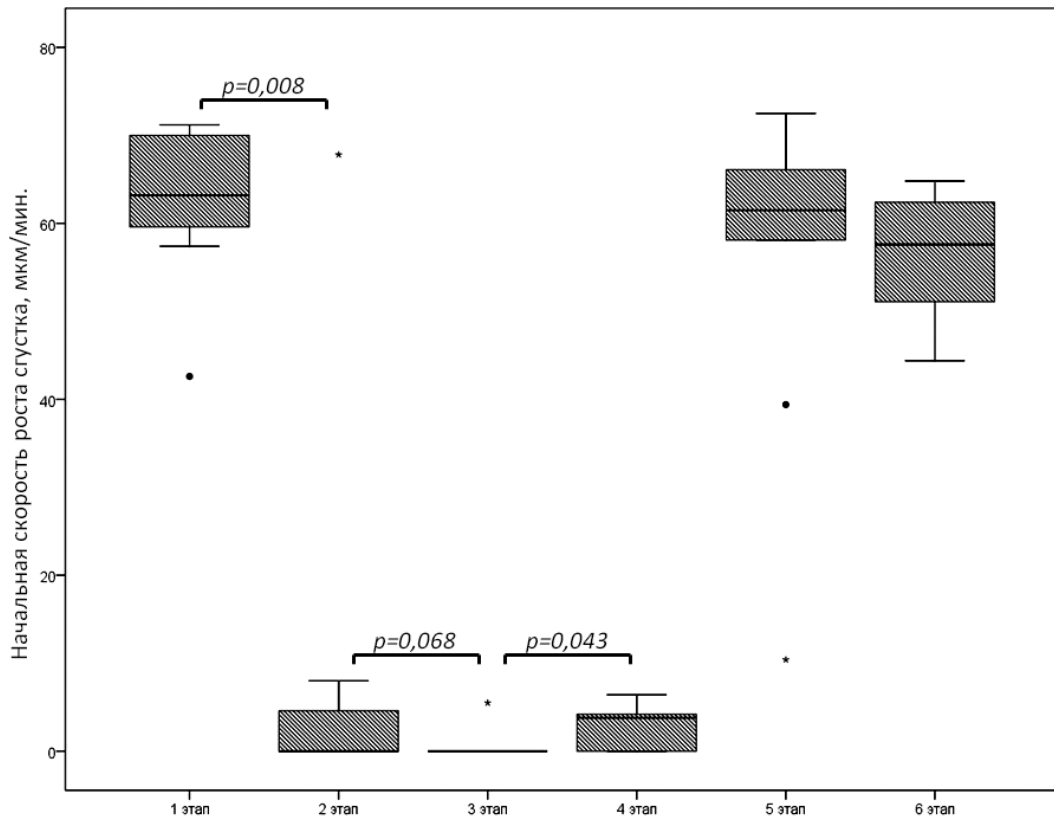
Вопреки ожиданиям на 2 и 4 этапах исследования происходило образование фибринового сгустка (рис. 1). Этот процесс протекал достаточно

вяло: задержка роста сгустка возрастала в 2-3 раза, резко были угнетены начальная и стационарная скорости роста сгустка и сам сгусток был достаточно прозрачным. Этим процессам соответствовало весьма интенсивное тромбинообразование. Например, при сравнении между 1 и 2 этапами Ast и Tmax не отличалась, остальные показатели пространственно-временной динамики генерации тромбина были резко снижены, но многие из них отличались от нуля (рис. 2).

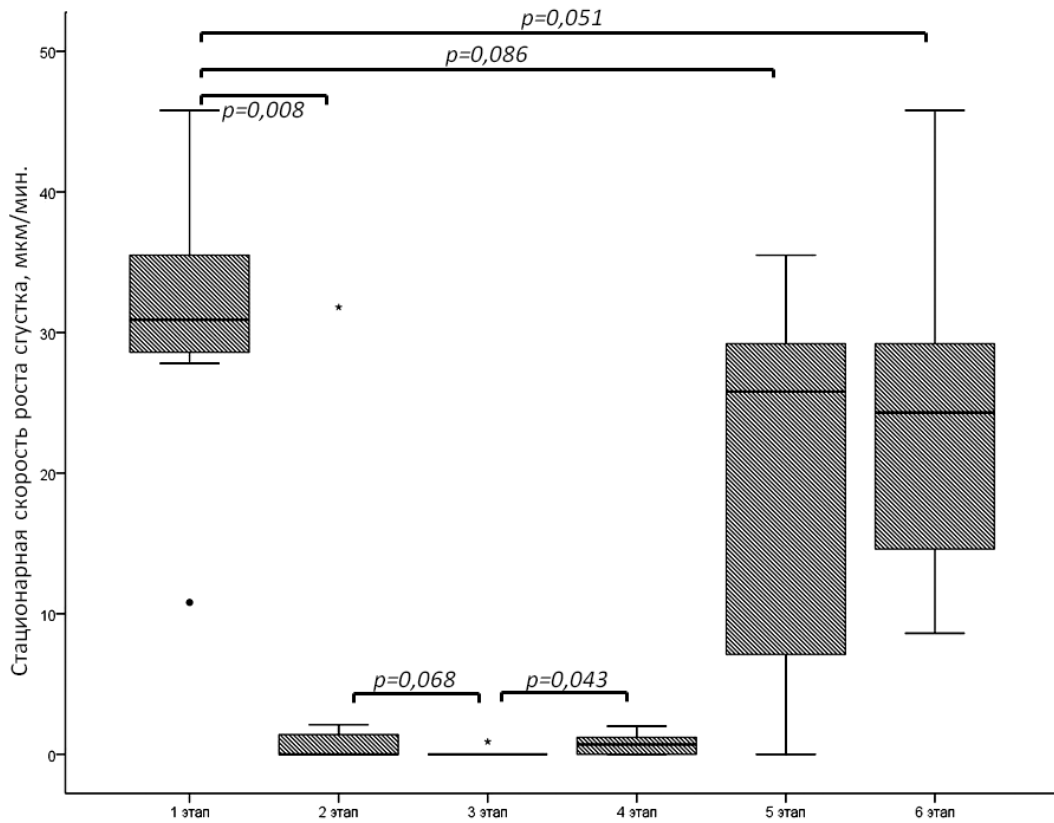
После введения протамина и завершения искусственного кровообращения коагуляционные показатели постепенно восстанавливались, но значительно отличались от величин на этапе 1 задержка роста сгустка (рис. 1А), стационарная скорость роста сгустка (рис. 1В), оптическая плотность сгустка (рис. 1Д), стационарная амплитуда пика тромбина (рис. 2А), скорость распространения тромбина (рис. 2Б), активаторный тромбиновый потенциал (рис. 2В) и пик тромбина (рис. 2Г).



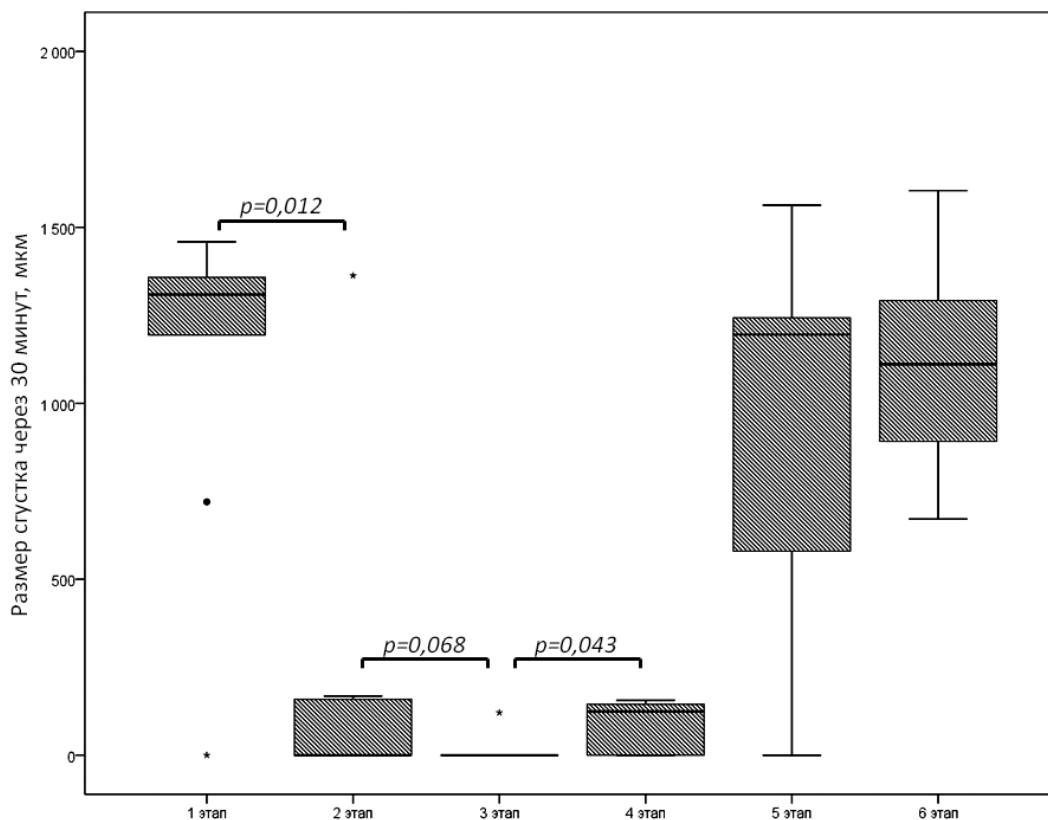
Б



В



Г



Д

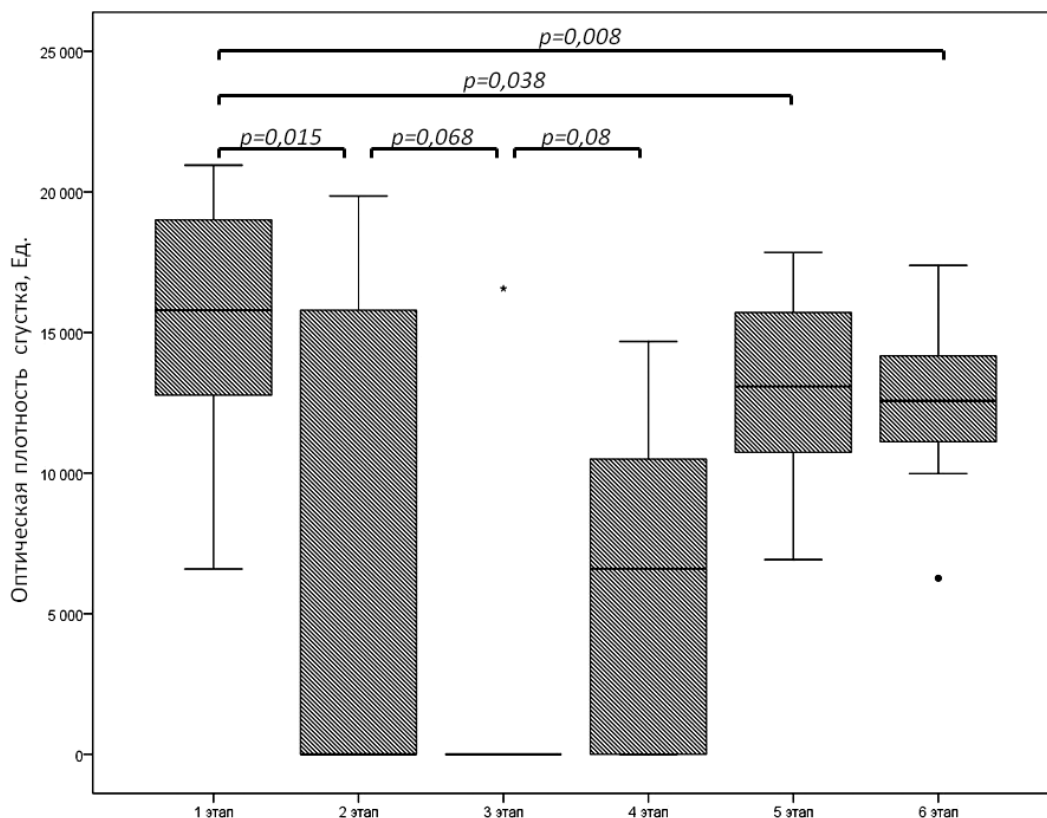
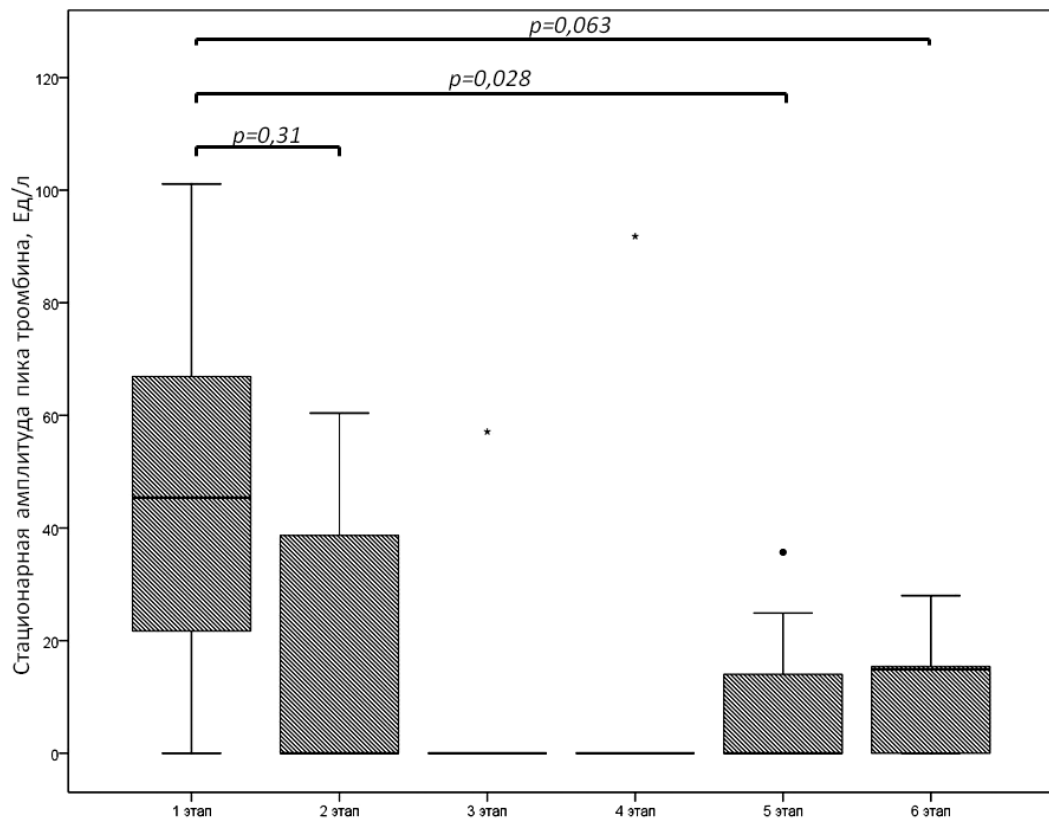
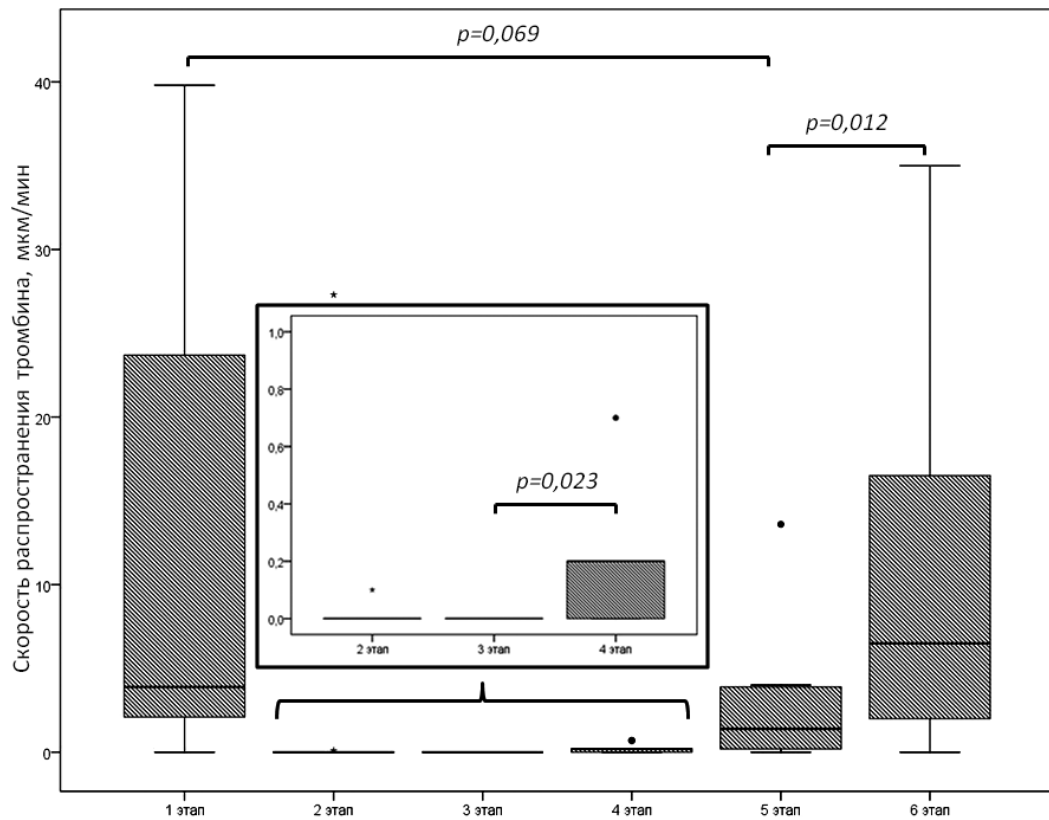


Рисунок 1. Изменение показателей пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка на разных этапах исследования: время задержки роста сгустка (А), инициальная скорость роста сгустка (Б), стационарная скорость роста сгустка (В), размер сгустка через 30 минут (Г), оптическая плотность сгустка (Д)

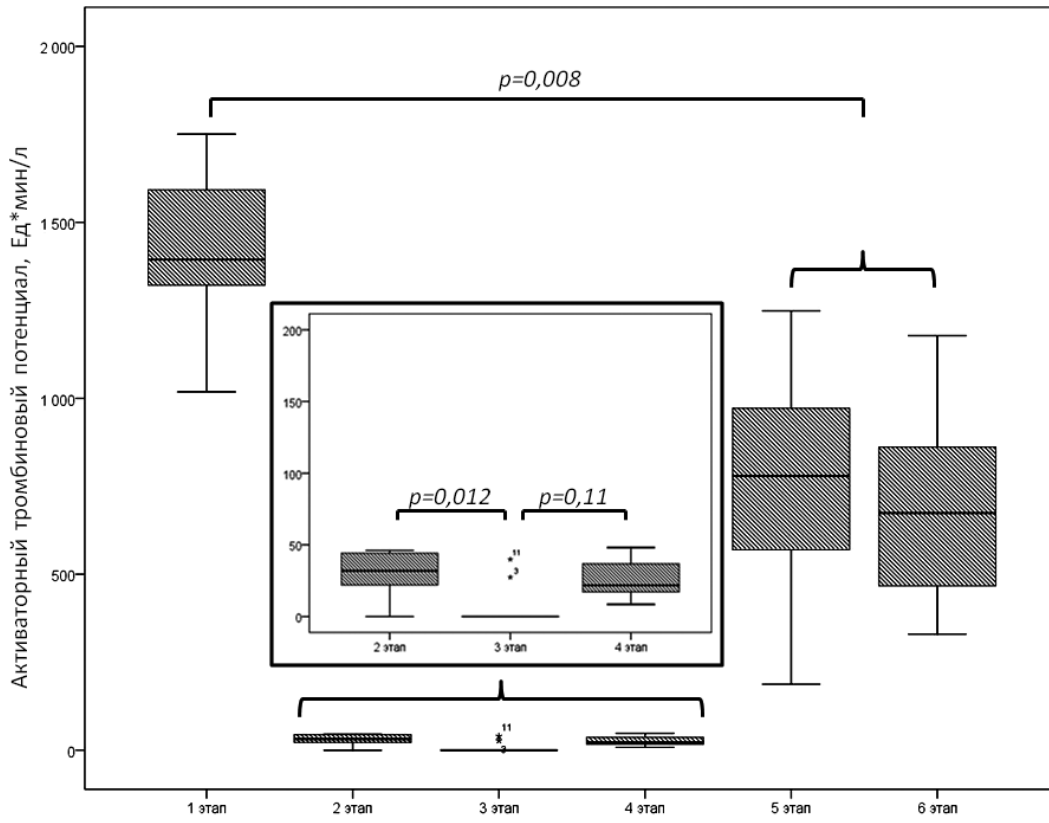
А



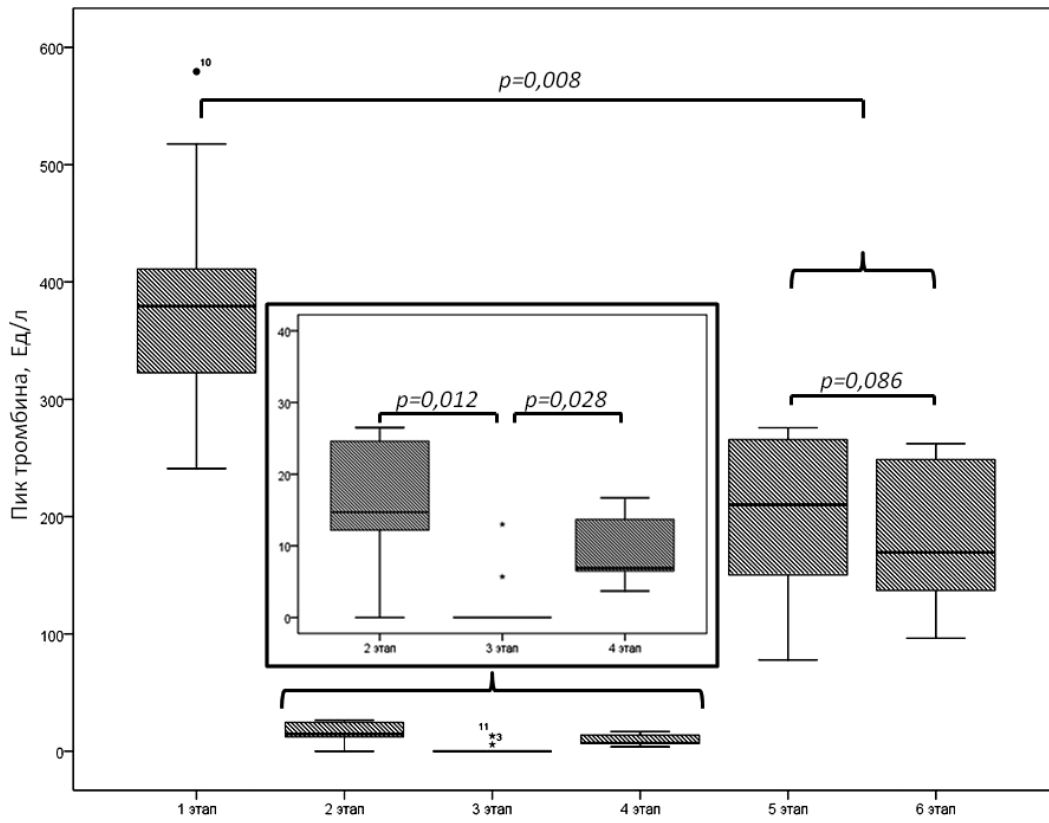
Б



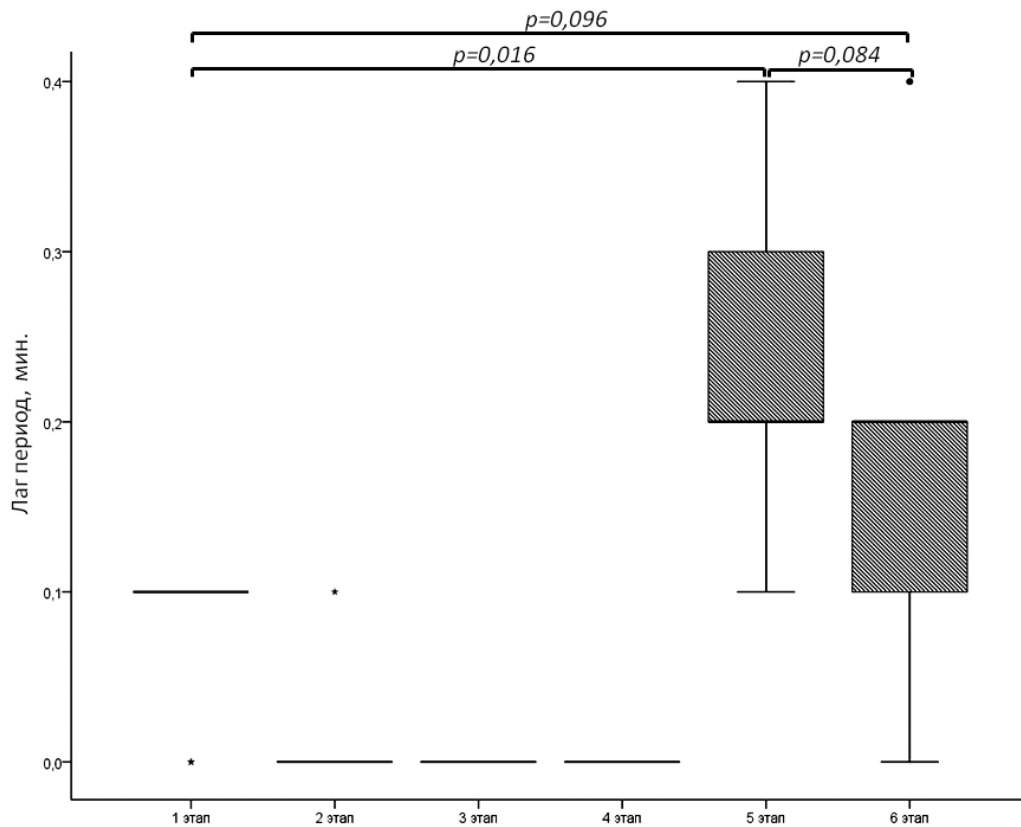
В



Г



Д



Е

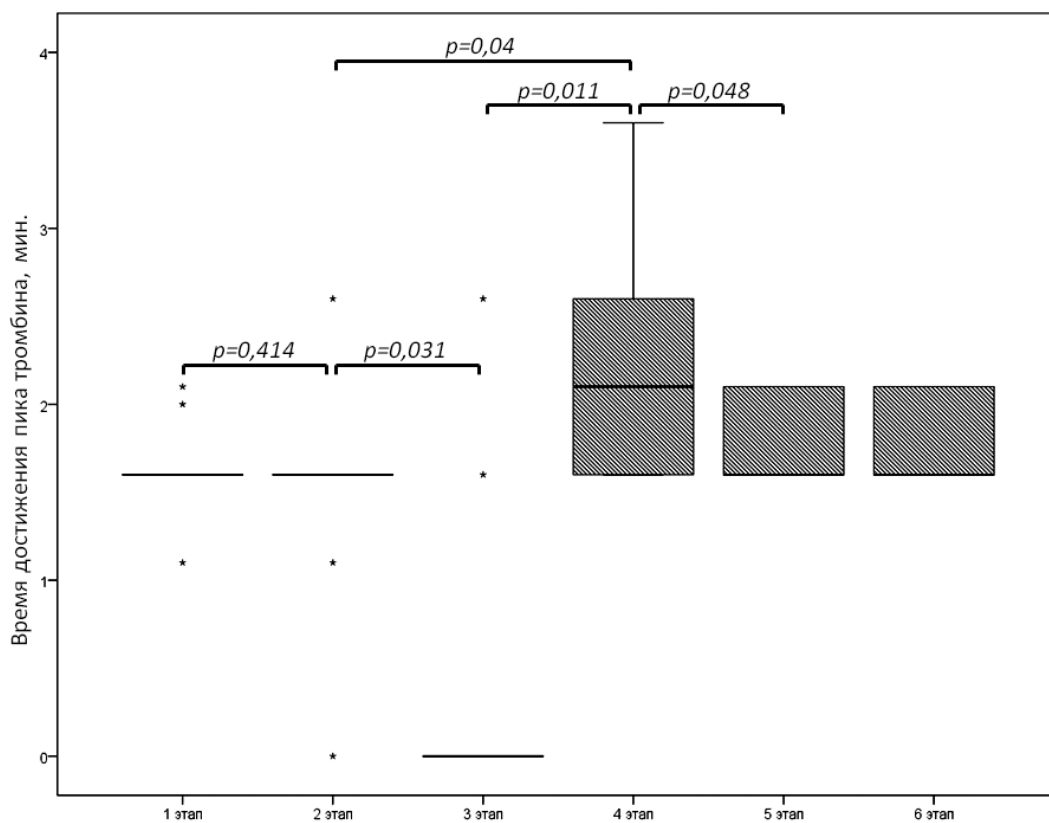


Рисунок 2. Изменение показателей пространственно-временной динамики генерации тромбина на разных этапах исследования: стационарная амплитуда пика тромбина (А), скорость распространения пика тромбина (Б), активаторный тромбиновый потенциал (В), пик тромбина (Г), лаг период (Д), время до достижения пика тромбина (Е)

Обсуждение

Опыт применения теста генерации тромбина для оценки изменений гемостаза невелик. Ранее были показаны нулевые значения эндогенного потенциала тромбина в течение всего времени искусственного кровообращения [2], существенное угнетение генерации тромбина после ИК [3] и меньшие показатели генерации тромбина у больных с большей кровопотерей [4].

Результаты проведенного нами исследования указывают, во-первых, на недостаточную антикоагуляцию во время искусственного кровообращения, что сопровождается потреблением факторов свертывания и угрожает развитием интраоперационных тромбозов и тромбоэмболий. Во-вторых, на растянутое во времени и неполное восстановление гемостаза после инактивации антикоагулянтов на примере непродолжительных перфузий.

Многообразие повреждающих воздействий экстракорпоральной перфузии и сложность организации системы гемостаза определяют возможность успеха в предупреждении и лечении постперфузионных тромбозов и кровотечений лишь при понимании конкретных механизмов нарушения тромбообразования. Эти процессы не всегда линейны, степень клинического значения их может быть различной, но исходя из закона потенциализации, незначительный функциональный недостаток нескольких звеньев гемостаза в состоянии оказывать большее воздействие на общую свертываемость, чем нарушение, даже глубокое, одного важного процесса.

Тактика предупреждения нарушений гемостаза различна на разных этапах операции. Во время ИК она должна быть направлена на максимальное угнетение свертывания за счет влияния на начальные этапы его активации. В постперфузионном периоде – наиболее быстрое и полное восстановление коагуляционного потенциала за счет «протезирования», «шунтирования» этапов свертывания, инактивации антикоагуляции и фибринолиза.

Образование тромбина является основным звеном в развитии нарушений гемостаза во время ИК. Оно инициируется взаимодействием крови с чужеродными поверхностями через активацию внутреннего пути. Также является следствием повреждения эндотелия, которое вызывает активацию ТФ-зависимого пути. Очевидно, что большая часть образовавшегося и свободно циркулирующего в крови тромбина инактивируется антикоагулянтами [5]. Однако его инициальные количества, взаимодействующие с фосфолипидными поверхностями клеток крови, эндотелиоцитов, микровизулами, образующимися в результате цитолиза, могут служить триггерами (через фактор XI – для внутреннего пути и дополнительную активацию эндотелия – для внешнего) продукции новых количеств тромбина. Иными словами, в течение всего времени ИК происходит постоянное образование тромбина, не зависящее от инициирующих его образование факторов. Этот факт, не показанный ранее [2], наглядно продемонстрирован результатами нашего исследования.

Итогами генерации тромбина являются потребление факторов свер-

тивания, активация тромбоцитов, антикоагулянтов (протеина С) и фибринолиза. Следовательно, ограничить эти процессы можно путем максимально полной, но быстро обратимой блокады продукции тромбина. Однако используемые в настоящее время ингибиторы тромбина (гепарин, прямые ингибиторы тромбина) этой цели не достигают. Необходим поиск альтернативной антикоагуляции во время ИК, которая будет основана на ингибировании проксимальных реакций свертывания, а не собственно тромбина. И в этой связи особое внимание может быть уделено ингибитору пути тканевого фактора и его агонистам.

Особое беспокойство вызывает возобновление роста фибринового сгустка в конце ИК, что является очевидной угрозой тромбоэмболических осложнений.

Таким образом, персистирующее во время ИК образование тромбина – один из важнейших механизмов постперфузионного истощения ферментативного и тромбоцитарного гемостаза и активации антикоагулянтных систем, требующее пересмотра традиционной тромбопрофилактики во время ИК.

Список литературы

1. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave / N.M. Dashkevich, M.V. Ovanesov, A.N. Balandina, [at al.] // *Biophys J.* 2012; 103 (10): 2233-40.
2. Hemostatic response in paediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery / V. Ignjatovic, J. Than, R. Summerhayes [at al.] // *Pediatr Cardiol.* 2011; 32(5): 621-7.
3. Augmentation of thrombin generation in neonates undergoing cardiopulmonary bypass / N.A. Guzzetta, F. Szlam, A.S. Kiser [at al.] // *Br J Anaesth.* 2014; 112(2): 319-27.
4. Assessment of thrombin generation measured before and after cardiopulmonary bypass surgery and its association with postoperative bleeding / M. Coakley, J.E. Hall, C. Evans [at al.] // *J Thromb Haemost.* 2011; 9(2): 282-92.
5. Edmunds L.H., Jr, Colman R.W. Thrombin during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2006; 82: 2315–22.

РОЛЬ ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ТРАНСФУЗИОННОЙ ТАКТИКИ ПРИ КАТЕТЕРИЗАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ВЕНЫ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ С ТЯЖЕЛОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ

Лянгузов А.В., Калинина С.Л., Сергунина О.Ю., Игнатъев С.В., Шерстнев Ф.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

THE ROLE OF THROMBOELASTOGRAPHY IN BLOOD PRODUCT USAGE FOR CENTRAL VEIN CATHETERIZATION IN HEMATOLOGIC PATIENTS WITH SEVERE THROMBOCYTOPENIA

*Lyanguzov A. V., Kalinina S. L., Sergunina O. Y.,
Ignatyev S. V., Sherstnyov F. S.*

*Federal State Budgetary Science Institution «Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», KirovRussia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: dedalex@bk.ru, svetulenchika@mail.ru, sergu05@bk.ru,
feb74@yandex.ru, sherstnyov_phil@mail.ru*

Проведена оценка частоты развития и степени тяжести геморрагических осложнений катетеризации центральной вены у 36 больных гемобластозами с тяжелой тромбоцитопенией при использовании трансфузионной тактики, основанной на тромбоэластографии (ТЭГ). Показано, что применение ТЭГ снижает потребность в профилактических трансфузиях концентрата тромбоцитов. Частота развития и степень тяжести геморрагических осложнений катетеризации центральной вены при тяжелой тромбоцитопении не увеличивается, если показатели ТЭГ компенсированы.

Ключевые слова: гемобластоз, тяжелая тромбоцитопения, катетеризация центральной вены, тромбоэластография

An evaluation of hemorrhagic complications of central vein catheterization in 36 patients with hemoblastosises accompanying severe thrombocytopenia was performed using the thromboelastography (TEG) for transfusion therapy tactics. It was shown that use of TEG reduces the need for prophylactic platelet transfusion. Severity and frequency of hemorrhagic complications of central vein catheterization in severe thrombocytopenia don't increase with compensated TEG.

Keywords: hemoblastosis, severe thrombocytopenia, central vein catheterization, thromboelastography

Выживаемость больных гемобластозами значительно улучшилась в последние десятилетия вследствие совершенствования программ химиотерапии и сопроводительного лечения. [1]. После установления диагноза пациенту показано проведение цитостатической, инфузионно-трансфузионной терапии, назначение антибиотиков, противогрибковых, противовирусных препаратов. Для успешного выполнения этих видов лечения требуется адекватный венозный доступ. Учитывая свойство многих из перечисленных препаратов повреждать сосудистую стенку, вызывая флебит, предпочти-

тельным является использование центрального венозного доступа [2].

Течение гемобластозов часто сопровождается развитием тромбоцитопении, которая обусловлена костномозговой недостаточностью на фоне опухолевого процесса, а также является частым осложнением цитостатической терапии [3]. Основная задача тромбоцитов – обеспечение сосудисто-тромбоцитарного гемостаза за счет образования тромбоцитарной пробки и ретракции тромба. Кровяные пластинки составляют морфологическую основу структуры тромба вместе с нитями фибрина [4]. На поверхности тромбоцитов фиксируются теназные и протромбиназные комплексы, приводя к генерации достаточного для свертывания крови количества тромбина. Выраженная тромбоцитопения является препятствием к проведению инвазивных манипуляций, в частности катетеризации центральной вены, ввиду высокой опасности геморрагических осложнений. Применение концентрата тромбоцитов (КТ) – неотъемлемая часть лечения данной категории больных. В последние годы отмечается увеличение использования КТ как в нашей стране, так и в мире [5,6]. Переливание КТ не всегда безопасно и может осложняться развитием трансфузионных реакций, передачей гемотрансмиссивных инфекций, трансфузионным поражением легких, аллоиммунизацией. Вопрос об уровне тромбоцитов, при котором выполнение инвазивных манипуляций не приведет к развитию осложнений, в настоящее время остается открытым. Международные рекомендации указывают на то, что безопасный для проведения катетеризации центральной вены уровень тромбоцитов составляет $20 \times 10^9/\text{л}$ и более [7]. При этом у больных гемобластозами существуют и другие причины повышенной кровоточивости: тромбоцитопатия, коагулопатия на фоне дисфункции печени, избыточный фибринолиз, ДВС-синдром, приобретенный дефицит VIII, X, XIII факторов свертывания и др. [8]. При выборе трансфузионной тактики на помощь клиницисту все чаще приходит тромбоэластография (ТЭГ) – интегральный метод оценки состояния системы гемостаза, оценивающий вязко-эластические свойства тромба. Это исследование превосходит стандартные лабораторные тесты (АПТВ, ПВ, МНО, уровень фибриногена, количество тромбоцитов), так как позволяет оценить формирование сгустка во времени, его качество, функцию тромбоцитов вплоть до окончательной ретракции или лизиса и является наиболее точным методом, прогнозирующим возможность кровотечения [9]. Применение ТЭГ в кардиохирургии и травматологии показало свою эффективность для определения трансфузионной тактики, что приводило к снижению потребности в компонентах крови [10].

Цель исследования. Оценить эффективность применения ТЭГ-контролируемой трансфузионной тактики при катетеризации центральной вены у больных гемобластозами с тяжелой тромбоцитопенией.

В исследование включены 36 больных гемобластозами с тромбоцитопенией $30 \times 10^9/\text{л}$ и ниже. Среди них – 17 мужчин (47%) и 19 женщин (53%). Медиана возраста пациентов составила 47 лет. Больных острым миелобласт-

ным лейкозом было 18 (50%), острым лимфобластным лейкозом – 11 (31%), множественной миеломой – 4 (11%), диффузной крупноклеточной лимфомой – 3 (8%). ТЭГ-исследование цельной крови перед проведением катетеризации центральной вены выполнено на аппарате TEG 5000® Analyzer (Haemoscope, USA) без применения стимуляторов свертывания. Определяли следующие показатели: интервал r, интервал k, угол α , максимальная амплитуда (МА) и коагуляционный индекс (СІ). Для определения параметров свертывающей системы крови оценивали международное нормализованное отношение (МНО), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и концентрацию фибриногена по Клауссу. По результатам ТЭГ все пациенты разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия признаков гипокоагуляции. Больным с ее наличием проводилась заместительная терапия КТ в терапевтической дозе. Тромбоциты не переливали при удовлетворительных показателях тромбоэластограммы. В качестве доступа использовали катетеризацию правой подключичной вены у 29 пациентов (81%), правой внутренней яремной – у 7 (19%). Степень выраженности геморрагических осложнений катетеризации центральной вены оценивали у всех больных по шкале Национального института рака (США): класс 0 – кровотечения нет; класс 1 – незначительное просачивание крови из места установки катетера, не требующее лечения; класс 2 – умеренное кровотечение (например, гематома) в месте установки катетера, купирующееся наружным прижатием; класс 3 – тяжелое кровотечение, требующее трансфузионной терапии; класс 4 – кровотечение, угрожающее жизни.

Статистическую обработку данных проводили с помощью статистической программы Statistica 6.0. Результаты исследования представлены в виде медианы и интерквартильного интервала. Для изучения качественных различий применяли критерий χ^2 . Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Проведенные исследования показали, что в исследуемой группе пациентов не было выявлено значимых изменений коагулограммы. Так, показатель АЧТВ составил 32,5 сек. (24,8-42,7), МНО – 1,26 (1,15-1,49), уровень фибриногена – 3,47 г/л (2,73-4,4). Тромбоцитопения сопровождалась снижением показателей ТЭГ у 22 (61%) обследованных: МА составила 31,7 мм (25,5-37,3), СІ ÷ - 2,8 (-3,3; -1,6). Отмечалось укорочение интервала r до 8,6 мин (6,1-10,4), что свидетельствует о компенсаторной роли коагуляционного звена гемостаза при тромбоцитопении.

Пациентам с явлениями гипокоагуляции, по данным тромбоэластограммы, перед катетеризацией проведена трансфузия КТ в дозе не менее $3 \cdot 10^{11}$ /л, после которой показатели ТЭГ нормализовались. У остальных 14 больных (39%) изменения вязко-эластических свойств сгустка были незначительны, заместительной терапии КТ не проводилось. Катетеризация центральной вены не сопровождалась выраженной кровоточивостью в обеих группах. Так, в первой группе (после переливания КТ) показатели оценки

по шкале кровотечений составили: класс 0 – 12 пациентов, класс 1 – 10. Во второй группе (без использования КТ): к классу 0 отнесены 5 человек, класс 1 определен у 7, класс 2 – у 1 пациента. Частота развития и степень выраженности геморрагических осложнений статистически не различались в обеих группах ($\chi^2=0,45$; $p=0,43$). Отмечено, что при снижении МА до 32 мм и показателях коагуляционного индекса (CI), превышающих -3, частота развития геморрагических осложнений не увеличивалась.

Использованная ТЭГ-контролируемая трансфузионная тактика у больных с тяжелой тромбоцитопенией позволила воздержаться от переливания КТ у 14 пациентов (39%), из которых у 7 уровень тромбоцитов не превышал $20 \times 10^9/\text{л}$.

Выводы. Применение ТЭГ-контролируемой трансфузионной тактики у больных гемобластозами с тромбоцитопенией позволило снизить потребность в профилактических трансфузиях КТ. Частота развития геморрагических осложнений катетеризации центральной вены у пациентов с тромбоцитопенией менее $30 \times 10^9/\text{л}$ не увеличивается при отсутствии признаков гипокоагуляции по данным ТЭГ.

Список литературы

1. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971–2006: a population-based study [Текст] / A. Shah, T.M. Andersson, B. Racht [et al.] // Br.J. Haematol. – 2013. – Vol. 162 – P. 509–516.
2. Vascular access devices in leukemia: a retrospective review amongst patients treated at the Ottawa Hospital with induction chemotherapy for acute leukemia [Текст] / E.R. Skaff, S. Doucette, S. McDiarmid [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2012. – Vol. 53(6) – P. 1090-1095.
3. Gaidos, L.A. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia [Текст] / L.A. Gaidos, E.J. Freirich, N. Mantel // N. Engl. J. Med. – 1962. – Vol. 266 – P. 905 –909.
4. Буланов, А.Ю. Тромбоэластография в современной клинической практике. Атлас ТЭГ [Текст] / А.Ю. Буланов. – Москва: НБЮДИАМЕД, 2015. – 116 с.
5. Основные итоги деятельности службы крови Российской Федерации в 2015 году. [Текст] / А.В. Чечеткин, В.В. Данильченко, М.Ш. Григорьян [и др.] // Трансфузиология. – 2016. – № 3. (Т. 17) – С. 4-12.
6. Trends in United States blood collection and transfusion: results from the 2013 AABB Blood Collection, Utilization, and Patient Blood Management Survey [Текст] / B. Whitaker, S. Rajbhandary, S.Kleinman [et al.] // Transfusion. – 2016. – Vol. 56(9) – P. 2173-2183.
7. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB [Текст] / R.M. Kaufman, B.Djulgovic, T.Gernsheimer [et al.] // Ann. Intern. Med. – 2015. – Vol. 162(3) – P. 205-213.
8. Bleeding complications in patients with hematologic malignancies/ M.Franchini, F.Frattini, S.Crestani [et al.] // Semin. Thromb. Hemost. – 2013. – Vol. 39(1) – P. 94-100.
9. Afshari, A. Evidence based evaluation of immuno-coagulatory interventions in critical care [Текст] / A. Afshari // Dan. Med. Bull. – 2011. – Vol. 58(9) – P. B4316.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА

Чернова Е.В., Колосков А.В., Филиппова О.И., Васильева М.Ю.
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова» Минздрава России, кафедра трансфузиологии,
Россия, Санкт-Петербург
(191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, т. (812) 415-19-17)

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY OF VON WILLEBRAND DISEASE

Chernova E. V., Koloskov A. V., Philippova O. I., Vasileva M. Y.
State budget institution of higher education «North-Western State Medical University named
after I. I. Mechnikov» under the Ministry of Public Health
of the Russian Federation, Russia, Saint-Petersburg
(191015 Saint-Petersburg, Kirochnaya ul. 41)
E-mail: katernachernova@mail.ru, avkoloskov@inbox.ru,
milidoctor@mail.ru, miss.m-vasilieva@yandex.ru

Синтез белка фактора Виллебранда-сложный и многоступенчатый процесс. Ген фактора Виллебранда находится на коротком плече 12 хромосомы. Болезнь Виллебранда имеет клинические особенности, обусловленные генетическими мутациями в гене фактора Виллебранда. Заболевание характеризуется широким клиническим полиморфизмом, поскольку локализация точечных мутаций в гене фактора Виллебранда разнообразна. Доказана корреляционная связь между расположением мутации в гене фактора Виллебранда и подтипом болезни Виллебранда.

Ключевые слова: ген фактора Виллебранда, болезнь Виллебранда

Von Willebrand factor production is a complex and multi-step process, its gene is located at chromosome 12p. Von Willebrand disease have a clinical features deterministic genetic mutation Von Willebrand factor gene. Disease characterized broadly clinical polymorphism, because genetic defects are multifarious. Proved correlation relationship between site mutations in Von Willebrand factor gene and type Von Willebrand disease.

Keywords: Willebrand factor gene, von Willebrand disease

Болезнь Виллебранда является наиболее распространенной коагулопатией, вызываемой количественным и качественным дефицитом фактора Виллебранда. Клинически значимые формы болезнью Виллебранда отмечаются у 1% - 3% населения. С учетом случаев с очень мягкими проявлениями кровоточивости частота встречаемости феномена Виллебранда может составлять до 10 % в общей популяции. У большинства больных в обычных условиях симптомы отсутствуют. Количество пациентов с болезнью Виллебранда, которые нуждаются в постоянном лечении, сопоставимо с таковым при гемофилии. Приблизительно у 70% пациентов с болезнью Виллебранда заболевание протекает в легкой форме, у остальных 30% пациентов наблюдается среднетяжелая или тяжелая форма болезни.

Болезнь Виллебранда имеет клинические особенности: высокая распространенность заболевания, значительное количество легких и малосимптомных форм, волнообразная вариабельность клинических проявлений

и лабораторных показателей. Это обусловлено индивидуальными особенностями локализации точечных мутаций в гене фактора Виллебранда, являющегося одним из самых крупных генов человека. Значительная изменчивость структуры гена фактора Виллебранда лежит в основе синтеза достаточно уникального по своим функциональным характеристикам белка фактора Виллебранда, что, в свою очередь, обуславливает клинический полиморфизм [1].

Фактор Виллебранда синтезируется в эндотелиальных клетках, мегакариоцитах и депонируется в тельцах Вейбеля-Палада (WPBs) и α -гранулах тромбоцитов. Фактор Виллебранда, синтезированный в виде прополипептида в эндоплазматическом ретикулуме, состоит из нескольких структурных доменов (D1, D2, D, D3, A1, A2, A3, B, C1, C2) и соответствующих связующих участков. После отщепления сигнального пептида (СП), субединицы фактора Виллебранда димеризуются в эндоплазматическом ретикулуме. Когда димеры фактора Виллебранда поступают в аппарат Гольджи, кислый рН и высокий уровень Ca^{2+} стимулируют образование мультимеров фактора Виллебранда посредством дисульфидных связей между D3 доменами. Пропептид расщепляется, но остается нековалентно связанным с мультимером фактора Виллебранда, способствующим образованию дисульфидных связей. Растущий мультимер ФВ выстраивается в правостороннюю спираль, сворачиваясь в трубчатую конформацию для хранения в WPBs. Когда WPBs объединяются с эндотелиальной мембраной, рН в WPBs поднимается до 7,4 и мультимеры фактора Виллебранда теряют трубчатую конформацию, распускаются в длинные нити фактора Виллебранда. Под воздействием протеазы ADAMTS 13, расщепляющей связь Y 1605-M1606 в домене A2, мультимеры быстро распадаются на более мелкие полимеры (содержащие около 40 мономеров) с молекулярной массой менее 10000 кДа, таким образом создавая полный спектр видов циркулирующего фактора Виллебранда, начиная от единичного димера до мультимеров состоящих из 20 димеров в каждом мультимере фактора Виллебранда [2,3].

ФВ имеет важное значение для тромбоцитарно-субэндотелиальной адгезии, поддерживается путем взаимодействия участка A1 домена фактора Виллебранда с рецептором тромбоцита GpIb. Взаимодействие между GpIb и фактором Виллебранда может быть продемонстрировано путем добавления антибиотика ристоцетина, который способствует связыванию фактора Виллебранда с GpIb в свежей или формалин-фиксированной суспензии тромбоцитов.

Агрегации тромбоцитов способствует взаимодействие со следующим рецептором на тромбоцитах, GPIIb-IIIa (или интегрин α IIb β 3) который после активации фактора Виллебранда и фибриногена, привлекает больше тромбоцитов в стабильную связь.

Фактор Виллебранда является носителем фактора VIII (ФVIII) в плазме. Фактор Виллебранда защищает ФVIII от протеолитической деградации,

продлевая его период полураспада в циркулирующей крови и эффективно направляя его в место повреждения сосуда. Каждый мономер фактора Виллебранда имеет один домен связывания, расположенный в первых 272 аминокислотах зрелой субъединицы (D домена), которая способна связывать одну молекулу ФVIII [4].

Ген фактора Виллебранда человека находится на коротком плече 12 хромосомы. Он включает в себя 52 экзона, охватывающих 178 kb и дающих начало 9 kb мРНК. Анализ гена фактора Виллебранда осложняется наличием необрабатываемого псевдогена, расположенного на длинном плече 22 хромосомы. Псевдоген соответствует экзонам 23-34 гена фактора Виллебранда и имеет 97% гомологии в последовательностях. Мутации, вызывающие болезнь Виллебранда были выявлены в гене фактора Виллебранда. В отличие от гемофилии, при которой единственная крупная перестройка гена вызывает обычно тяжелое заболевание, при болезни Виллебранда подобных повторяющихся мутаций нет. Существует хорошая корреляционная связь между расположением мутации в гене фактора Виллебранда и подтипом болезни Виллебранда [5,6].

Первые мутации, наблюдаемые у пациентов с болезнью Виллебранда, были обнаружены в экзоне 28 гена фактора Виллебранда, который кодирует A1 и A2 домены зрелого фактора Виллебранда, отвечающего за взаимодействие с рецептором GrIb. В большинстве случаев тип 2A болезни Виллебранда обусловлен миссенс-мутацией в домене A2. В частности, R1697W или Q или Y и S1506L представлены в 60% случаев. В экспериментах представлены два возможных механизма [7]. Первая группа мутаций связана с нарушением секреции мультимеров высокой и средней молекулярной массы (HMW) вследствие вторичной неполноценной внутриклеточной транспортировки. Мутации второй группы показывают нормальный синтез и секрецию ФВ. Подавляющее большинство случаев типа 2B болезни Виллебранда обусловлено миссенс-мутациями в A1 домене. Около 90% случаев обусловлено R1306W, R1308C, V1316M и R1341Q мутациями [8]. Мутация P1266L, ответственная за тип 2B Нью-Йорк/Мальмё фенотип. Эти пациенты показывают повышение ристоцетин индуцированной агрегации тромбоцитов (RIPA). У большинства пациентов с P1266L мутацией имеются дополнительные нуклеотидные замены, все совпадают с последовательностью псевдогенов фактора Виллебранда. Это открытие можно отнести к механизму генного преобразования между генами фактора Виллебранда и псевдогенами. Обычно тип 2A и 2B болезни Виллебранда – аутосомно-доминантное заболевание с высокой пенетрантностью и экспрессией. Несколько гетерогенных мутаций (C1315G, G1324S/A, R1374C/H и тд.) ответственны за тип 2M. Миссенс-мутации в домене, связанном с ФVIII, располагается в N терминале фактора Виллебранда и отвечает за тип 2N. R854Q – очень часто наблюдаемая мутация, найдена у 2% популяции Голландии. Эта мутация может вызывать симптомы только у гомозигот или сложного гетерозигот-

ного состояния. Мутация типа 2 N предполагалась в присутствии заметного снижения ФVIII в сравнении с фактором Виллебранда и подтверждается оценкой ФVIII- фактор Виллебранд связью [9].

Болезнь Виллебранда 1 типа – аутосомно-доминантное заболевание, в котором можно выделить несколько групп, в зависимости от экспрессии и пенетрантности гена.

Группа А включает случаи проявления высокой пенетрантности и экспрессии: сцепление с аллелем фактора Виллебранда очень высокая. В этой группе были описаны миссенс-мутации в результате доминантно-негативного механизма. В исследованиях *in vivo* показано снижение клеточной секреции, и был определен общий генетический фон (R1205H в домен D3 фактора Виллебранда).

Группа Б характеризуется промежуточными снижением фактора Виллебранда, с переменной пенетрантностью и экспрессивностью. Эту гетерогенность фактически можно объяснить в некоторых случаях наследованием двух разных аллелей БВ. Например, наследование мутации R854Q с нулевой мутацией увеличивает тяжесть кровоточивости в данной семье, а у обычных гетерозигот проявляются лишь незначительными симптомами кровотечения и более высоким уровнем фактора Виллебранда. Нулевые аллели могут быть в результате перемещения, нелепых мутаций или делеций, что определяется в 3 типе болезни Виллебранда.

Группа С включает случаи с пограничным уровнем фактора Виллебранда и слабыми симптомами. В некоторых этих семьях, установлена взаимосвязь фенотипа с представленной аллелью фактора Виллебранда. Таким образом, предполагается, что ген(ы) за пределами гена ФВ, и, возможно, других негенетических факторов способствует проявлению фенотипа кровотечения [4].

Уровень фактора Виллебранда в плазме взаимосвязан с группой крови АВ0. Лица с группой крови 0 имеют более низкий уровень фактора Виллебранда, чем лица с другими группами. Средний уровень фактора Виллебранда (антиген фактора Виллебранда) распределяется следующим образом: группа крови 0 – 74 МЕ/дЛ (разброс от 36 МЕ/дЛ до 157 МЕ/дЛ), группа крови А – 106 МЕ/дЛ (разброс от 48 МЕ/дЛ до 234 МЕ/дЛ), группа крови В – 117 МЕ/дЛ (разброс от 57 МЕ/дЛ до 241 МЕ/дЛ), группа крови АВ – 123 МЕ/дЛ (разброс от 64 МЕ/дЛ до 238 МЕ/дЛ) [10]. Кроме того, при генотипе А0, уровень фактора ниже, чем при генотипе АА. Вероятно, что скорость синтеза фактора Виллебранда не зависит от групповой принадлежности в системе АВ0, но у лиц с группой крови 0 период полураспада фактора Виллебранда короче. У лиц с группой крови 0 период полураспада равен примерно 10 часам, против 25,5 часов у лиц с другими группами крови. Не ясно имеет ли влияние группа крови АВ0 на удельную активность фактора Виллебранда [10].

Таким образом, на сегодняшний день, накоплено достаточно инфор-

мации свидетельствующей о том, что уникальная структура гена фактора Виллебранда значимо влияет на функциональные характеристики белка Виллебранда и регуляцию свертывающей системы крови в целом. Какова взаимосвязь между этими особенностями биологии фактора Виллебранда и реализацией риска геморрагических и/или тромботических событий – покажут дальнейшие исследования [11].

Список литературы

1. Лихачева, Е.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. Национальное гематологическое общество / Е.А. Лихачева, Т.Ю.Полянская, В.Ю. Зоренко; Под ред. академика В.Г.Савченко. – М.: 2014.- С 6-7.
2. Frank W.G. Leebeek, M.D., Ph.D., and Jeroen C.J. Eikenboom, M.D., Ph.D. Willebrand's Disease // The new england journal of medicine .- 2016.-V.375-P.21
3. Timothy A. Springer Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream //Blood-2014.V. 124-P.1412-1425.
4. Practical Hemostasis and Thrombosis 2nd /N.Key, M. Makris, D. O'Shaughnessy, D. Lillicrap// Second edition. –WILEY-BLACKWELL : –2009. –P. 73–87.
5. Laffan M. Brown S.A., Collins P.W. et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization // Haemophilia. - 2004. – V.10. – P. 119-217.
6. Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H. et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA) // Haemophilia. - 2008. – V. 14. – P. 171-232.
7. Lyons SE, Bruck ME, Bowie EJW, Ginsburg D. Impaired cellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations // J Biol Chem.- 1992.-V. 267-P.4424–4430.
8. Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment// Haematologica.- 2003.-V88-P. 94–108.
9. Baronciani L, Federici AB, Castaman G, Punzo M, Mannucci PM. Prevalence of type 2b 'Malmö/New York' von Willebrand disease in Italy: the role of von Willebrand factor gene conversion// J Thromb Haemost.- 2008.-V.6-P. 887–890.
10. Gill J.C., EndresBrooks J., Bauer P.J. et al. The effect of AB0 blood group on the diagnosis of von Willebrand disease // Blood. – 1987. – V. 69. – P. 1691–1695.
11. Тромботические и геморрагические риски у беременных женщин / А.В. Колосков, О.А. Багурина, А.А. Лыщев, [и др.] // MEDLINE.RU: сетевой журнал. - 2013. - Том 14. - С. 880 – 890. Режим доступа: http://www.medline.ru/public/pdf/14_069.pdf, свободный.



**ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ HLA У ПАЦИЕНТОВ С АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ

Ж.К. Буркитбаев¹, С.А. Абдрахманова¹, И.Р. Рамильева¹,
А.А. Турганбекова¹, Д.К. Баймукашева¹, Е.Б. Жибурт²

¹Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
(РГП на ПХВ) «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства
здравоохранения Республики Казахстан, Астана
(010000, г. Астана, Казахстан, ул. Ханов Керей и Жанибека, 10)

²ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
(105203, г. Москва, Россия, Нижняя Первомайская улица, 70/10)

DISTRIBUTION OF HLA SPECIFICITIES IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA

Z.K. Burkitbayev¹, S.A. Abdrakhmanova¹, I.R. Ramilyeva¹,
A.A. Turganbekova¹, D.K. Baimukasheva¹, E.B. Zhiburt²

¹Republican State Enterprise on the Right of Economic Management (RSE on REM) «Scientific-
Production Center of Transfusiology», the Ministry of Healthcare
of the Republic of Kazakhstan, Astana
(010000, Astana, Kazakhstan, St. Khans Kerey and Zhanibek, 10)

E-mail: omninpct16@mail.ru, a.saniya@mail.ru, ramilyeva.indira@mail.ru, dr.aida@mail.ru

²FSFI «National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov»
Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
(105203, Moscow, Russia, Nizhnyaya Pervomayskaya street, 70/10)
E-mail: ezhibert@yandex.ru

Изучено распределение HLA-A*, *B, Cw*, DRB1*, DQB1* антигенов у больных с апластической анемией (АА). Наличие ассоциативных связей с развитием АА показано для HLA-A*24, HLA-B*40, *54, HLA-DRB1*14. HLA-C*02, *05, *07, *12, HLA-DRB1*03, *04, *07 аллели обладают вероятным протективным эффектом в отношении развития АА.

Ключевые слова: апластическая анемия, HLA, аллели, антигены, доноры

Studied the distribution of HLA-A*, *B, Cw*, DRB1*, DQB1* antigens in patients with aplastic anemia (AA). The presence of associative links with the development of AA is shown for HLA-A*24, HLA-B*40, *54, HLA-DRB1 *14. HLA-C * 02, * 05, * 07, * 12, HLA-DRB1 * 03, * 04, * 07 alleles possibly have a protective effect against the development of AA.

Keywords: aplastic anemia; HLA; alleles; antigens; donors

Введение

Наиболее сильная волна интереса к проблеме взаимосвязи антигенного состава тканей организма с индивидуальной предрасположенностью человека к определенным видам патологии поднялась после начала изучения системы антигенов гистосовместимости. Один и тот же антиген может иметь сильные ассоциативные связи с одним заболеванием и умеренно или слабо выраженные – с другими. По литературным данным, следует отметить, что апластическая анемия преимущественно ассоциируется с определенными антигенами локуса HLA-A. Показано значительное увеличение

антигена HLA-A2 у больных с апластической анемией [1-2].

Анемия не является редкостью в повседневной практике врача и занимает ведущее место в перечне 38 самых распространенных заболеваний.

В ежегодном отчете Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) регистрируется в среднем 1,62 миллиарда человек (95% CI: 1,50 – 1,74 миллиарда), что соответствует 24,8% населения (95% CI: 22,9% - 26,7%). Наибольшая распространенность отмечается у детей дошкольного возраста (76,1%, 95% CI: 45,7–49,1), беременных и небеременных женщин (69,0 и 73,5 соответственно) и наименьшая распространенность анемии отмечается у лиц мужского пола (12,7%, 95% CI: 8,6–16,9%), у детей школьного возраста, также у пожилых людей (33,0 и 39,1 соответственно). В настоящее время не отмечается тенденции к уменьшению этих показателей [3].

Результаты национально-репрезентативных исследований показали высокий уровень распространенности анемии как среди детей до 5-летнего и школьного возрастов, так и среди взрослого населения в Казахстане, который был наиболее высоким в 1995 году. Распространенность анемии особенно высока (49,4%) среди детей в возрасте 12-14 лет, а также среди женщин репродуктивного возраста (48,2% – в 2008 и 39% – в 2011 году) и среди детей в возрасте 6-59 месяцев (47,4% – в 2008 и 35,2% – в 2011 году). Ранее считалось, что анемия - это удел женщин. Однако оказалось, что в Казахстане почти каждый третий мужчина (28,1%) также страдает анемией. В расчете на все население распространенность анемии в 2008 году составила 41,9% [4].

Апластическая анемия (далее - АА) – тяжелое заболевание кроветворной системы, которое характеризуется панцитопенией в периферической крови и гипоклеточным костным мозгом. Встречается преимущественно в молодом и среднем возрасте, чаще у женщин [5]. На протяжении многих десятков лет со времени первого описания, опубликованного в 1888 г. Р. Ehrlich, для большинства больных была прогностически крайне неблагоприятным заболеванием. По данным Интернационального Исследования Агранулоцитозов и Апластической Анемии (IAAAS) в Европейских странах частота встречаемости АА составляет 2,0 на 1 млн в год при колебании этого показателя в зависимости от страны от 0,6 до 3,0 на 1 млн в год [6].

Цель исследования: изучить характер распределения генетического полиморфизма антигенов гистосовместимости у пациентов с диагнозом апластическая анемия (далее – АА) среди казахстанской популяции.

Материалы и методы

Изучили частоту встречаемости HLA-антигенов I класса (HLA-A, B) и II класса (HLA-DRB1*) у больных с АА и доноров, проживающих в Казахстане. HLA-типирование и обработка данных выполнены в «Научно-производственном центре трансфузиологии» г.Астана.

Обследовали 3726 человек по локусам HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 при низком разрешении: 3621 здоровых доноров крови и 105 пациентов с диа-

гнозом АА. Все пациенты находились на лечении в клинике «Национального научного центра онкологии и трансплантологии» г.Астана, диагностика проведена на основании протокола АА-2013KZ («Протоколы диагностики и лечения гематологических заболеваний у взрослых» Протокол №16 от 16.08.2013). Среднее значение возраста доноров (контрольная группа) составило 41 год (диапазон от 18 до 64 лет). Среднее значение возраста пациентов (опытная группа) составило 47 лет (диапазон от 3 до 67 лет). Распределение по половому признаку среди пациентов было следующим: мужчины 55 (52,3%), женщины 50 (47,6%). Среди доноров преобладали лица мужского пола 2136 (59%) и 1485 (41%) соответственно.

Геномную ДНК для проведения типирования HLA антигенов выделяли из лейкоцитов периферической крови протеиназным методом с использованием колонок с силикагелевой мембраной и набора реагентов PROTRANS DNA BOX (Protrans, Германия). Типирование пациентов (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) и доноров крови (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) выполнены методом полимеразной цепной реакции, применялись коммерческие наборы реагентов фирмы Protrans – PROTRANS HLA-A*/B*/DRB1* Cyclerplate System, PROTRANS HLA-C* Cyclerplate System, PROTRANS HLA-DQB1* Cyclerplate System.

Результаты оценили с использованием дескриптивной статистики, непараметрического χ^2 -критерия, отношения шансов (ОШ) и 95 % доверительного интервала (ДИ 95%). Р-значение <0,05 считалось статистически значимым. Для получения всех статистических данных использовался сайт молекулярной биологии Кирова.

Результаты

Результаты представлены в таблицах 1-5.

Увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-A*24(OR=1,66, CI 1,12-2,47, p<0,05) A36 (p<0,01) в группе пациентов позволяет предположить наличие ассоциации данных генов с развитием АА.

Таблица 1.

Характер распределения HLA антигенов локуса А у пациентов и доноров

Антигены HLA	Пациенты		Доноры		χ^2	p	ОШ [ДИ 95%]
	n	%	n	%			
A*01	18	17,1	706	19,5	0,36	p>0,05	0,85 [0,51 - 1,43]
A*02	49	46,7	1802	49,8	0,39	p>0,05	0,88 [0,6 - 1,3]
A*03	16	15,2	703	19,4	1,14	p>0,05	0,75 [0,44 - 1,28]
A*11	13	12,4	522	14,4	0,34	p>0,05	0,84 [0,47 - 1,51]
A*23	3	2,9	148	4,1	0,40	p>0,05	0,69 [0,22 - 2,2]
A*24	42	40	1036	28,6	6,44	p<0,05	1,66 [1,12 - 2,47]
A*25	4	3,8	158	4,4	0,08	p>0,05	0,87 [0,32 - 2,39]
A*26	5	4,8	325	9	2,24	p>0,05	0,51 [0,21 - 1,25]
A*29	3	2,9	77	2,1	0,26	p>0,05	1,35 [0,42 - 4,36]

A*30	3	2,9	219	6,0	1,85	p>0,05	0,46 [0,14 - 1,45]
A*31	5	4,8	286	7,9	1,39	p>0,05	0,58 [0,24 - 1,44]
A*32	5	4,8	168	4,6	0,003	p>0,05	1,03 [0,41 - 2,56]
A*33	7	6,7	317	8,8	0,56	p>0,05	0,74 [0,34 - 1,62]
A*34	0	0	6	0,2	0,17	p>0,05	0 [0 - 0]
A*36	1	1	0	0	34,49	p<0,01	0 [0 - 0]
A*43	0	0	1	0	0,02	p>0,05	0 [0 - 0]
A*66	0	0	26	0,7	0,75	p>0,05	0 [0 - 0]
A*68	6	5,7	234	6,5	0,09	p>0,05	0,88 [0,38 - 2,02]
A*69	0	0	6	0,2	0,17	p>0,05	0 [0 - 0]
A*74	0	0	4	0,1	0,11	p>0,05	0 [0 - 0]
A*80	0	0	1	0	0,02	p>0,05	0 [0 - 0]

Увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-B*40 (OR=2,44, CI 1,6-3,71, p<0,01), *54 (OR=3,79, CI 1,85-7,76, p<0,01) позволяет констатировать ассоциацию AA с данными антигенами системы HLA. В нашем исследовании не были выявлены антигены HLA-B*59, *78, *81, *82, *83.

Таблица 2.

**Характер распределения HLA антигенов локуса В
у пациентов и доноров**

Антигены HLA	Пациенты		Доноры		χ^2	p	ОШ [ДИ 95%]
	n	%	n	%			
B*07	10	9,5	519	14,4	1,98	p>0,05	0,63 [0,32 - 1,21]
B*08	9	8,6	310	8,6	0	p>0,05	1 [0,5 - 1,99]
B*13	16	15,2	505	14	0,13	p>0,05	1,1 [0,64 - 1,9]
B*14	6	5,7	131	3,6	1,25	p>0,05	1,61 [0,69 - 3,73]
B*15	17	16,2	475	13,2	0,81	p>0,05	1,27 [0,75 - 2,16]
B*18	6	5,7	202	5,6	0,003	p>0,05	1,02 [0,44 - 2,36]
B*27	6	5,7	306	8,5	1,02	p>0,05	0,65 [0,28 - 1,5]
B*35	14	13,3	721	20	2,85	p>0,05	0,62 [0,35 - 1,09]
B*37	4	3,8	123	3,4	0,05	p>0,05	1,12 [0,41 - 3,1]
B*38	2	1,9	191	5,3	2,38	p>0,05	0,35 [0,09 - 1,42]
B*39	4	3,8	115	3,2	0,13	p>0,05	1,2 [0,44 - 3,32]
B*40	33	31,4	571	15,8	18,22	p<0,01	2,44 [1,6 - 3,71]
B*41	3	2,9	78	2,2	0,23	p>0,05	1,33 [0,41 - 4,29]
B*42	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]
B*44	10	9,5	510	14,1	1,80	p>0,05	0,64 [0,33 - 1,23]
B*45	1	1,0	11	0,3	2,60	p>0,05	4,67 [0,59 - 36,67]
B*46	6	5,7	133	3,7	1,16	p>0,05	1,58 [0,68 - 3,67]
B*47	0	0	9	0,2	0,26	p>0,05	0 [0 - 0]
B*48	8	7,6	178	4,9	1,54	p>0,05	1,59 [0,76 - 3,32]
B*49	2	1,9	128	3,5	0,81	p>0,05	0,53 [0,13 - 2,16]

B*50	3	2,9	193	5,4	1,26	p>0,05	0,52 [0,16 - 1,66]
B*51	16	15,2	507	14,1	0,12	p>0,05	1,1 [0,64 - 1,89]
B*52	3	2,9	204	5,7	1,52	p>0,05	0,49 [0,15 - 1,56]
B*53	1	1,0	18	0,5	0,41	p>0,05	1,92 [0,25 - 14,5]
B*54	9	8,6	87	2,4	15,36	p<0,01	3,79 [1,85 - 7,76]
B*55	3	2,9	118	3,3	0,05	p>0,05	0,87 [0,27 - 2,78]
B*56	1	1,0	45	1,2	0,07	p>0,05	0,76 [0,1 - 5,57]
B*57	6	5,7	193	5,4	0,03	p>0,05	1,07 [0,46 - 2,48]
B*58	5	4,8	265	7,3	1,01	p>0,05	0,63 [0,25 - 1,56]
B*59	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]
B*67	0	0	10	0,3	0,29	p>0,05	0 [0 - 0]
B*73	0	0	12	0,3	0,35	p>0,05	0 [0 - 0]
B*78	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]
B*81	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]
B*82	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]
B*83	0	0	0	0	H3*	p>0,05	0 [0 - 0]

Примечание: H3* - не значимо

Присутствие антигенов HLA-C*02 (OR=0,43, CI 0,2-0,93, p<0,05), *05 (OR=0,16, CI 0,02-1,17, p<0,05), *07 (OR=0,46, CI 0,29-0,73, p<0,01), *12 (OR=0,35, CI 0,17-0,73, p<0,01) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития АА.

Таблица 3

Характер распределения HLA антигенов локуса С у пациентов и доноров

Антигены HLA	Пациенты		Доноры		χ^2	p	ОШ [ДИ 95%]
	n	%	n	%			
C*01	17	16,2	492	13,7	0,51	p>0,05	1,21 [0,72 - 2,06]
C*02	7	6,7	512	14,3	4,90	p<0,05	0,43 [0,2 - 0,93]
C*03	40	38,1	1058	29,5	3,57	p>0,05	1,47 [0,98 - 2,19]
C*04	13	12,4	689	19,2	3,10	p>0,05	0,59 [0,33 - 1,07]
C*05	1	1	200	5,6	4,24	p<0,05	0,16 [0,02 - 1,17]
C*06	20	19	934	26,1	2,62	p>0,05	0,67 [0,41 - 1,09]
C*07	23	21,9	1356	37,9	11,08	p<0,01	0,46 [0,29 - 0,73]
C*08	15	14,3	414	11,6	0,73	p>0,05	1,28 [0,73 - 2,22]
C*12	8	7,6	676	18,9	8,54	p<0,01	0,35 [0,17 - 0,73]
C*14	4	3,8	134	3,7	0,001	p>0,05	1,02 [0,37 - 2,81]
C*15	12	11,4	356	9,9	0,25	p>0,05	1,17 [0,63 - 2,15]
C*16	4	3,8	116	3,2	0,10	p>0,05	1,18 [0,43 - 3,27]
C*17	1	0,9	89	2,5	1,00	p>0,05	0,38 [0,05 - 2,73]
C*18	0	0	1	0	0,02	p>0,05	0 [0 - 0]

Присутствие антигенов HLA-DRB1*03, *04, ($p < 0,05$) *07 ($p < 0,01$) также чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития данной патологии.

Таблица 4

Характер распределения HLA антигенов локуса DRB1 у пациентов и доноров

Антигены HLA	Пациенты		Доноры		χ^2	p	ОШ [ДИ 95%]
	n	%	n	%			
DRB1*01	11	10,5	553	15,4	1,90	$p > 0,05$	0,64 [0,34 - 1,21]
DRB1*03	10	9,5	665	18,5	5,50	$p < 0,05$	0,46 [0,24 - 0,89]
DRB1*04	18	17,1	960	26,7	4,79	$p < 0,05$	0,57 [0,34 - 0,95]
DRB1*07	13	12,4	887	24,7	8,37	$p < 0,01$	0,43 [0,24 - 0,77]
DRB1*08	11	10,5	365	10,2	0,01	$p > 0,05$	1,04 [0,55 - 1,95]
DRB1*09	5	4,8	208	5,8	0,19	$p > 0,05$	0,81 [0,33 - 2,02]
DRB1*10	2	1,9	133	3,7	0,93	$p > 0,05$	0,51 [0,12 - 2,07]
DRB1*11	22	21	643	17,9	0,65	$p > 0,05$	1,22 [0,75 - 1,96]
DRB1*12	9	8,6	288	8	0,04	$p > 0,05$	1,08 [0,54 - 2,15]
DRB1*13	16	15,2	738	20,5	1,76	$p > 0,05$	0,7 [0,41 - 1,19]
DRB1*14	24	22,9	410	11,4	12,92	$p < 0,01$	2,3 [1,44 - 3,67]
DRB1*15	28	26,7	861	23,9	0,41	$p > 0,05$	1,15 [0,74 - 1,79]
DRB1*16	4	3,8	140	3,9	0,002	$p > 0,05$	0,98 [0,35 - 2,69]

По DQB1 локусу не выявлено закономерностей встречаемости антигенов, что, возможно, обусловлено недостаточной численностью анализируемых групп.

Таблица 5

Характер распределения HLA антигенов локуса DQB1 у пациентов и доноров

Антигены HLA	Пациенты		Доноры		χ^2	p	ОШ [ДИ 95%]
	n	%	n	%			
DQB1*02	37	35,2	1340	37,5	0,217	$p > 0,05$	0,91 [0,6 - 1,36]
DQB1*03	61	58,1	2319	64,8	2,036	$p > 0,05$	0,75 [0,51 - 1,11]
DQB1*04	13	12,4	282	7,9	2,796	$p > 0,05$	1,65 [0,91 - 2,99]
DQB1*05	27	25,7	1128	31,5	1,610	$p > 0,05$	0,75 [0,48 - 1,17]
DQB1*06	44	41,9	1555	43,5	0,104	$p > 0,05$	0,94 [0,63 - 1,39]

Обсуждение

Увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-A*24 (OR=1,66, CI 1,12-2,47, $p < 0,05$) A36 ($p < 0,01$) в группе пациентов позволяет предположить наличие ассоциации данных генов с развитием АА.

В публикациях японских исследователей продемонстрирован предрасполагающий к развитию АА эффект гена HLA-A*23 среди японских пациентов [7]. Лебедева Л.Л. с соавторами выделяет HLA-A*01 как ген, предрасполагающий к развитию АА [8]. Chiewsilp P. и соавторы установили

защитный эффект гена HLA-A*33 в отношении развития АА среди тайцев [9]. Увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-B*40 (OR=2,44, CI 1,6-3,71, p<0,01), *54 (OR=3,79, CI 1,85-7,76, p<0,01) позволяет констатировать ассоциацию АА с данными антигенами системы HLA, что было подтверждено в аналогичных зарубежных публикациях о предрасполагающей роли гена HLA-B*40. Также зарубежными исследователями установлен предрасполагающий эффект генов HLA-B*08, *51, *52 в группе пациентов восточно-европейских славян и среди пациентов пакистанской популяции [8, 10].

Присутствие антигенов HLA-C*02 (OR=0,43, CI 0,2-0,93, p<0,05), *05 (OR=0,16, CI 0,02-1,17, p<0,05), *07 (OR=0,46, CI 0,29-0,73, p<0,01), *12 (OR=0,35, CI 0,17-0,73, p<0,01) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития АА, что было частично подтверждено в аналогичных зарубежных публикациях о протективной роли HLA-C*07 гена [9].

Увеличение частоты встречаемости антигена HLA-DRB1*14 (OR=2,3, CI 1,44-3,67, p<0,01) позволяет констатировать ассоциацию АА с данным антигеном, когда Wang F. и авторами была выявлена противоположная закономерность в китайской популяции [11].

Присутствие антигенов HLA-DRB1*03, *04, (p<0,05) *07 (p<0,01) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития данной патологии. В аналогичных зарубежных публикациях была установлена противоположная закономерность для тайской популяции в отношении гена HLA-DRB1*03, установлен предрасполагающий к развитию АА эффект [9]. К такому же выводу пришла и группа исследователей во главе с Лебедевой Л.Л. [8].

Также зарубежные исследователи выделяют гены HLA-DRB1*02, *08, *15, как предрасполагающие к развитию АА, тогда как Stern M. и соавторы показали протективный эффект HLA-DRB1*15 в отношении развития АА [8- 9, 11- 14].

Заключение

Проведенный анализ выявил характерный профиль распределения специфичностей системы HLA у пациентов с АА в казахстанской популяции.

Изучение распределения антигенов системы HLA у пациентов с АА позволило предположить существование ассоциативных связей между наличием в фенотипе пациентов HLA-A*24, HLA-B*40, *54, HLA-DRB1*14 и развитием данной патологии. Также установлена предположительно протективная роль в отношении АА ряда антигенов HLA- HLA-C*02, *05, *07, *12, HLA-DRB1*03, *04, *07.

Список литературы

1. Иммунологическая инженерия / ред.: Д. У. Джирш, Р. В. Петров; пер.: Л. М. Харламова, К. В. Петракова. – 1982.

2. Шабалин, В.Н. Клиническая иммуногематология / В.Н. Шабалин, Л.Д. Серова. Л.: Медицина, 1988. - 310 с.
3. Алексеев, Н.А. Гематология и иммунология детского возраста / Н.А. Алексеев. Москва: Гиппократ; 2009. -1039 с.
4. О профилактике анемии, йододефицита и дефицита витаминов у школьников: пособие / Ш.С. Тажибаев, Ф.Е. Оспанова, А.А. Ергалиева, А.П. Сарсембаева. – Серия Школьное питание, 2008.- 16 с.
5. Идельсон, Л.И. Руководство по гематологии: под ред. Воробьева А.И., Анемии, 1985. - 3-159 с.
6. Лабораторная диагностика анемий: Пособие для врачей / В.В. Долгов, С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь. - Тверь: «Губернская медицина», 2001.
7. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia / H. Maruyama, T. Katagiri, K. Kashiwase [at al.] // *Experimental Hematology*. – 2016. -№ 44(10). –С.931-939.e3. doi: 10.1016/j.exphem.2016.05.013.
8. Ассоциация антигенов HLA системы с приобретенной апластической анемией и миелодиспластическим синдромом у детей / Л.Л. Лебедева, Т.А. Пухликова, А.А. Астрелина [и др.] // *Гематологи и трансфузиология*. - 2012. -№ 57(3).-С. 57-58.
9. Preliminary study of HLA-ABCD R antigens in CML, ANLL, thalassemia and severe aplastic anemia in Thais / P. Chiewsilp, K. Sujirachato, T. Mongkolsuk [at al.] // *Journal of the Medical association of Thailand*.- 2000.- № 83 Suppl 1:S130-6.
10. Epidemiologic and HLA antigen profile in patients with aplastic anemia / M. Taj, T.S. Shames, S.H. Ansari [at al.] // *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*.- 2014.- № 24(8). С. 549-52. doi: 08.2014/JCPSP.549552.
11. Correlation of HLA-DRB1 gene polymorphism and aplastic anemia in Xinjiang Han people / F. Wang, A. Hu, Y. Yang [at al.] // *Chinese journal of cellular and molecular immunology*. – 2014. - №30 (2). С.188-90.
12. Human leukocyte antigen DR15 is associated with reduced relapse rate and improved survival after human leukocyte antigen-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation / M. Stern, J. Passweg, J.M. Tiercy [at al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. - 2006. -№ 12(11). С. 1169-75.
13. Susceptibility to aplastic anemia is associated with HLA-DRB1*1501 in an aboriginal population in Sabah, Malaysia / J.S. Dhaliwal, L. Wong, M.A. Kamaluddin [at al.] // *Human Immunology*. – 2011. -№ 72(10). С. 889-92. doi: 10.1016 / j.humimm.2011.06.013. Epub 2011 Jul 1.
14. Association of Human Leukocyte Antigen DRB1*15 and DRB1*15:01 Polymorphisms with Response to Immunosuppressive Therapy in Patients with Aplastic Anemia: A Meta-Analysis / S. Liu, Q. Li, Y. Zhang [at al.] // *PLoS One*. – 2016. - № 11(9):e0162382. doi: 10.1371 / journal.pone.0162382.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ ПО ПРОТОКОЛУ МВ-2008

Васкина Е. А., Целоусова О. М., Данилова Е. В., Татаурова И. П.

*ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)*

RESULTS OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATMENT IN CHILDREN ACCORDING TO THE MB-2008 PROTOCOL

Vaskina E.A., Celousova O. M., Danilova E. V., Tataurova I. P.

*FGBUN «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal
Medical and Biological Agency» Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: vaskina_e@inbox.ru, celousova.kirov@yandex.ru,
danilova_e@inbox.ru, irinatatayrova@yandex.ru*

Острый лимфобластный лейкоз занимает ведущее место в структуре онкологических заболеваний детского возраста. Использование длительной мультимодальной терапии позволило достичь высоких показателей выживаемости. При оценке результатов исследования по протоколу МВ-2008 полной ремиссии достигли 95,5% больных, рецидивы на разных этапах терапии зарегистрированы у 9% пациентов. Общая выживаемость составила 84%, безрецидивная выживаемость 92%.

Ключевые слова: *Острый лимфобластный лейкоз, дети, группы риска, общая выживаемость*

Acute lymphoblastic leukemia occupies a leading position in the structure of childhood cancer. The use of long-term multimodal therapy allowed achieving high survival rates. When assessing the results of the study using the MB-2008 protocol, 95.5% of patients achieved complete remission, relapses at different stages of therapy reported in 9% of patients. Overall survival was 84%, with a relapse-free survival rate of 92%.

Keywords: *acute lymphoblastic leukemia, children, risk groups, overall survival*

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) занимает ведущее место в структуре онкологических заболеваний детского возраста и вносит существенную долю в уровень смертности детей старше 1 года. Только 30 лет назад это заболевание приводило к летальному исходу в течение 6 месяцев после установления диагноза более чем в 80 % случаев, а в последующие 2 года умирали все пациенты. Внедрение длительной, мультимодальной химиотерапии с учетом индивидуального риска возникновения рецидива заболевания позволило достичь 5-летней безрецидивной выживаемости у 50-75% больных. Основой современных технологий лечения острого лимфобластного лейкоза являются дифференцированные лечебные подходы в зависимости от прогностических факторов и наиболее важных биологических маркеров ОЛЛ.

Благодаря новаторской стратегии ФГБУ ФНКЦ ДГОиИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России по внедрению международных стандартов те-

рапии с 90 годов XX века эффективность лечения детских лейкозов в России практически достигла мировых показателей.

Для оптимизации лечения ОЛЛ в России в 2002 году совместно с клиникой Шарите (Берлин) в ФГБУ ФНКЦ ДГОиИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России был разработан новый протокол (ALL-MB-2002) для лечения ОЛЛ, с помощью которого предполагалось уменьшить потребность в трансфузиях компонентов крови, отказаться от краниального облучения у большинства больных и проведения высокодозной интенсивной полихимиотерапии; а также лечение пациентов осуществлять в основном в стационаре дневного пребывания.

Исходя из результатов лечения по программе ALL-MB-2002 для уменьшения токсичности и увеличения эффективности химиотерапии предложен усовершенствованный протокол ALL-MB-2008, разработанный этой же группой исследователей. В данном протоколе предложена новая стратификация на группы риска, увеличено количество люмбальных пункций с целью усиления профилактики ЦНС-лейкемии; отказались от редукции дозы меркаптопурина в первой консолидации у больных промежуточной группы риска.

Цель исследования заключалась в оценке результатов лечения ОЛЛ у детей по протоколу ALL-MB-2008.

Материалы и методы

Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1. Всего под наблюдением находилось 66 детей в возрасте от 1 года до 20 лет (медиана 4 года). Основная группа пациентов представлена детьми в возрасте от 1 до 5 лет (59%), 34 девочки и 32 мальчика. Из Кирова и Кировской области - 47 пациентов, Костромской - 6, Республики Чувашия - 13.

Таблица 1.

Демографическая характеристика пациентов

Характеристика пациентов	Количество больных	
	Абс	%
Всего пациентов	66	100
Медиана возраста		
Возрастные группы : от 1 года до 5 лет	39	59,0
от 5 лет до 10 лет	15	22,7
10 лет и старше	12	18,2
Мальчики/девочки	32/34	

На момент диагностики заболевания (табл. 2) у большинства детей (86,3%) уровень лейкоцитов в периферической крови составлял менее $50,0 \times 10^9/\text{л}$, увеличение средостения зарегистрировано у 5 больных; поражения ЦНС не отмечалось ни у одного из пациентов. В зависимости от наличия неблагоприятных факторов больные распределены на группы риска. Установлено, что преобладали больные со стандартной и промежуточ-

ной группами риска; группа высокого риска представлена 5 больными. При иммунофенотипировании лейкоэмических клеток определено, что наиболее часто встречался не Т-клеточный иммунологический вариант заболевания – 60 пациентов (91%), Т-клеточный – у 6 пациентов (9%). Неблагоприятных цитогенетических изменений не выявлено у 64 больных, у 2 обнаружена t (9; 22).

Таблица 2.

Инициальные клиничко-лабораторные признаки больных ОЛЛ

Признак	Количество больных	
	Абс	%
Инициальный лейкоцитоз < 50x10 ⁹ /л	57	86,3
50-100 x10 ⁹ /л	4	6,1
> 100 x10 ⁹ /л	5	7,6
Спленомегалия – более 4,0 см из-под края реб. дуги	18	27,2
Группы риска :		
стандартный	37	56,1
промежуточный	24	36,3
высокий	5	7,6
Иммунологический вариант: не Т-клет.	60	91,0
Т-клет.	6	9,0

Результаты

Результаты лечения детей с ОЛЛ представлены в таблице 3. Показатель достижения ремиссии составил 90,9%. У 2 детей из группы высокого риска констатирована первичная резистентность. Летальный исход, причиной которого явился сепсис, в период ремиссии составил 4,5% (3 больных). Рецидивы заболевания зарегистрированы на разных этапах терапии у 6 пациентов: у 4 - ранний костномозговой; у 1 - ранний нейрорецидив (родители отказались от лечения), у 1 констатирован комбинированный рецидив после отмены терапии. Вторая ремиссия не достигнута ни у одного из пациентов. Закончили лечение 53 больных, 1-получает поддерживающую терапию.

Таблица 3.

Результаты лечения больных ОЛЛ по программе ALL-MB-2008

Показатель	Количество больных	
	Абс	%
Полная ремиссия	63	95,5
Резистентность к терапии	2	3,0
Смерть в индукции	1	1,5
Смерть в ремиссии	3	4,5
Рецидив	6	9,0
Вторая ремиссия	0	0
Полная продолжительная ремиссия	54	81,8

В настоящее время в полной продолжительной ремиссии находятся 54 (81,8%) пациента. Общая выживаемость на протоколе MB-2008 составила 84%, медиана общей выживаемости не достигнута. Пятилетняя безрецидивная выживаемость составила 92%.

Выводы

1. Полученные результаты лечения детей, больных ОЛЛ, свидетельствуют о высокой эффективности протокола ALL-MB-2008.

2. Показатели общей выживаемости сопоставимы в стандартной и промежуточной группах риска, у 2 больных группы высокого риска зарегистрирована первичная резистентность к различным видам терапии.

3. Внедрение нового протокола и дифференцированный лечебный подход позволил сократить объемы сопроводительной и гемокомпонентной терапии.

Список литературы

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков / А.Г. Румянцев, А.А. Масчан, Ю.В. Румянцева, А.И. Карачунский / Москва, 2015. - С.8.

2. Румянцев, А.Г. Эволюция лечения острого лимфобластного лейкоза у детей / А.Г. Румянцев // Педиатрия, 2016; 4: 7-14.

3. Лечение ОЛЛ у подростков и молодых взрослых: опыт Москва-Берлин / А.В. Пшонкин, Ю.В. Румянцева, Д.В. Литвинов [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии.- 2016.-3(1): 35-43.

4. Масчан, М.А. Острый лимфобластный лейкоз у детей / М.А. Масчан, М.В. Мякова // онкогематология.- 2006.- № 1-2.- С. 50-63.

5. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia Childrens Oncology Group study AALL0031 / K.A. Schultz, A. Carroll, N.A. Heerema [et al.] // Leukemia.- 2014.- 28(7): 1467-71.

МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ Ph-ПОЗИТИВНОГО ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ

*Докшина И. А., Лагунова О. Р., Овсепян В. А., Федоровская Н. С.,
Исаева Н. В., Зотина Е. Н., Поздеев Н. М.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)*

MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN TREATMENT OF ADULT PATIENTS SUFFERING FROM PH-POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

*Dokshina I. A., Lagunova O. R., Ovsepyan V. A., Fedorovskaya N. S.,
Isaeva N. V., Zotina E. N., Pozdeev N. M.*

*Federal state budget institution of science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and
Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency», Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 71)*

*E-mail: dokshina.irisha@mail.ru, lagunova@niigpk.ru, vovsepyan@mail.ru,
fednadst@mail.ru, isaevanatalia@yandex.ru, enzotina@mail.ru, nmpozdeev@gmail.com*

Представлен анализ результатов лечения 14 больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом (Ph+ОЛЛ) с применением ингибитора тирозинкиназы 1 поколения, эффективность использования которого составила 92,8%. Проводился мониторинг минимальной резидуальной болезни, включающий в себя определение химерного онкогена BCR/ABL, с целью оценки эффективности терапии, контроля за сохранением ремиссии и раннего обнаружения рецидива. У пациентов с Ph+ОЛЛ в состоянии полной ремиссии выявлена персистенция транскрипта BCR/ABL, в том числе у 6 (46%) - в период консолидации, у 4 (33%) - в период поддерживающей терапии. Гематологический рецидив диагностирован у 5 больных в период от 7 мес до 5 лет.

Ключевые слова: Ph-позитивный острый лимфобластный лейкоз, химерный онкоген BCR/ABL, мониторинг минимальной резидуальной болезни

We have provided the analysis of the results of treatment of 14 patients suffering from Ph+ALL using inhibitor of tyrosine kinases of generation 1, the efficiency of which made up 92,8%. We conducted monitoring of minimal residual disease including determination of chimerical oncogene BCR/ABL to estimate the efficiency of therapy, control of remission and early detection of relapse. In patients with the state of complete remission we discovered persistence of transcript BCR/ABL, among others in 6 cases (46%) - in the period of consolidation, in 4 cases (33%) - in the period of supporting therapy. Hematological relapse was diagnosed in 5 patients over the period from 7 months to 5 years.

Keywords: Ph-positive acute lymphoblastic leukemia, chimerical oncogene BCR/ABL, monitoring of minimal residual disease

Введение. Проблема стандартизации критериев оценки эффективности противоопухолевой терапии при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) до настоящего времени не решена. Сегодня очевидно, что определе-

ние полной ремиссии (ПР) должно включать в себя информацию о результатах молекулярно-генетических исследований, направленных на выявление минимальной резидуальной болезни (МРБ). МРБ - это персистенция остаточного пула лейкоэмических клеток после достижения ПР. Величина МРБ выражается в количестве нормализованных копий химерного транскрипта в исследуемом образце костного мозга. Диагностика МРБ открывает новые возможности верификации полноты эрадикации опухоли, а количественная оценка МРБ позволяет стратифицировать пациентов по группам риска и прогнозировать развитие заболевания до клинической и гематологической манифестации. Исследование МРБ имеет важное значение при измерении полноты начального ответа на терапию у пациентов, достигших ПР по морфологическим стандартам. Наличие МРБ является независимым прогностическим фактором развития рецидива заболевания [1].

Ph-позитивный острый лимфобластный лейкоз (Ph+ОЛЛ) встречается, по данным разных авторов, у 25-30% взрослых больных ОЛЛ [2, 3]. Транслокация (9;22)(q34;q11), в результате которой образуется Ph-хромосома, является самой частой хромосомной абберацией при ОЛЛ взрослых. В результате реципрокной транслокации (9;22) на хромосоме 22 образуется слитный ген BCR/ABL. Установлено, что разрывы гена ABL при данной транслокации происходят всегда в одном и том же месте, а гена BCR - в разных точках [4]. При ОЛЛ в зависимости от места разрыва образуется два варианта кодируемого слитным геном BCR/ABL белка: p190, образование которого происходит благодаря трансляции транскрипта e1a2, p210, кодируемые b2a2 и b3a2. При ОЛЛ встречаются варианты как с p190, так и с p210 в различной пропорции: у взрослых больных p190 обнаруживается в 50-70% случаев Ph+ОЛЛ, p210 - в 30-50%. При Ph+ОЛЛ часто обнаруживаются добавочные хромосомные абберации: встречаются как потери, так и приобретения целых хромосом или их частей (микроделеции и микродупликации). До недавнего времени Ph+ОЛЛ расценивался как вариант заболевания с очень плохим прогнозом. Частота ремиссий при Ph+ОЛЛ при интенсивной химиотерапии, по данным большинства публикаций, не превышала 65% у больных не старше 40 лет и 40% - старше 60 лет. У большинства пациентов продолжительность ремиссии составляла 9-16 месяцев [5].

Начало XXI века ознаменовалось внедрением в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназы (ИТК), применение которых радикально изменило результаты терапии хронического миелолейкоза и несколько меньше - Ph+ОЛЛ. Включение в терапию ОЛЛ ИТК 1 поколения - иматиниба («Гливек») заметно улучшило результаты лечения больных с Ph+ОЛЛ: достижение полных ремиссий стало возможным в 90% случаев, общая выживаемость достигла 60% [6].

Цель: определение МРБ на всех этапах лечения больных Ph+ОЛЛ.

Материалы и методы. В гематологической клинике КНИИГиПК с 2005 по 2016 гг. применялся протокол лечения «Ph+ОЛЛ+Гливек» для взрос-

лых больных с Ph+ОЛЛ. За указанный период диагноз Ph+ОЛЛ установлен у 14 пациентов, что составило 31% от всех ОЛЛ взрослых, в возрасте от 27 до 70 лет (медиана возраста 53 г.). Мужчин - 7, женщин - 7. При иммунофенотипической диагностике у всех 14 (100%) больных установлен В-линейный ОЛЛ: у 4 - ранний, у 6 - пре В, у 4 - common В - варианты. Экспрессия миелоидных антигенов CD13, CD33 установлена в 33% случаев. Из 14 пациентов у 11 (78,5%) методом стандартной цитогенетики выявлена транслокация (9;22), у 3 (21,5%) - только химерный онкоген BCR/ABL (FISH-методом). У 1 больного обнаружены множественные комплексные нарушения кариотипа. Транскрипт p190 (метод ОТ-ПЦР) установлен у 10 (71%) обследуемых. Всем 14 больным на этапах индукции/консолидации применялся иматиниб в дозе 400мг/сут., 3 пациентам старше 60 лет проводилась редукция доз химиопрепаратов.

Определение МРБ выполнялось на следующих этапах: после курсов индукции/консолидации, каждые 3 мес на поддерживающем лечении, 1 раз в 6 мес после снятия с протокола в течение 1 года, далее 1 раз в год по показаниям.

Результаты и обсуждение. При анализе эффективности индукционного лечения обнаружено, что клиничко-гематологическая ремиссия достигнута у 13 (92,8%) больных. Ранняя летальность констатирована у 1(7%) больного на 3 неделе индукционной терапии. Причиной смерти стал геморрагический синдром. Резистентная форма Ph+ОЛЛ не зарегистрирована ни в одном случае. Период проведения индукции характеризовался выраженной миелосупрессией. У всех 14 (100%) больных в течение от 7 до 18 дней установлена критическая нейтропения (менее 500мкл/л), что явилось причиной прерывания протокола. Среди других осложнений стероидный диабет наблюдался у 6 (46%) больных, токсический гепатит - у 7 (54%), острый панкреатит - у 1 (7%), мукозит - у 14 (100%).

Наибольшее значение оценка МРБ имеет по завершении этапа индукционной терапии [1,7]. Как и ранний ответ на лечение, исследование МРБ является интегральным отражением биологических особенностей опухоли, ее чувствительности к проводимой терапии, а также индивидуальных вариаций метаболизма химиопрепаратов [8]. Из 13 больных, у которых констатирована морфологическая ПР, у 6 (46%) определялся химерный онкоген BCR/ABL в диапазоне от 1 до 5%, т.е. отсутствие молекулярной ремиссии (МР). Согласно протоколу лечения отсутствие МР не предполагало изменения тактики терапии. Все пациенты, закончившие режим индукции, получали терапию консолидации. На этапе консолидации у 3 (23%) больных (в возрасте 58 - 62 г.) констатирован летальный исход от инфекционных осложнений через 5, 6 и 9 мес терапии соответственно. Статус 10 (77%) пациентов перед поддерживающим лечением был следующим: ПР сохранялась у 10 (100%) больных, МР - у 9 (90%), химерный транскрипт BCR/ABL определялся у 1(10%) больного при ПР. При мониторинге МРБ на этапе поддерживаю-

щего лечения у 4 (33,3%) пациентов отмечалась персистенция транскрипта химерного онкогена BCR/ABL в костном мозге вплоть до его исчезновения и вновь наблюдалось его повышение, т. е. развитие молекулярного рецидива в течение 7, 12, 13 и 18 мес при сохранении морфологической ПР. Установлено, что на любом этапе гематологической ремиссии есть риск развития молекулярного рецидива, вслед за которым обязательно следует гематологический рецидив [9]. Отслеживание кинетики МРБ в ремиссии особенно важно для раннего обнаружения и предотвращения рецидива. У 4 больных после обнаружения химерного онкогена BCR/ABL через 2 - 11 мес диагностирован гематологический рецидив. У 1 пациента поздний рецидив развился через 5 лет ПР.

Пятеро больных, у которых достигнута ПР, живы без признаков МРБ в течение 28, 38, 51, 52 мес и 10 лет. Два пациента закончили лечение по протоколу. МР сохраняется у 4 больных.

Заключение. Таким образом, терапия с использованием иматиниба в протоколе лечения Ph+ОЛЛ позволила повысить показатели клинко-гематологической ремиссии до 92,8%. При достижении морфологической ремиссии химерный онкоген BCR/ABL определялся в 46% случаев. При мониторинге МРБ на этапе поддерживающего лечения персистенция BCL/ABL <0,1% отмечается от 3 до 18 мес при сохранении ПР.

Статус МРБ - независимый прогностический фактор неблагоприятного прогноза. У 4 больных рецидив развился на этапе поддерживающего лечения, у 1 - через 5 лет после снятия с терапии. Диагностирование МРБ, по молекулярным критериям, позволяет сформировать подгруппу Ph+ОЛЛ с неблагоприятным прогнозом.

Скрининг МРБ - обязательная диагностическая опция на всех этапах лечения, выполняемая для стратификации групп риска с целью разработки новых риск-адаптированных программ терапии больных Ph+ОЛЛ с применением ИТК.

Список литературы

1. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) / R. Bassan, O. Spinelli, E. Oldani [et al.] // Blood. - 2009. - 113 (18): 4153-62.
2. Савченко, В.Г. Программное лечение заболеваний системы крови. - М.- Практика. - 2012. - 287-342.
3. Таргетная терапия Ph-позитивного острого лимфобластного лейкеоза взрослых / И.А. Докшина, О.Р. Лагунова, Д.Н. Ярыгин [и др.] // Сборник научных трудов ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. - Киров: Аверс, 2015. - С.257.
4. Faderl, S. Outcome of Philadelphia-positive adult acute lymphoblastic leukemia: Acute Leukemia: or Chronic Myelogenous Leukemia Blastic Crisis/ S.Faderl, H.Kantarjian, D.Thomas // Acta Haematol. - 2005. - 113: 181-4.
5. Gokbuget, N. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, ASH Education Pr. / S. Faderl, D. Hoelzer // Book Hematology. - 2008. - 133-41.
6. Alternating versus concurrent schedule of Imatinib and chemotherapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) / B.Wassman, H.Pfeifer, N. Goekbuget [et al.]

// Blood. - 2006. - 108: 1469-77.

7. Bene, M.C. How and way minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP 12 of the European Leukemia / M.C. Bene, J.S. Kacda // Net. Haematologica. - 2009. - 94(8). - P.1135-1150.

8. Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country / Patcar N., Abu Alex A., Barqan B. [et al.] // Cytometry. Part B: Clinical Cytometry. - 2012.- Vol.82B,4. - P.252-258.

9. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological advances and clinical significance / X. Liu, H.B. Hsieh [et al.] // Cytometry.Part A. - 2012. - 81.- P.169-175.

УДК: 616.71-018.46-06

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ТКАНЕВЫХ СТРУКТУР В ТРЕПАНОБИОПТАТАХ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МУТАЦИИ В ГЕНЕ JAK2V617F

Дьяконов Д.А., Федоровская Н.С., Фокина Е.С., Минаева Н.В., Овсепян В.А.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

HISTOLOGICAL FEATURES OF BONE MARROW TISSUE STRUCTURES IN TREPANOBIOPTATES OF BONE MARROW IN ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA PATIENTS DEPENDING ON THE MUTATION OF JAK2V617F GENE

D.A. Diakonov, N.S. Fedorovskaya, E.S. Fokina, N.V. Minaeva, V.A. Ovsepyan.
Federal State Budgetary Institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical and Biologic Agency», Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: diakonovda@rambler.ru, fednadst@mail.ru, yelena-med@mail.ru, mnvgem@gmail.com, vovsepyan@mail.ru

С целью изучения особенностей структуры костного мозга при эссенциальной тромбоцитемии были проанализированы гистологические препараты трепанобиоптатов от 17 пациентов в зависимости от JAK2V617F статуса. Установлено, что нарушения гистоархитектоники костной и жировой тканей, а также особенности мегакариоцитарного роста у больных имеют определенную связь с наличием мутации в гене.

Ключевые слова: эссенциальная тромбоцитемия, гистология, костный мозг, мегакариоциты, JAK2V617F

To study of bone marrow structure features in essential thrombocythemia was analysis histologist preparations of trepanobiopates from 17 patients depending on the JAK2V617F status. It has been established that violations of histoarchitectonics of bone and adipose tissues, as well as features of megakaryocytic germ in patients, have a definite relationship with the presence of a mutation in the gene.

Keywords: Pessential thrombocythemia, histology, bone marrow, megakaryocytes, JAK2V617F

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) относится к клональной Ph-негативной хронической миелопролиферативной неоплазии и характеризуется повышенной пролиферацией в костном мозге мегакариоцитарного ростка кроветворения [1]. В основе развития заболевания лежит сложный патологический процесс, развивающийся в результате злокачественной трансформации в ранних гемопоэтических предшественниках с одновременной активацией JAK-STAT клеточного сигнального пути, регулирующий рост, дифференцировку, адгезию и апоптоз клеток мегакариоцитарного ряда [2]. Это приводит к значительным изменениям прежде всего в кост-

ном мозге и его окружающих тканях, происходят структурные трансформации микроокружения, формирующего гемопоэтическую нишу (адипоциты, клетки стромы и т.д.) [3, 4].

Согласно Классификации ВОЗ (2016) особое место в диагностике ЭТ занимает гистологическая оценка трепанобиоптатов костного мозга. Необходимость данного исследования обусловлена тесной связью патогенетических механизмов болезни с изменениями, которые происходят в центральном кроветворном органе [5, 6]. Тем не менее особенности тканевой реорганизации на сегодняшний день изучены недостаточно. В современной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные анализу данной проблемы, и в большей степени они носят описательный характер. Более того, открытым остается вопрос относительно особенностей состояния гистоархитектоники костного мозга при ЭТ в зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене JAK2V617F. Сопоставление результатов гистологических и цитогенетических исследований расширит представление об особенностях течения патологического процесса и даст дополнительную информацию для более точной оценки развития, прогноза заболевания и выбора терапевтической тактики.

Цель работы: изучить гистологические особенности тканевых структур в трепанобиоптатах костного мозга у больных ЭТ с учетом мутации гена JAK2V617F.

Материалом исследований послужили трепанобиоптаты подвздошной кости 17 больных ЭТ. Группу 1 составили обследуемые, у которых были выявлены изменения мутационного статуса в гене JAK2V617F (n = 10); 2 группу – пациенты с отсутствием данной перестройки (n = 7). Сравнительный анализ осуществляли с образцами трепанобиоптатов от 10 доноров костного мозга, не имевших в анамнезе заболеваний системы крови и сопоставимых по возрасту с больными ЭТ. Тканевые структуры были изучены на гистологических срезах с использованием гистохимических и иммуногистохимических методов.

Оценку препаратов проводили с помощью светового микроскопа “Leica” (Германия) со встроенной фото- и видеокамерой. Расчеты объема основных тканевых структур в трепанобиоптатах костного мозга были выполнены полуавтоматическим способом с использованием морфометрического программного обеспечения анализа изображений ImageScore Color, версии M в 3-5 полях зрения для каждого образца при объективе x4, окулярах x10. Количественный подсчет мегакариоцитов для каждого образца был выполнен в 10 полях зрения при объективе x40, окулярах x10; в иммуногистохимическом исследовании с помощью иммунопероксидазного метода антиген-позитивные клетки распознавались по экспрессии CD61+. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. При оценке качественных признаков применяли метод χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Статистически

значимыми считали различия при $p < 0,05$.

В результате исследований установлено, что у всех больных были зарегистрированы изменения костной ткани с преобладанием процессов костеобразования, на поверхности балок определено увеличение количества эндостальных стромальных клеток, кроме того, выявлялись небольшие участки гладкой резорбции. При морфометрическом исследовании отмечено, что объем костной ткани при ЭТ не отличался от такового в норме (табл. 1). Однако при более подробной оценке установлено достоверное снижение ее площади у пациентов с мутацией в гене JAK2V617F по сравнению с нормой ($p = 0,027$) и больными 2 группы ($p = 0,004$). При отсутствии изменений мутационного статуса определено существенное увеличение объема костной ткани ($p = 0,019$).

Таблица 1.

Сравнение тканевых структур в трепанобиоптатах костного мозга при ЭТ с учетом статуса JAK2V617F

Группы исследованных	Костная ткань, %	Жировая ткань, %	Гемопоэтическая ткань, %
Группа сравнения	22,1±2,0	40,7±3,1	37,2±1,7
Больные ЭТ	23,0±2,3	43,0±2,7	34,0±2,4
1 группа (JAK2V617F+)	16,9±1,7*/**	44,1±3,3	38,9±3,1**
2 группа (JAK2V617F-)	31,8±2,7*/**	40,7±5,2	27,5±3,1*/**

Примечание (здесь и далее): * – статистическая значимость различий с данными группы сравнения;

** – статистическая значимость различий между данными 1 и 2 групп.

В ходе анализа жировой ткани в гистологических срезах костного мозга было отмечено равномерное распределение адипоцитов как в норме, так и при ЭТ. Объем жировой ткани не отличался от такового в группе сравнения. Количество адипоцитов в 1 поле зрения (при объективе x4, окулярах x10) также было сопоставимо у пациентов и доноров (табл. 2). В результате оценки размера клеточных элементов жировой ткани установлено статистически значимое увеличение площади адипоцита при ЭТ по сравнению с нормой ($p = 0,017$). Выявленные изменения были более характерны для пациентов с отсутствием мутаций в гене JAK2V617F ($p = 0,039$).

Таблица 2.

Морфометрический анализ адипоцитов костного мозга при ЭТ с учетом статуса JAK2V617F

Группы исследованных	Количество адипоцитов в 1 поле зрения	Площадь адипоцита, мкм ²
Группа сравнения	836,6±99,3	1975,1±147,0
Больные ЭТ	726,8±91,4	2493,3±127,8*
1 группа (JAK2V617F+)	652,7±73,9	2418,5±173,5
2 группа (JAK2V617F-)	848,3±99,8	2452,4±168,0*

В результате оценки кроветворной ткани костный мозг у всех пациентов был сопоставим имел нормальную клеточность. Гранулоцитарный росток был представлен клеточными элементами на разных стадиях созревания без выраженных признаков омоложения. Эритроидный ряд характеризовался нормобластoidным типом, эритрокариоциты локализовались небольшими скоплениями и дискретно по всему срезу. Лейко-эритробластическое соотношение находилось в пределах нормальных значений.

В ходе проведения морфометрических исследований определено, что состояние костного мозга в зависимости от мутационного статуса имело достоверное снижение размеров площади кроветворной ткани у больных с отсутствием генетических нарушений по отношению к данным параметрам в группе сравнения ($p = 0,019$) и у больных с наличием мутации JAK2V617F ($p = 0,031$).

В отличие от группы сравнения при ЭТ была отмечена выраженная односторонняя пролиферация мегакариоцитов. При выполнении морфометрических расчетов среднее количество CD61+ позитивных клеток в 1 поле зрения у больных составило $8,5 \pm 0,8$ и было статистически достоверно выше по сравнению с нормой: $3,7 \pm 0,2$ ($p = 0,003$). Пациенты, у которых были выявлены точечные мутации в гене JAK2V617F, имели тенденцию к более высокому содержанию мегакариоцитов в костном мозге, чем обследуемые 2 группы: $9,2 \pm 1,1$ к $6,9 \pm 0,9$ соответственно ($p > 0,05$).

Таким образом, в результате исследований установлено, что течение ЭТ сопровождается изменениями морфофункционального состояния костного мозга, которые зависят от мутационного статуса JAK2V617F. Установлены процессы повышенного костеобразования у больных, не имевших мутации в гене JAK2, и гладкой резорбции у больных с точечной мутацией V617F. Выявлены трофические нарушения жировых клеток (адипоцитов), выраженные в увеличении их площади; в большей степени это характерно для пациентов без мутации в гене и может отражать признаки расстройства кроветворения. Результаты анализа состояния гемопоэтической ткани подтверждают зависимость патоморфологических изменений миелопоэза и особенностей клеток мегакариоцитарного ростка от наличия JAK2V617F мутации.

Учитывая, что нарушения гистоархитектоники костной, жировой и гемопоэтической тканей у больных ЭТ имеют определенную ассоциацию с наличием мутации в гене JAK2V617F, целесообразными и обоснованными являются дальнейшие исследования данных процессов, что возможно, позволит определить дифференцированный подход к лечебной тактике пациентов в зависимости от мутационного статуса.

Список литературы

1. Абдулкадыров, К.М. Современные представления о диагностике и лечении эссенциальной тромбоцитемии / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич [и др.] // Вестник гематологии. – 2014. – Т. 10, № 1. – С. 4-39.

2. Arber, D.A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, № 20. – P. 2391-2405.
3. Barbui, T. Discriminating between essential thrombocythemia and masked polycythemia vera in JAK2 mutated patients / T. Barbui, J. Thiele, A. Carobbio [et al.] // *Am.J.Hematol.* – 2014. – Vol. 89, № 6. – P. 588-590.
4. Tefferi, A. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel / A. Tefferi, J. Thiele, A. Orazi [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, № 4. – P. 1092-109.
5. Gisslinger, H. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria / H. Gisslinger, G. Jerczynski, B. Gisslinger [et al.] // *Leukemia* – 2016. – Vol. 30, № 5. – P. 1126-1132.
6. Thiele, J. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification / J. Thiele, H. Kvasnicka, L. Mullauer [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117, № 21. – P. 5710-5718.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛИНИКО-ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА РАННЕЙ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Зотина Е.Н.¹, Загоскина Т.П.², Шардаков В.И.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров (610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Киров, Россия (610027, Киров, ул. К.Маркса, 112)

PROGNOSTIC VALUE OF CLINICAL, HEMATOLOGICAL AND DEMOGRAPHIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AT AN EARLY STAGE OF THE DISEASE

Zotina E.N.¹, Zagoskina T.P.², Shardakov V.I.¹

¹Federal State Budgetary Science Institution «Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov, Russia (610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kirov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kirov, Russia (610027, Kirov, K.Marksa str., 112)

E-mail: enzotina@mail.ru, zagoskina@blood.kirov.ru, vic-shardakov@mail.ru

Изучено прогностическое значение клинико-гематологических и демографических показателей у 175 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) на ранней стадии заболевания. Показано, что больные ХЛЛ на ранней стадии заболевания представляют собой гетерогенную группу, характеризующуюся различной скоростью прогрессии лейкоза и достоверно различающуюся по демографическим и клинико-гематологическим параметрам.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, прогноз, выживаемость

Studied the prognostic value of clinical, hematological and demographic indicators in 175 patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia (CLL) at an early stage of the disease. It is shown that CLL patients at an early stage of the disease represent a heterogeneous group characterized by different speed of progression of leukemia and significantly different demographic and clinico-hematological parameters.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, prognosis, survival

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является наиболее часто встречающейся формой гемобластозов (30%) [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении опухолей лимфатической системы, ХЛЛ до сих пор остается неизлечимым заболеванием [3, 4]. Среди больных ХЛЛ самую многочисленную группу составляют пациенты с ранней стадией заболевания, которая встречается у 75% пациентов с впервые выявленным ХЛЛ [4-6].

На первый взгляд, симптомы заболевания в дебюте опухолевого про-

цесса у большинства больных одинаковы, однако при детальной оценке обращают на себя внимание особенности клинико-гематологических и морфологических характеристик организма, а впоследствии и различный ответ на терапию. При этом продолжительность жизни больных колеблется от нескольких месяцев до двух десятков лет. У части пациентов заболевание имеет индолентное течение, они длительное время не нуждаются в специфическом лечении. У других опухолевый процесс быстро прогрессирует и им требуется немедленное назначение интенсивной терапии [1, 5, 7]. В зарубежной литературе имеются лишь единичные публикации, посвященные изучению особенностей клинического течения ХЛЛ на ранней стадии заболевания. Имеющиеся в небольшом количестве работы преимущественно содержат описание отдельных наблюдений [8-10]. К сожалению, в отечественных изданиях подобные сведения отсутствуют.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинико-гематологических и демографических особенностей у больных ХЛЛ на ранней стадии в момент постановки диагноза и определение их прогностического значения.

Материалы и методы. В исследование включено 175 больных с впервые выявленным ХЛЛ. Диагноз ХЛЛ верифицировали на основании общепринятых критериев [11]. У всех обследованных заболевание было выявлено впервые в А стадии, которая определялась соответственно классификации J. Binet [12]. Медиана возраста пациентов составила 61 год. Мужчин было 95 (54,3%), женщин – 80 (45,7%). Общее состояние больных ХЛЛ оценивалось по шкале ECOG. На момент включения в исследование у всех пациентов отсутствовали признаки прогрессирования ХЛЛ и показания для начала терапии. Длительность наблюдения за пациентами варьировала от 14 до 153 месяцев, медиана времени наблюдения составила 58 месяцев. При статистическом анализе результатов исследования использовали критерий χ^2 Пирсона. Анализ выживаемости, свободной от лечения, и общей выживаемости (ОВ) осуществляли по методу Каплана-Мейера. Для сравнения кривых выживаемости использовали лог-ранговый критерий. Оценку прогностической ценности признаков в отношении выживаемости, свободной от лечения, и ОВ изучали с помощью модели пропорциональных рисков Кокса. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Установлено, среди больных на ранней стадии ХЛЛ наблюдалось небольшое преобладание мужчин – 95 (54,3%). Учитывая данные литературы [2, 13], подтвержденные нашими наблюдениями, превалирование мужчин с ХЛЛ можно расценить как один из отличительных признаков заболевания.

Возраст пациентов с ХЛЛ на момент постановки диагноза варьировал от 39 до 78 лет. Медиана возраста пациентов составила 61 год. Полученные результаты соответствуют литературным данным о том, что ХЛЛ болеют

преимущественно лица пожилого возраста [10].

Поскольку в онкогематологии при оценке прогноза заболевания и выборе терапии учитывается общее соматическое состояние больных, был изучен этот параметр у пациентов на ранней стадии ХЛЛ, для определения которого использовали шкалу ECOG. Все пациенты в момент постановки диагноза имели удовлетворительное общее состояние, которое соответствовало 0-2 баллам по шкале ECOG (у 70,3% больных – 0 баллов, у 23,4% – 1 балл и у 6,3% – 2 балла). Тяжелых нарушений функциональной активности (3-4 балла по шкале ECOG) у больных ХЛЛ на ранней стадии заболевания не выявлено. Полученные данные согласуются с наблюдениями других авторов [9, 12] и свидетельствуют о том, что общее состояние у большинства пациентов на ранней стадии ХЛЛ значительно не страдает и характеризуется как удовлетворительное.

Учитывая тот факт, что сопутствующие заболевания могут влиять на качество жизни пациентов и эффективность проводимого лечения, проанализирована частота и структура сопутствующей патологии у больных с ранней стадией ХЛЛ в момент постановки диагноза. Установлено, что сопутствующие нарушения других органов и систем встречались у 107 (61,1%) больных ХЛЛ. Одно соматическое заболевание отмечалось у 53 (30,3%), два – у 36 (20,6%), три сопутствующих процесса обнаружено у 18 (10,3%) больных. Необходимо отметить, что среди сопутствующей патологии наиболее часто регистрировались заболевания сердечно-сосудистой системы (37,7%). Эндокринные нарушения наблюдались у 14,9%. Несколько реже встречалась патология пищеварительной (10,3%), бронхолегочной (8,6%) и мочевыводящей (6,3%) систем.

Одним из характерных клинических признаков ХЛЛ является увеличение лимфатических узлов. Известно, что лимфатические узлы увеличиваются не у всех больных на ранней стадии ХЛЛ. В момент постановки диагноза при объективном обследовании нормальные размеры лимфатических узлов наблюдались у 78 (44,6%) пациентов, синдром лимфаденопатии был обнаружен у 97 (55,4%) больных. Периферическая лимфаденопатия встречалась у 62 (35,4%) пациентов, абдоминальная лимфаденопатия (увеличение внутрибрюшных и/или забрюшинных лимфатических узлов) – у 35 (20,0%) больных. Среди 97 пациентов с лимфаденопатией у 45 (46,4%) отмечено увеличение одной зоны лимфатических узлов: наиболее часто поражались лимфатические узлы в области шеи (27,8%), несколько реже – подмышечные (18,6%). Увеличение двух зон лимфатических узлов наблюдалось у 52 (53,6%) больных.

При проведении ультразвукового исследования органов брюшной полости не выявлено увеличение размеров печени ни у одного больного, спленомегалия обнаружена у 13 (7,4%) пациентов (максимальные размеры селезенки: 145×60 мм).

В ходе динамического наблюдения за больными отмечались различ-

ные темпы прогрессирования заболевания. У 119 (68,0%) пациентов выявлено индолентное течение опухолевого процесса, у 56 (32,0%) зафиксировано прогрессирующее течение ХЛЛ. Вялотекущее, медленно развивающееся течение заболевания констатировали спустя 2 года с момента постановки диагноза. У этих больных на протяжении 24 месяцев и более не наблюдалось нарастания лейкоцитоза, абсолютного лимфоцитоза, органомегалии и лимфаденопатии. При прогрессирующем течении ХЛЛ в ближайшие 24 месяца отмечалось значительное увеличение числа лимфоцитов, размеров лимфатических узлов, селезенки и печени, развитие анемии и тромбоцитопении.

Выявлено, что в группе больных с прогрессирующим течением ХЛЛ преобладали лица мужского пола ($p=0,047$), моложе 60 лет ($p=0,023$), с легкими нарушениями соматического статуса по шкале ECOG (1-2 балла) ($p<0,001$), с наличием периферической и абдоминальной лимфаденопатии ($p<0,001$), спленомегалии ($p<0,001$), а также инфекционных осложнений ($p=0,029$) по сравнению с группой пациентов, имеющих индолентное течение заболевания (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика больных ХЛЛ в зависимости от варианта течения

Исследуемые параметры	Вариант течения		P
	индолентный (n=119)	прогрессирующий (n=56)	
Пол:			
мужской	58 (48,7)	37 (66,1)	0,047
женский	61 (51,3)	19 (33,9)	
Возраст:			
≤ 60 лет	32 (26,9)	27 (48,2)	0,023
> 60 лет	87 (73,1)	29 (51,8)	
Соматический статус по ECOG:			
0 баллов	98 (82,4)	25 (44,6)	< 0,001
1-2 балла	21 (17,6)	31 (55,4)	
Периферическая лимфаденопатия:			
есть	30 (25,2)	32 (57,1)	< 0,001
нет	89 (74,8)	24 (42,9)	
Абдоминальная лимфаденопатия:			
есть	14 (11,8)	21 (37,5)	< 0,001
нет	105 (88,2)	35 (62,5)	
Спленомегалия:			
есть	3 (2,5)	10 (17,9)	< 0,001
нет	116 (97,5)	46 (82,1)	
Инфекционные осложнения:			
есть	77 (64,7)	46 (82,1)	0,029
нет	42 (35,3)	10 (17,9)	

Для подтверждения прогностического значения клинико-гематологических и демографических параметров был проведен однофакторный анализ для выявления показателей, влияющих на длительность выживаемости,

свободной от лечения, и ОВ пациентов. Факторами, сокращающими длительность выживаемости, свободной от лечения, и ОВ явились возраст > 60 лет ($p=0,041$ и $p=0,026$, соответственно), мужской пол ($p=0,038$ и $p=0,012$, соответственно), поражение лимфатических узлов более 1 зоны ($p<0,001$ и $p=0,041$, соответственно), наличие спленомегалии ($p=0,014$ и $p=0,039$, соответственно), абсолютное число лимфоцитов в крови $> 15 \times 10^9/\text{л}$ ($p<0,001$ и $p=0,042$, соответственно), время удвоения лимфоцитов < 6 месяцев ($p<0,001$ и $p=0,012$, соответственно), соматический статус по шкале ECOG, равный 1-2 баллам ($p<0,001$ и $p=0,015$, соответственно). Оказалось, что выживаемость, свободная от лечения, и ОВ у больных ХЛЛ на ранней стадии заболевания не зависели от наличия сопутствующих заболеваний ($p<0,348$ и $p=0,610$, соответственно).

Таким образом, результаты исследования показали, что больные ХЛЛ на ранней стадии заболевания представляют собой гетерогенную группу, характеризующуюся различной скоростью прогрессии лейкоза и достоверно различающуюся по демографическим и клинико-гематологическим параметрам. У 32% больных наблюдается прогрессирование ХЛЛ в ближайшие 24 месяца от момента постановки диагноза. У 68% пациентов отмечается индолентное течение заболевания с отсутствием показаний для начала терапии в период, превышающий 24 месяца наблюдения. Установлены клинико-гематологические и демографические показатели, влияющие на прогноз ХЛЛ на ранней стадии заболевания. Предикторами более короткой выживаемости, свободной от лечения, и общей выживаемости, являются мужской пол, возраст > 60 лет, соматический статус по шкале ECOG ≥ 1 балла, поражение лимфатических узлов более 1 зоны, наличие спленомегалии, абсолютное число лимфоцитов в крови $> 15 \times 10^9/\text{л}$ в момент постановки диагноза, время удвоения лимфоцитов < 6 месяцев.

Список литературы

1. Волкова, М.А. От рентгенотерапии до кэмпаса / М.А. Волкова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2010. – Т. 3, №2. – С. 209-210.
2. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment / M. Hallek // Am. J. Hematol. – 2013. – Vol. 88, №9. – P. 803-816.
3. Delgado, J. New treatment options for chronic lymphocytic leukemia / J. Delgado, T. Baumann, R. Santacruz, E. Montserrat // Expert Opin. Pharmacother. – 2014. – Vol. 15, №6. – P. 823-832.
4. Montserrat, E. CLL therapy: the increasing importance of predictive markers / E. Montserrat // Oncology (Williston Park). – 2012. – Vol. 26, №11. – P. 1064-1066.
5. Molica S. Progress in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of the German CLL8 trial / S. Molica // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2011. – Vol. 11, №9. – P. 1333-1340.
6. Van Bockstaele, F. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review / F. Van Bockstaele, B. Verhasselt, J. Philippe // Blood Rev. – 2009. – Vol. 23, №1. – P. 25-47.
7. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of

treatment allocation / D. Oscier, R. Wade, Z. Davis [et al.] // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95, №10. – P. 1705-1712.

8. Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia / A.C. Oliveira, E. De la Banda, E. Domingo-Domenech [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. – 2011. – Vol. 52, № 3. – P. 429-435.

9. The utility of two prognostic models for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia patients: results of a comparative analysis / S. Molica, D. Giannarelli, M. Gentile [et al.] // *Leuk Res*. – 2013. – Vol. 37, №8. – P. 943-947.

10. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters / R. Letestu, V. Levy, V. Eclache [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, №22. – P. 4588-4590.

11. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 Guidelines / M. Hallek, B.D. Cheson, D. Catovsky [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, №12. – P. 5446-5456.

12. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J.L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero [et al.] // *Cancer*. – 1981. – Vol. 48, №1. – P. 198-206.

13. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia / V. Vroblova, L. Smolej, F. Vrbacky [et al.] // *Acta Medica*. – 2009. – Vol. 52, № 1. – P. 3-8.

ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ, КОРРЕЛИРУЮЩИЕ С МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Зотина Е.Н., Докшина И.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

SURVIVAL RATES OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA THAT CORRELATES WITH MOLECULAR-GENETIC FEATURES OF THE IMMUNE SYSTEM

E.L. Nazarova, V.I. Shardakov, V.T. Dem'janova, E.N. Zotina, I.A. Dokshina

Federal State Budget Institute of Science «Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

E-mail: nazarova@niigpk.ru; shardakov@niigpk.ru; demyanova@niigpk.ru; zotina@niigpk.ru; dokshina@niigpk.ru

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) характеризуется гетерогенным клиническим течением от индолентного до прогрессирующего. Довольно многочисленные клинико-лабораторные параметры прогнозирования течения ХЛЛ, предложенные к настоящему времени, к сожалению, не могут выступить в качестве независимых критериев прогноза. В данной работе представлены новые результаты молекулярно-генетических исследований, связанные с показателями выживаемости у больных ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, полиморфизм генов, показатели выживаемости, демографические характеристики

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a heterogeneous clinical course of indolent to progressive. Quite numerous clinical and laboratory parameters for predicting the course of CLL proposed to date, unfortunately, can not act as independent criteria of the forecast. This work presents new findings of molecular genetic studies associated with survival rates in patients with CLL.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, gene polymorphism, survival rates, demographic features

Введение. В настоящее время для прогнозирования течения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) используют предложенные К. Rai [1] и J. Binet [2] критерии стадирования заболевания, в которые заложены не только клинические признаки в виде оценки величины опухолевой массы (число лейкоцитов, лимфоцитов, размеры лимфатических узлов, печени и селезенки), а также наличие или отсутствие угнетения нормальных ростков кроветворения (анемия, тромбоцитопения). На основании вышеуказанных систем стадирования выделяют три варианта клинического течения ХЛЛ: низкий, промежуточный и высокий риск прогрессирования болезни, которым соответствует различная продолжительность жизни пациентов. К сожалению,

выделение стадий заболевания не учитывает скорость прогрессирования опухоли, в частности, наличие индолентной и прогрессирующей формы течения ХЛЛ [3, 4]. В настоящий момент выявлен ряд прогностических критериев, коррелирующих с эффективностью лечения и продолжительностью жизни больных ХЛЛ: время удвоения числа лимфоцитов, уровни лактатдегидрогеназы и β -2-микроглобулина в сыворотке крови, мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов (IgVH), аберрантный иммунофенотип опухолевых клеток, суррогатные маркеры мутационного статуса генов IgVH: экспрессия белка ZAP-70 и антигена CD38, а также наличие цитогенетических aberrаций [3, 5, 6]. Следует отметить, что вышеперечисленные факторы прогноза не всегда являются независимыми предикторами течения ХЛЛ, поскольку часть из них не стабильна и может меняться со временем, что не позволяет в полной мере использовать их на ранней стадии заболевания. Ряд критериев, например, мутационный статус генов IgVH, теряет свое значение при продвинутых стадиях болезни [3], поэтому перспективным считается поиск новых прогностических критериев. В настоящее время доказано, что клиническая гетерогенность ХЛЛ является отражением генетических и эпигенетических нарушений и может быть связана с однонуклеотидными полиморфизмами (single-nucleotide polymorphism - SNP) в генах, регулирующих дифференцировку лейкоцитов, осуществляющих контроль как за жизнью/смертью клеток, так и за межклеточными взаимодействиями [7].

Целью работы являлась оценка показателей общей выживаемости (ОВ) у больных ХЛЛ в зависимости от полиморфного статуса генов иммунного ответа.

Материал и методы. Исследования были проведены у 51 больного ХЛЛ в возрасте от 39 до 79 лет (медиана возраста - 61 год). Из них наблюдалось 18 женщин и 33 мужчины (соотношение 1:1,8). Контрольную группу лиц, не имевших ХЛЛ, составили 92 человека в возрасте от 24 до 88 лет (медиана возраста - 58 лет). Среди них: 38 женщин и 54 мужчины (соотношение 1:1,4). Биологическим материалом для исследования являлась ДНК, выделенная из мононуклеарных клеток венозной крови пациента. Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов в 20 полиморфных участках 13 генов иммунного ответа (толл-подобных рецепторов (TLR) TLR2 (rs5743708), TLR3 (rs3775291), TLR4 (rs4986790, rs4986791), TLR6 (rs5743810), TLR9 (rs5743836, rs352140), интерлейкинов (IL) IL1 β (rs2856841, rs1143623, rs1143634, rs16944), IL2 (rs2069762), IL6 (rs1800795), IL10 (rs1800871, rs1800896), IL17A (rs2275913), CD14 (rs34424920), фактора некроза опухоли TNF α (rs1800629), FCGR2A (rs1801274)) проводили с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», г. Москва), на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК технология», г. Москва) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле.

Нормальность распределения количественных показателей определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения выборки рассчитывали среднюю арифметическую (M), при отсутствии нормального распределения - медиану (Me), а также верхний и нижний квартили (Q1 и Q3). При статистическом анализе результатов исследования использовали методы сравнения выборок (U - критерий Манна-Уитни) и анализ выживаемости (метод Каплан-Майера, log-rank test), одно- и многофакторный анализы (модель пропорциональных рисков Кокса). Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для расчета результатов использовали пакеты программ MS Office Excel 2003 STATISTICA V.13.2. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Длительность наблюдения за пациентами варьировала от 1 до 175 мес. Медиана составила 26 мес. За период наблюдения умерло 10 больных (19,6%). Среди них в восьми случаях причиной смерти явилось прогрессирование, рецидив опухолевого процесса или его трансформация в синдром Рихтера; у одного пациента наблюдалось осложнение основного заболевания в виде развития хронической почечной недостаточности. Еще в одном наблюдении смерть была вызвана осложнением терапии - выраженной депрессией кроветворения.

Медиана ОВ у больных ХЛЛ составила 136 месяцев. Пятилетняя ОВ была достигнута у 46 пациентов (90,2%). При расчете выживаемости в зависимости от возраста все обследованные были разделены на две возрастные группы: в первую группу вошли 24 больных (47,1%) в возрасте до 60 лет (39-59 лет, Me - 54 года), вторую составили 27 пациентов (52,9%), чей возраст варьировал от 60 до 79 лет (Me - 66 лет). При сравнении величин ОВ в зависимости от возраста отмечено, что средняя продолжительность жизни в группах больных до 60 лет и >60 лет статистически значимо не отличалась (59,5 мес и 14 мес, соответственно, $p=0,0842$). Такая же закономерность прослеживалась относительно гендерных различий. Так, при сравнении значений ОВ у больных в зависимости от пола, было найдено, что продолжительность жизни у мужчин статистически значимо не отличалась от таковой у женщин ($p=0,0491$). Медиана ОВ у мужчин составила 51 мес (Q1-Q3: 11-68 мес), а у женщин - 16 мес (Q1 - Q3: 8-91 мес).

Учитывая отсутствие гендерной и возрастной составляющей ОВ при ХЛЛ, в многофакторном анализе на основе модели пропорциональных рисков Кокса, исследовали независимое прогностическое значение полиморфизмов генов иммунного ответа. Было найдено, что независимым фактором, ассоциированным с продолжительностью ОВ, являлись: мутационный статус полиморфных локусов генов TLR6 (Ser249Pro) ($p=0,0021$), IL1 β (T-31C) ($p=0,0268$) и (T-511C) ($p=0,0435$) и (C-3953T) ($p=0,0178$), IL6 (C-174G) ($p=0,0130$), IL10 (C-819T) ($p=0,0377$), IL17A (G-197A) ($p=0,0134$).

Обсуждение. В данной работе представлены результаты исследования одиночных полиморфизмов в группе генов иммунного ответа с целью идентификации генетической компоненты, связанной с продолжительностью общей выживаемости у больных ХЛЛ.

Нарушение взаимодействия между опухолевыми клетками при хроническом лимфолейкозе и клетками их микроокружения, а также несбалансированная экспрессия апоптотических регуляторных молекул в результате генетических и/или эпигенетических изменений, вносят вклад в развитие этого гемобластоза. Одной из генетических основ ХЛЛ может выступать наличие единичных нуклеотидных полиморфизмов в генах, регулирующих межклеточные взаимодействия или осуществляющих апоптотический и пролиферативный контроль над функциями иммунной системы, которые могут быть маркерами риска развития и прогноза ХЛЛ [7].

Проведенные ранее исследования [8] при различных типах неходжкинских лимфом (НХЛ) и ХЛЛ убедительно подтвердили гипотезу, что нарушение функционирования иммунной системы повышает риск развития хронических лимфопролиферативных заболеваний, и этот риск может быть обусловлен модификациями полиморфных генов, которые участвуют в контроле и регуляции иммунного ответа. Так, исследования показали, что однонуклеотидные полиморфизмы в ряде генов-кандидатов, в том числе TNF, LTA; нескольких генах интерлейкинов, в том числе, IL4, IL5, IL6 и IL10; и генах FCGR2A, TLR4 и CARD могут быть факторами риска развития НХЛ в целом или определенных подтипов НХЛ, и однозначно связаны с прогрессированием данных заболеваний [9-12]. Полиморфизм генов, кодирующих ключевые молекулы, которые принимают участие в развитии и прогрессировании лейкозного процесса, представляют собой основные факторы, усиливающие индивидуальные биологические различия, приводя к клинически неоднородным исходам патологического процесса [13].

Передача сигнала через В-клеточный рецептор, как представляется, является одним из основных факторов патогенеза хронического лимфолейкоза [14]. В этой связи интерес представляют и Toll-подобные рецепторы (TLRs), являющиеся связующим звеном между факторами врожденного и приобретенного иммунитета, которые стимулируют активацию антигенпредставляющих клеток [15]. Они проявляют свои функциональные и структурные особенности в зависимости от мутированного или немутированного статуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов, а также от различных типов строения В-клеточного рецептора при ХЛЛ [8, 14]. В дополнение к хорошо известной роли TLR в иммунном ответе, накопленные к настоящему времени данные подтверждают их участие в развитии гемобластозов и других злокачественных опухолей, в том числе лимфопролиферативных заболеваний, в частности, хронического лимфолейкоза [14], связывая это с наличием aberrантной передачи сигнала TLR. Известно, что активация TLR приводит к индукции синтеза множества провоспалительных цитокинов

(интерферонов, IL-1, IL-6 и TNF- α) и хемокинов [15], которые могут способствовать развитию опухоли путем поддержания процессов пролиферации и миграции злокачественных клеток и обеспечивая для них благоприятное микроокружение [16]. TLR6 вместе с TLR1 и TLR10 расположены в кластере генов протяженностью 57 кб на хромосоме 4p14. TLR6 и TLR1 являются важными элементами передачи сигнала TLR2. Эти рецепторы, которые связывают ди-ацил- и три-ацил-липопротеиды, соответственно, взаимодействуют с TLR2, создавая гетеродимер, способный распознавать широкий спектр лигандов [17]. Еще в 2007 г. J.R. Cerhan et al. [8] признали, что SNP в гене TLR6 связан с риском развития НХЛ, хотя даже сегодня мало данных о функциональных последствиях указанного полиморфизма. Результаты наших исследований также свидетельствуют о роли вариаций гена TLR6 при хроническом лимфолейкозе, оказывающих независимое влияние на продолжительность периода общей выживаемости у пациентов.

Цитокины являются ключевыми регуляторами функционирования иммунной системы. В микроокружении опухоли они влияют на выживание, пролиферацию, дифференцировку и перемещение как опухолевых, так и стромальных клеток, осуществляя взаимосвязь между лейкозными клетками и стромой, а также опосредуют взаимодействие опухоли с внеклеточным матриксом. Установлено, что нарушение регуляции цитокинов является фактором риска развития гемобластозов [18, 19]. SNP в генах, кодирующих цитокины, могут влиять на транскрипцию или трансляцию самих генов, а также на секрецию или функцию соответствующих белков [18, 20]. Эти функциональные варианты генов цитокинов могут принимать участие в патогенезе опухолевых заболеваний, способствуя злокачественной трансформации, пролиферации и эволюции злокачественных клонов. Найдены доказательства, указывающие, что совместное действие этих генов выступает в качестве первичных генетических событий или механизмов, изменяющих ответ опухолевых клеток на химиотерапевтические препараты. Поэтому функциональные генетические вариации в генах цитокинов считаются одним из ведущих механизмов патогенеза В-клеточных злокачественных заболеваний и исследование таких мутаций может оказаться полезным в качестве маркеров течения и исходов НХЛ [12, 13, 18, 20].

Ранее нами было показано, что доброкачественный характер течения ХЛЛ связан с присутствием мутантных аллелей генов TNF, TLR9 и TLR2, а также с низкой частотой выявления аллеля «дикого типа» гена IL6. Кроме того, обнаружение комбинации нормальных гомозигот генов TNF, TLR9 и TLR2 коррелировало с возможным развитием прогрессирующей формы заболевания [21]. В данном исследовании установлено, что мутационный статус генов IL1 β , IL6, IL10 и IL17 выступал в качестве независимого фактора, влияющего на продолжительность общей выживаемости больных ХЛЛ.

Интерлейкин-1 β первично синтезируется в качестве незрелого протеина с молекулярной массой 31 kDa, называемого про-IL-1 β , который оста-

ется в цитозоле до его превращения в зрелый 17,5 kDa белок путем протеолитического расщепления IL-1-конвертирующим ферментом (interleukin-1 converting enzyme - ICE). Небольшое количество про-IL-1 β выводится из клетки путем неизвестного механизма, и это содержание увеличивается при блокировании активности ICE. Интересно, что чрезмерная активность ICE усиливает Fas-опосредованный апоптоз. Ген, кодирующий IL-1 β , локализован на хромосоме 2q14.2 и содержит 7 экзонов. Наиболее изученными являются два полиморфных сайта: в области промотора (-511) и в области пятого экзона (+3953) гена IL1 β , регулируя продукцию IL-1 β [4].

Также среди хорошо изученных генов отмечен ген IL6. Он расположен на хромосоме 7p15-p21 и состоит из пяти экзонов и четырех интронов. Изменения в данном гене, в основном, ограничиваются областью промотора [4]. Исследования показали 2-кратное увеличение секреции IL-6 при носительстве мутантного аллеля G [18, 22]. Кроме того, было показано, что SNP в промоторе гена IL6 изменяет экспрессию IL-1 и TNF- α [4, 18]. Важность этого факта обусловлена тем, что прогрессирование ХЛЛ и его неблагоприятный исход часто ассоциированы с высоким уровнем IL-6. Результатом транскрипции гена является продукция цитокина IL-6, который представляет собой фосфорилированный гликопротеин, содержащий 185 аминокислот, и является плеiotропным цитокином, участвующим в различных физиологических и патофизиологических процессах, таких как воспаление, метаболизм костной ткани, синтез СРБ и канцерогенез [4].

Интерлейкин-10 представляет собой цитокин, секретируемый Th2, моноцитами, некоторыми подтипами дендритных клеток и стимулированных макрофагов, который обладает сильным противовоспалительным действием. Исследования показали, что IL-10 может оказывать регулирующее влияние на Th1, способствуя пролиферации В-клеток и продукции антител [12]. Ген, кодирующий IL-10, расположен на хромосоме 1 (1q31-1q32) [4, 13]. Промоторный регион гена IL10 также широко исследован. Он включает несколько функциональных SNP, влияющих на продукцию цитокина IL-10 и модулирующих характер течения заболевания [13, 18]. Интерлейкин-10 действует как аутокринный фактор роста, усиливая апоптоз за счет регуляции экспрессии Bcl-2, а также стимулируя пролиферацию и дифференцировку опухолевых В-клеток при В-клеточных злокачественных опухолях [13]. Однако нет единого мнения о генетическом контроле продукции IL-10, хотя не оспаривается тот факт, что данный цитокин является мощным ингибитором продукции TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 и интерферона- γ . Клинические исследования показывают, что повышение эндогенного уровня IL-10 может быть связано с развитием иммунологической толерантности организма и усилением риска развития отдельных форм НХЛ [12, 20]. Важно отметить, что поверхностный антиген CD5, который высоко экспрессирован на клетках ХЛЛ, регулирует уровень IL-10 конститутивным поддержанием активации факторов транскрипции STAT3 и NFAT2 [7].

Интерлейкин-17 является ключевым цитокином, отличающим субпопуляцию Т-лимфоцитов-хелперов - Th17. Также источниками IL-17 являются $\gamma\delta$ Т клетки, макрофаги и нейтрофилы. Рецептор IL17 (IL-17RA) широко распространен на гемопоэтических клетках и является мембранным гликопротеином I типа. Цитокин IL-17 играет важную роль в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета. Как было установлено ранее, промоторный полиморфизм гена IL17 способствует развитию аутоиммунных реакций, которые часто наблюдаются у больных ХЛЛ [23].

Следовательно, опубликованные в литературе и представленные в работе данные, наглядно свидетельствуют о том, что ХЛЛ является мультифакториальным лимфопролиферативным заболеванием, вызванным в том числе изменением профиля экспрессии генов иммунного ответа. Нарушение функционирования иммунной системы представляет собой основу лимфомогенеза, при котором особенности экспрессии ключевых цитокинов могут играть важную роль в патогенезе ХЛЛ. IL-1 β , IL-6, IL-10 и IL-17 являются иммунорегуляторными цитокинами, имеющими двойственное значение в онкогенезе, с одной стороны, за счет реализации своих иммуносупрессивных эффектов; с другой стороны, обладая антиангиогенными функциями, способностью стимуляции иммунной системы [12]. Однонуклеотидные замены в промоторных областях генов цитокинов могут влиять на их продукцию и играют важную роль в развитии, прогрессировании и исходах ХЛЛ.

Заключение. В последние годы важная роль в патогенезе ХЛЛ отводится нарушениям иммунного ответа и межклеточных взаимодействий. Одним из показателей эффективности терапии является оценка общей выживаемости, которая может зависеть от стадии заболевания, морфологических, иммунофенотипических и других биологических характеристик опухоли, а также демографических и общеклинических показателей. Важны не только проводимые программы лечения, но и идентификация полиморфных вариантов генов иммунного ответа пациента. В этой связи можно рекомендовать использовать оценку мутационного статуса данных генов в дебюте ХЛЛ для прогнозирования дальнейшего клинического течения лейкозного процесса, ответа на терапию и продолжительности выживаемости пациентов.

Список литературы

1. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia [Text] / K.R. Rai, A. Sawitsky, E.P. Cronkite [et al.] // Blood. - 1975. - Vol. 46, № 2. - P. 219-234.
2. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis [Text] / J.L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero [et al.] // Cancer. - 1981. - Vol. 48, № 1. - P. 198-206.
3. Зотина, Е.Н. Клинико-иммунологическая характеристика и факторы прогноза хронического лимфолейкоза в асимптоматической фазе [Текст]: Автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.21 / Зотина Е.Н.; Кировский НИИ гематологии и переливания крови. – Киров, 2015. - 21 с.
4. Hulkkonen, J. Inflammatory cytokines and cytokine gene polymorphisms in chronic

- lymphocytic leukemia, in primary Sjogren's syndrome and in healthy subjects [Text]: academic dissertation / Hulkkonen, J.; University of Tampere. - Tampere, Finland, 2002. - 81 p.
5. Хронический лимфолейкоз: лабораторная диагностика и критерии прогноза [Текст] / Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, Т.С. Ивановская [и др.] // Онкология. - 2014. - Т. 16, № 3 - С. 171-176.
 6. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome [Text] / A. Martinez-Trillos, M. Pinyo, A. Navarro [et al.] // Blood. - 2014.- Vol. 123, № 24. - P. 3790-3796.
 7. Żoźnierczyk, J.D. Polymorphisms of chosen genes in chronic lymphocytic leukemia; their relationship with the disease course and prognosis [Text] / J.D. Żoźnierczyk, Z.M. Kiliańska // IJBPR. - 2015. - Vol. 6, № 6. - P. 427-443.
 8. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma [Text] / J.R. Cerhan, S.M. Ansell, Z.S. Fredericksen [et al.] // Blood. - 2007. - Vol. 110, № 13. - P. 4455-4463.
 9. Tumour necrosis factor polymorphisms and susceptibility to follicular lymphoma [Text] / J. Fitzgibbon, D. Grenzeliass, J. Matthews [et al.] // Br J Haematol. - 1999. - Vol. 107, № 2. - P. 388-391.
 10. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium [Text] / N. Rothman, C.F. Skibola, S.S. Wang [et al.] // Lancet Oncol. - 2006. - Vol. 7, № 1. - P. 27-38.
 11. Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma [Text] / S.S. Wang, J.R. Cerhan, P. Hartge [et al.] // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66, № 19. - P. 9771-9780.
 12. Association of the four common polymorphisms in interleukin-10 (rs1800890, rs1800896, rs1800871, and rs1800872) with non-Hodgkin's lymphoma risk: a meta-analysis [Text] / Z.-M. Dai, A.-L. He, W.- G. Zhang [et al.] // Int J Clin Exp Med - 2014. - Vol. 7, № 12. - P. 4720-4733.
 13. Interleukin 10 gene promoter polymorphism and risk of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) [Text] / R.M. Talaat, A.M. Abdel-Aziz, E.A. El-Maadawy [et al.] // EJMHG. - 2014. - Vol. 15, № 1. - P. 7-13.
 14. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients [Text] / E. Arvaniti, S. Ntoufa, N. Papakonstantinou [et al.] // Haematologica. - 2011. - Vol. 96, № 11. - P. 1644-1652.
 15. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: double-edged sword [Text] / S. Harsini, M. Beigy, M. Akhavan-Sabbagh [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. - 2014. - Vol. 89, № 2. - P. 262-283.
 16. The role of Toll-like receptors in hematopoietic malignancies / D.A. Monlish, S.T. Bhatt, L.G. Schuettpelez // Frontiers in Immunology. - 2016. - Vol. 7, № 9. - Article 390. eCollection 2016. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00390/full>.
 17. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma [Text] / M.P. Purdue, Q. Lan, S.S. Wang [et al.] // Carcinogenesis. - 2009. - Vol. 30, № 2. - P. 275 - 281.
 18. A study of inflammatory cytokine gene polymorphisms in B-cell diseases [Text]: PhD thesis / Nilsen K.R.; Aalborg Universitet. - Aalborg, Denmark, 2015. - 84 p.
 19. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival [Text] / J.R. Cerhan, S. Wang, M.J. Maurer [et al.] // Blood. - 2007. - Vol. 109, № 12. - P. 5439-5446.
 20. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation [Text] / M.-T. Lin, B. Storer, P. J. Martin [et al.]

// N Engl J Med. - 2003. - Vol. 349, № 23. - P. 2201-2210.

21. Модификации генов иммунного ответа при различных типах течения хронического лимфолейкоза [Текст] / Е.Л. Назарова, В.И. Шардаков, В.Т. Демьянова [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. - 2015. - Т. XXII, № 1. - С. 21-24.

22. Полиморфизм гена IL6 у больных В-клеточными опухолями лимфатической системы [Текст] / Е.Л. Назарова, В.Т. Демьянова, В.И. Шардаков [и др.] // Цитокины и воспаление. - 2014. - Т. 13, № 1. - С. 112-113.

23. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT [Text] / J.L. Espinoza, A. Takami, M. Onizuka [et al.] // Bone Marrow Transplant. - 2011. - Vol. 46, № 11. - P. 1455-1463.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫХ АНЕМИЙ

Никитин Е. Н., Казарин Д. Д.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Ижевск, Россия
(426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281)*

MODERN APPROACHES TO THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF IRON DEFICIENCY ANEMIA

Nititin E. N., Kazarin D. D.

*Federal state budgetary educational institution of higher professional education
«Izhevsk State Medical Academy», Izhevsk, Russia
(426034, Izhevsk, Communards str., 281)
E-mail: nikitinen@list.ru, leon9306@mail.ru*

Железодефицитная анемия является, несмотря на достигнутые успехи в ее диагностике и лечении, актуальной проблемой медицины. В работе представлены современные данные о эпидемиологии, классификации, диагностике, лечении и профилактике железодефицитной анемии.

Ключевые слова: *железодефицитная анемия (ЖДА), дефицит железа, гепцидин, ферропрепараты*

In spite the successes achieved in its diagnosis and treatment, iron deficiency anemia is actual medical problem. In the article presents modern facts on epidemiology, classification, diagnosis, treatment and prevention of iron deficiency anemia.

Keywords: *iron deficiency anemia (IDA), iron deficiency, hepcidin, iron-containing preparations*

Биологическая ценность железа определяется многогранностью его функций и незаменимостью другими металлами в сложных биохимических процессах, таких как дыхание, кроветворение, иммунобиологические и окислительно-восстановительные реакции, системный и клеточный аэробный метаболизм [1]. Адекватное его содержание в организме способствует полноценному функционированию факторов неспецифической защиты, клеточного и местного иммунитета [2]. Железо необходимо для полноценного фагоцитоза, синтеза лизоцима, интерферона, обеспечивает высокую активность естественных киллеров и бактерицидной способности сыворотки [3,4,5].

Недостаточное поступление железа в костный мозг обуславливает нарушение эритропоэза. Дефицит железа приводит к гемической и тканевой гипоксии, так как снижается способность эритроцитов к связыванию и транспорту кислорода. Гипоксия приводит к нарушению метаболизма и развитию ацидоза [1,49]. Уменьшение синтеза миоглобина приводит к мышечной гипотонии и дистрофии. Истощение клеточных железосодержащих и железозависимых ферментов, участвующих в основных видах обмена [9,11],

приводит к нарушению трофики клеток и тканей, их дегенеративным изменениям. При истощении клеточного железа во внутренний обмен вступает железо запасов.

Существует множество определений железодефицитной анемии (ЖДА):

- железодефицитная анемия - клинико-гематологический синдром, характеризующийся нарушением синтеза гемоглобина в результате дефицита железа, развивающегося на фоне различных патологических (физиологических) процессов, и проявляющийся признаками анемии и сидеропении [5], а также развитием трофических нарушений в органах и тканях [5,6].

- железодефицитная анемия полиэтиологичное заболевание, возникновение которого связано с дефицитом железа в организме из-за нарушения его поступления, усвоения или повышенных потерь, характеризующееся микроцитозом и гипохромной анемией [7].

Пристальный интерес к ЖДА вызван тем, что несмотря на достигнутые успехи по выяснению этиологии и патогенеза, число людей, страдающих этим заболеванием не снижается, но и продолжает возрастать, свидетельствуя о целом ряде нерешенных вопросов [7]. Более 1,5 миллиарда человек в мире страдают анемией [8], причем ЖДА составляет 70–90% всех случаев анемий [9]. ЖДА наблюдается не менее чем у 10–15% взрослого населения России, достигая в отдельных регионах 25–30% среди женщин детородного возраста [10].

Исследование национальной базы данных первичной медицинской помощи Италии, Бельгии, Германии и Испании показало, что ежегодные показатели заболеваемости ЖДА колеблются от 7,2 до 13,96 на 1000 человек. Более высокие показатели среди женщин, младших и возрастных группах, пациентов с желудочно-кишечными болезнями, беременных женщин и женщин, страдающих менометроррагиями и людей, злоупотребляющих НПВС (аспирином) и/или кислотопонижающими средствами [2].

В настоящее время не отмечается тенденции к уменьшению этих показателей заболеваемости ЖДА, что определяет данную патологию как одну из ведущих медико-социальных проблем [3,28].

Специалисты выделяют несколько классификаций ЖДА:

1. ЖДА постгеморрагические. Эту группу составляют анемии, развивающиеся на почве повторных кровопотерь: мено-, метроррагии, эпистаксис, гематурия и т.д [11].

2. ЖДА беременных [12].

3. Основными осложнениями беременности при ЖДА являются: угроза прерывания беременности (20–42%); гестоз (40%); артериальная гипотония (40%); преждевременная отслойка плаценты (25–35%); задержка роста плода (25%); преждевременные роды (11–42%). Роды часто осложняются кровотечениями. В послеродовом периоде могут возникать различные воспалительные осложнения (12%) [51].

4. ЖДА, связанные с патологией ЖКТ. К ним относятся анемии, возникающие после гастрэктомии, обширных резекций тонкой кишки, при различных энтеропатиях. По своей сути это ЖДА, обусловленные грубым, тяжелым нарушением функции всасывания железа в проксимальном отделе двенадцатиперстной кишки. Важно подчеркнуть, что при поражениях ЖКТ, являющихся причиной развития ЖДА, как правило, наблюдается также нарушение всасывания витамина В12, фолиевой кислоты и микроэлементов, которые стимулируют процессы нормального созревания эритроцитов в костном мозге [13].

5. ЖДА вторичные, возникающие при инфекционных, воспалительных или опухолевых болезнях. Анемии в этих случаях развиваются вследствие больших потерь железа при гибели клеток опухолей, распаде тканей, микро- и даже макрогеморрагиях, повышении потребности в железе в очагах воспаления [14]. Анемия при внебольничных пневмониях связана с перераспределением железа в макрофагах и развитием гемосидеремии [19].

6. Эссенциальная (идиопатическая) ЖДА, при которой самый тщательный анамнестический и лабораторный поиск не выявляет общеизвестные причины возникновения дефицита железа. У большинства больных имеет место особая форма нарушения всасывания железа [2].

7. Ювенильная ЖДА - анемия, развивающаяся у молодых девушек (и чрезвычайно редко - у юношей). Данная форма железодефицитного малокровия связана с генетическими или фенотипическими дисгормональными явлениями [8].

8. ЖДА сложного генеза. В эту группу входят анемии алиментарные.

9. По степени тяжести (в зависимости от уровня гемоглобина) — тяжелая анемия (при уровне Hb менее 70 г/л), средняя (Hb 70-100 г/л) и умеренная (Hb >100 г/л) [14].

10. По стадиям — прелатентный дефицит железа, стадия латентного дефицита железа и собственно ЖДА [15].

11. По степени тяжести, согласно классификации ВОЗ: тяжелая анемия (при уровне Hb менее 79 г/л), средняя (Hb 80-109 г/л) и легкая (Hb до 110 г/л) [16]

В российской практике объем исследований при подозрении на железодефицитную анемию закреплен «Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению железодефицитной анемии» [7].

В соответствии с ним рекомендовано ориентироваться на следующие показатели:

1. Снижение уровня гемоглобина ниже 130 г/л для мужчин и ниже 120 г/л для небеременных женщин [16].

2. Уровень эритроцитов, как правило, снижен, но возможны случаи ЖДА с нормальным уровнем эритроцитов, но сниженным гемоглобином. Гипохромные анулоциты, склонность к микроцитозу, анизо- и пойкилоцитозу (неодинаковая величина, разные формы). Снижается среднее содержа-

ние гемоглобина в эритроците. Осмотическая резистентность эритроцитов нормальная или несколько повышена.

3. Снижение уровня сывороточного железа (гипоферремия).

4. Повышение общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС). Вычитая из ОЖСС уровень сывороточного железа, определяют латентную железосвязывающую способность сыворотки (норма 28,8-50,4 мкмоль/л), при дефиците железа она повышена [7].

5. Снижение насыщения трансферрина железом. Насыщение трансферрина железом может снижаться при воспалении, инфекции, злокачественных новообразованиях, болезнях печени, нефротическом синдроме, а увеличиваться при беременности, применении оральных контрацептивов.

6. Гематокрит используют для оценки выраженности анемии, при которой, как правило, отмечается его снижение.

7. Уровень ретикулоцитов чаще нормальный. Небольшое повышение происходит при значительной кровопотере, а также при лечении препаратами железа.

8. Уменьшение запасного фонда железа (снижение ферритина сыворотки).

9. Нередко тенденция к лейкопении, количество тромбоцитов чаще нормальное, при более выраженной кровопотере возможен тромбоцитоз.

Наиболее чувствительным и специфичным лабораторным признаком истинного дефицита железа в организме, в т. ч. снижения его депонирования в различных внутренних органах, при ЖДА является уменьшение концентрации ферритина <15–20 мкг/л [9]. Уровень ферритина — стандарт для оценки количества железа, запасенного в организме: он прямо пропорционален накоплению железа в макрофагах и гепатоцитах, если при этом нет инфекции или воспалительного процесса. Его снижение имеет 100% специфичность в отношении выявления железодефицитных состояний. Концентрация ферритина может увеличиваться при АХЗ, связанных с инфекционным процессом, воспалением и злокачественным заболеванием [9].

Сегодня продолжают поиски универсального критерия дефицита железа – единого параметра, который сможет дать однозначный ответ относительно наличия или отсутствия дефицита железа в организме. Наиболее перспективные с этой точки зрения параметры – уровень растворимых трансферриновых рецепторов и ретикулярного гемоглобина, который не подвержен колебаниям под воздействием воспаления [17; 18].

В последние годы появились публикации о клинической роли медиатора воспаления и ключевого регулятора обмена железа гепцидина в развитии анемии у беременных, при ревматоидном артрите и ряде других воспалительных заболеваний [19]. Продукция гепцидина в печени зависит от запасов железа в организме, активности эндогенного ЭПО и активности воспаления. Регуляция обмена железа связана с печенью и ее эндокринной функцией. Главным регулятором метаболизма железа в организме служит

гормон гепатоцитов гепцидин. Гепцидин синтезируется в печени, его продукция усиливается цитокинами ИЛ 1, 6 и 8 при воспалении, острофазном ответе и при перегрузке железом. Мишень гепцидина – белок ферропортин, экскретирующий железо из клеток, которые его накапливают [20]. При недостатке железа уровень гепцидина должен снижаться для выхода железа из депо в циркуляцию через ферропортин, являющийся молекулярной мишенью гепцидина и экспрессирующийся макрофагами, гепатоцитами, энтероцитами [21].

Производство гепцидина в печени регулируется тремя главными факторами:

- запасами железа (изменения содержания в циркуляции связанного с трансферрином железа воспринимаются гепатоцитами, которые усиливают продукцию гепцидина в ответ на повышение уровня железа или снижают ее, реагируя на уменьшение количества циркулирующего железа)[2];
- эритропоэтической активностью (выделяются факторы, которые угнетают синтез гепцидина, что ведет к увеличению количества доступного для эритрона железа)[2,34];
- воспалением (воспалительные стимулы через повышение уровня ИЛ6 запускают продукцию гепцидина [22,19].

Регуляция гепцидина обеспечивает необходимую степень проявления его основных биологических эффектов, к которым относятся угнетение всасывания в кишечнике и мобилизации из депо железа, увеличение его депонирования в макрофагах). Низкий уровень гепцидина может выявить ЖДА на раннем этапе развития, пока еще не происходит изменений других показателей обмена железа — ферритина и трансферрина [23]. Гепцидин является многообещающим диагностическим критерием состояния обмена железа, особенно при ЖДА, поскольку служит дифференциальным признаком ЖДА и анемии хронических заболеваний, а также помогает осуществить контроль лечения препаратами железа [24]. Так, сочетание клинических, лабораторных данных и уровня гепцидина в пределах 15-30 нг/мл характерно именно для ЖДА [25]

Клиническими проявлениями ЖДА являются два важнейших синдрома - анемический и сидеропенический [6,26,49].

Анемический синдром (обусловлен тканевой гипоксией, его проявления универсальны для всех видов анемий): слабость и/или быстрая утомляемость; бледность кожи и слизистых; головная боль и/или пульсация в висках; головокружение, обмороки; одышка и сердцебиение при привычной физической нагрузке; усиление ангинозных болей при ишемической болезни сердца; снижение толерантности к физической нагрузке; появление резистентности к проводимой терапии вазодилататорами при ишемической болезни сердца. [27]

Сидеропенический синдром [7] (обусловлен тканевым дефицитом Fe и свойствен только ЖДА): сухость кожи, трещины на поверхности кожи

рук и ног, в углах рта (ангулярный стоматит); глоссит, сопровождающийся атрофией сосочков, болезненностью и покраснением языка; ломкость, истончение, расслоение ногтей, ногти ложкообразной формы (койлонихия) [2] выпадение волос и раннее их поседение; извращение вкуса (рiса chlorotica), пациенты едят мел, уголь, глину, песок и/или сырые продукты: крупы, фарш, тесто; пристрастие к необычным запахам: керосина, мазута, бензина, ацетона, выхлопных газов машин, которые полностью проходят на фоне приема препаратов Fe; дисфагия [26].

Отметим также, что одним из проявлений данного синдрома являются с точки зрения современного подхода атрофические изменения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта — это проявляется сухостью слизистой оболочки пищевода и затруднениями, а иногда болями при глотании пищи, особенно сухой (сидеропеническая дисфагия или симптом Пламмера-Винсона) [28]; развитием атрофического гастрита и энтерита [29].

Лечение больных ЖДА должно быть направлено на возможное устранение основной причины, вызвавшей развитие анемии, а также на скорейшее восстановление содержания железа в организме. При этом следует придерживаться следующих основных принципов лечения ЖДА [8]:

- 1) возместить дефицит железа только с помощью диетотерапии, без препаратов железа невозможно;
- 2) терапия ЖДА должна проводиться преимущественно пероральными препаратами железа;
- 3) после нормализации уровня Hb терапия ЖДА должна продолжаться еще не менее 4–8 нед. с целью восстановления запасов железа в организме.

Все пероральные препараты железа (ПЖ) принципиально можно разделить на препараты двухвалентного и трехвалентного железа [30]. Многие годы в лечении ЖДА у детей и взрослых применяли солевые препараты железа. Препарат сульфата железа даже был назван «золотым стандартом» терапии, поскольку обладает самой высокой всасываемостью. Поэтому не случайно, что большинство солевых препаратов железа представлено именно этим соединением. Затем по мере уменьшения всасываемости следуют глюконат, хлорид и fumarат железа. Препараты железа (III) на основе ГПК обладают следующими основными свойствами и преимуществами: высокой эффективностью; высокой безопасностью, отсутствием риска передозировки, интоксикации и отравлений; отсутствием потемнения десен и эмали зубов; приятным вкусом; отличной переносимостью, определяющей высокую комплаентность; отсутствием взаимодействия с другими лекарственными препаратами и пищей; наличием антиоксидантных свойств [30,50].

В настоящее время при терапии ЖДА перспективным представляется пероральное применение комбинированных препаратов (содержащих как соли железа, так и другие компоненты), ведущим из которых является Ферро-Фольгамма [49].

Ферро–Фольгамма (Вёрваг Фарма, Германия) – мультифакторный гемопозитик, включающий все необходимые компоненты (1 капсула содержит 112,6 мг железа сульфата (эквивалентно 37 мг иона железа), 5 мг фолиевой кислоты, 0,010 мг цианокобаламина), обеспечивающие стимуляцию структурного синтеза Hb и повышающие репродукцию эритроцитов красным ростком костного мозга. Также в состав препарата входит аскорбиновая кислота. Универсальность препарата связана с его избирательно–стимулирующим действием на синтез железосодержащей и белковой частей гемоглобина. Сульфат железа обладает высоким коэффициентом всасывания в ЖКТ и практически не образует в нем малодоступных сложных соединений. Абсорбционный коэффициент в значительной степени усилен присутствием в препарате аскорбиновой кислоты [32].

Критерии эффективности терапии препаратами железа [33,7]:

1. Положительная клиническая картина.
2. Повышение уровня ретикулоцитов до 30-50% на 5-10 день.
3. Повышение гемоглобина (обычно начинается через 2-3 недели).
4. Улучшение качественного состава эритроцитов.
5. Регрессия эпителиальных изменений.

Об эффективности терапии ЖДА можно судить уже через 7–10 дней по увеличению ретикулоцитов в 2 раза по сравнению с исходным количеством (так называемый ретикулоцитарный криз). Также оценивается прирост гемоглобина, который должен составлять 10 г/л и более в неделю.

Профилактика ЖДА должна проводиться при наличии скрытых признаков дефицита Fe либо факторов риска для ее развития. Определение Hb, сывороточного Fe должно проводиться не реже одного раза в год, а при наличии клинических проявлений по мере необходимости у следующих категорий пациентов [34]:

- доноров (особенно у женщин), постоянно сдающих кровь;
- беременных, особенно с частыми повторными беременностями на фоне ЖДА;
- женщин с длительными (более 5 дней) и обильными кровотечениями;
- недоношенных детей, детей, рожденных от многоплодной беременности;
- девушек в период полового созревания, при быстром росте, усиленных занятиях спортом (нарастающая мышечная масса поглощает много Fe), при ограничении мясных продуктов в питании;
- при постоянной и трудно устранимой кровопотере (желудочных, кишечных, носовых, маточных и геморроидальных кровотечениях);
- больных, длительно принимающих нестероидные противовоспалительные препараты;
- лиц с низким материальным уровнем.

Кроме того, если распространенность ЖДА в стране или регионе пре-

вышает 40%, эксперты ВОЗ рекомендуют проведение фортификации, которая предусматривает обогащение железом наиболее употребляемых населением продуктов. Обычно в качестве таких продуктов выбирают хлеб или макаронные изделия. Важно, чтобы доля населения, употребляющего этот продукт, составляла не менее 65–95% [35]. Фортификация затруднена из-за отсутствия идеального пищевого продукта, который хорошо бы соединялся с железом, а также проблем с его всасываемостью. Эффективность фортификации составляет около 50% среди охваченного населения. Более эффективной считается профилактика ЖДА у населения, представляющего группы риска развития анемии. Этот вид профилактики получил название саплиментации и подразумевает добавку веществ (железа, йода и др.) извне [36]. Наиболее показательным примером саплиментации является применение препаратов железа у беременных женщин для профилактики ЖДА. Согласно рекомендациям ВОЗ препарат железа в дозе 60 мг в сутки применяют во II и III триместрах беременности и в течение 3 мес лактации [7].

Диагностические критерии АХЗ: клинические признаки (зависят от заболевания: воспалительное, опухолевое или инфекционное); патология (гипопролиферативная анемия, нарушение выделения железа из клеток системы мононуклеарных фагоцитов для синтеза Hb, срок жизни эритроцитов снижен) [43]; данные лабораторных исследований (лейкоциты и тромбоциты: изменения зависят от заболевания, при котором наблюдается анемия; эритроциты: уровень Hb снижен — чаще анемия от легкой (Hb 95 г/л) до умеренной (Hb 80 г/л) степени тяжести, при этом Hb редко падает ниже 70 г/л [12]; Ht снижен; нормоцитарная/нормохромная анемия; микроцитарная гипохромная анемия; количество ретикулоцитов в крови в норме или немного повышено; биохимический анализ крови: уровень ЖС нормальный или умеренно снижен; ОЖСС в норме или снижена; снижен или нормальный уровень трансферрина; уровень ферритина сыворотки в норме или повышен; уровень цитокинов повышен; красный костный мозг: содержание гемосидерина в норме или повышено, количество сидеробластов снижено); лечение: отсутствует эффект лечения препаратами железа [39].

Если при эффективном лечении основного заболевания не удастся устранить анемию, используют дополнительные методы [45].

В качестве дополнительных методов лечения достаточно эффективно переливание компонентов крови, особенно показанное у пациентов с жизнеугрожающей анемией (Hb < 65 г/л). Они также могут применяться у больных с выраженной (Hb < 80 г/л) или осложненной кровотечением АХЗ [13]. Однако крайне сложно определить влияние трансфузий на результат лечения у больных АХЗ, а также на течение основного заболевания [46].

Роль препаратов железа при АХЗ достаточно неоднозначна. Имеются данные, о том, что избыточное количество железа приводит к формированию высокотоксичных гидроксид-радикалов через каталитическое действие металла. Есть указания на то, что терапия железом дает умеренный

иммуносупрессивный эффект [14]. При этом железо абсолютно необходимо для основных процессов клеточного метаболизма и обязательно должно включаться в терапию АХЗ с признаками дефицита железа [47]. Внутривенное железо должно назначаться больным, у которых отсутствует ответ на ЭСА и подозревается дефицит железа. Характерно, что железо быстрее утилизируется клетками эритрона, чем микроорганизмами при хронических воспалительных заболеваниях; Hb повышается без роста числа инфекционных осложнений [47,48].

У больных с АХЗ обоснованно применение агентов, усиливающих эритропоэз — рекомбинантного ЭПО. Патогенетический эффект ЭПО заключается в противодействии антипролиферативному влиянию цитокинов, стимуляции захвата железа и синтеза гема в эритроидных предшественниках. Синтетический ЭПО является основным средством, применяемым для лечения в наши дни. Его основная задача — заменить эндогенный ЭПО, который вырабатывается в недостаточном количестве у людей с АХЗ [36].

Список литературы

12. Шиффман, Ф. Дж. Патология физиологии крови. Пер. с англ.— М.-СПб.:Издательство БИНОМ- Невский Диалект, 2012.- 448 с, с ил.
13. Iron Deficiency Anemia. James L Harper, MD, Marcel E Conrad, MD. 2016/<http://emedicine.medscape.com/article/202333-overview#a5> (дата обращения 14.12.2016).
14. Бабанов, С.А. Клиническая фармакология современных препаратов железа и их место в терапии железодефицитных анемий/С.А.Бабанов, И.А.Агаркова // РМЖ. 2012. №20. С. 990.
15. Гематология: руководство для врачей /под ред. Н.Н. Мамаева. – СПб.: Спец.Лит, 2011.- 543с, с ил.
16. Тихомиров, А. Л. Железодефицитная анемия: актуальная проблема, адекватное лечение/А.Л.Тихомиров, С.И.Сарсания, А.А.Кочарян // Гинекология. Патология беременности.- 2010.- Т. 8; № 5-6.- С. 44-47.
17. Дворецкий, Л.И. Лечение железодефицитной анемии/Л.И.Дворецкий // РМЖ. 1998. №20. С. 3
18. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению железодефицитной анемии/ А.Г. Румянцев, А.А.Масчан, В.М.Чернов, И.С.Тарасова.- М., 2015.- 43 с.
19. Effect of daily iron supplementation on health in children aged 4–23 months: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials/ Dr Sant-Rayn Pasricha, PhD, Emily Hayes, MBBS, Kongolo Kalumba, FRACP, Prof Beverley-Ann Biggs, PhD// The Lancet. - August 2013.-Vol. 1, №2.- e77–e86.
20. Струтынский, А.В. Диагностика и лечение железодефицитных анемий/А.В. 9. Струтынский // РМЖ.- 2014.- №11.- С. 839.
21. Цветкова, О.А. Медико-социальные аспекты железодефицитной анемии/ О.А.Цветкова // Русский медицинский журнал.- 2009.- № 5.- С. 387–391.
22. Железодефицитная анемия/ Справочник поликлинического врача. -2014.- 11: 5.
23. Савченко, Т.Н. Железодефицитная анемия как фактор риска угрозы прерывания беременности/Т.Н.Савченко, М.И.Агаева, И.А.Дергачева // РМЖ. 2014. №1. С. 46.
24. Ройтберг, Г.Е. Внутренние болезни. Лабораторная и инструментальная диагностика/Г.Е.Ройтберг, А.В.Струтынский.- М.: МЕДпресс-информ 2013, 816 с.
25. Рукавицын, О.А. Анемия хронических заболеваний: отдельные аспекты патогене-

- неза и пути коррекции//Онкогематология. 2016. №1. С. 37-46.
26. Струтынский, А.В. Железодефицитные анемии. Диагностика и лечение//Трудный пациент. 2013. №12, т. 11. С 38-43
27. WHO/UNICEF/UNU. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers. Geneva, World Health Organization, 2011
28. Балашова, Е.Л. Современные подходы к диагностике железодефицитной анемии у детей/Е.Л.Балашова, Л.И.Мазур// Российский вестник перинатологии и педиатрии. -2015.- 60(4):31-36.
29. Baker, R.D. The Committee on Nutrition. Diagnosis and Prevention of Iron Deficiency and Iron-Deficiency Anemia in Infants and Young Children (0–3 Years of Age)/ R.D. Baker, F.R.Greer// Pediatrics.- 2010.- 126: 1040–1050.
30. Содержание гепцидина у больных внебольничной пневмонией, осложненной анемией/ Е.Н.Никитин, Ю.Е.Никитин, А.Е.Шкляев, О.В. Александрова // Пульмонология.- 2014.- (2):5-9.
31. Тихомиров, А. Л. Некоторые аспекты диагностики и лечения железодефицитных состояний в практической деятельности на современном этапе/А.Л. 20. Тихомиров, С. И. Сарсания, Е. В. Ночевкин //Трудный пациент. – 2011. – Т. 9, No11. – С. 26-38.
32. Fleming, R. E. Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin/R. E. Fleming// J. Mol. Med.- 2008.- 86 (5): 491–494.
33. Fleming, R.E., Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic diseases/ R. E. Fleming, Sly W.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, N 15. – P. 8160–8162.
34. Ботвиньева, В.В. Перспективы диагностики и лечения различных видов анемии у детей/ В.В. Ботвиньева, О.Б. Гордеева, Л.С. Намазова-Баранова// Педиатрическая фармакология.- 2012.- 9 (5): 35–40
35. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. Domenico Girelli, Elizabeta Nemeth and Dorine W. Swinkels. Blood 2016 127:2809-2813; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-63911>
36. How I treat anemia in pregnancy: iron, cobalamin, and folate. Maureen M. Achebe and Anat Gafter-Gvili. Blood 2017 129:940-949; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-672246>
37. Сельчук В.Ю., Чистяков С.С., Толокнов Б.О., Манзюк Л.В., Никулин М.П., Юрьева Т.В., Кононец П.В., Титова Г.В. Железодефицитная анемия: современное состояние проблемы // РМЖ. 2012. №1. С. 1
38. Шевченко Ю.Л., Мельниченко В.Я., Федоренко Д.А. Анемический синдром в клинической практике: принципы диагностики. Архивъ внутренней медицины. 2012;(1):59-63.
39. Alan E. Lichtin, MD, Cleveland Clinic; Cleveland Clinic Lerner College of Medicine/ Iron deficite anemia/<http://www.merckmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/anemias-caused-by-deficient-erythropoiesis/iron-deficiency-anemia>
40. Воробьев С.А. Клинические и морфофункциональные особенности хронического гастрита, ассоциированного с железодефицитной и В12-дефицитной анемией; Дисс. канд. мед. наук. Тверь. - 2006. - 213 с.
41. Верткин, А. Л., Городецкий В.В., Годулян О.В. Сравнительная эффективность и переносимость различных железосодержащих препаратов у больных железодефицитной анемией // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12, № 5. - С. 309-315.
42. Тарасова И.С., Пудрикова К.А., Чернов В.А. Оптимизация лечения железодефицитной анемии у детей и подростков //Поликлиника 2014 № 2. С 56-60
43. Косарев В.В., Бабанов С.А. Клиническая фармакология и рациональная фармакотерапия. М.: Инфра–М, 2012. 236 с.
44. Раисова А.М., Хан О.Р. Клинический протокол диагностики и лечения железде-

фицитная анемия МЗ Республики Казахстан 2013 г. 17 с.

45. Трухан Д.И., Тарасова Л.В. Железодефицитная анемия: актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики. Гинекология. 2013; 05: 95-99

46. Ершова, А.К. Этиология, патогенез и лечение железодефицитной анемии. Рус. мед. журн. 2011; 12: 790–3.

47. Тарасова, И.С. Железодефицитная анемия у детей и подростков // ВСП. 2011. №2 С.40-48.

48. Андреевичев Н. А., Балеева Л. В. Анемия хронических заболеваний // Российский медицинский журнал. 2014. №2. С. 50-55

49. Bauer J.H., Reams G.P. The angiotensin II type 1 receptor antagonists. A new class of antihypertensive drugs. Arch. Intern. Med. 1995; 155(13): 1361—8.

50. Чазова, И.Е. Прямой ингибитор ренина алискирен: новые возможности защиты почек при артериальной гипертензии/И.Е.Чазова, В.В.Фомин, Е.М.Пальцева //Клиническая нефрология. -2009.-№ 1.- 44—9.

51. Демидова, А.В. Анемии/А.В.Демидова. -М.: МЕДпресс-информ, 2006. - 64 с.

52. Arezes, J. Hepsidin and iron disorders: new biology and clinical approaches/ J.Arezes, E.Nemeth// Int. J. Lab. Hematol.- 2015.- Vol.37 Suppl. 1:92–8.

53. Баранов, А.А. Стандарты ведения больных/А.А.Баранов// Клинические рекомендации. Вып.2. -М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.- 1376 с.

54. Ковалева, Л.Г. Анемия у пожилых/Л.Г.Ковалева// Врач. 2005.- 1: 15—9.

55. Чучалин, А.Г.. Российский терапевтический справочник/Под ред.А.Г.Чучалина.- М.:ГЭОТАР-Медиа; 2008, 974 с.

56. Iron deficiency anaemia/ Anthony Lopez, MD, Prof Patrice Cacoub, MD, Prof Iain C Macdougall, MD, Prof Laurent Peyrin-Biroulet, MD// The Lancet.- Volume 387, №10021, e907–e916, February 2016

57. Wilson, A. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature/A. Wilson, E.Reyes, J.Ofinan// Am. J. Med.- 2004.- 116 Suppl 7A:44S–9S.

58. Clinical experience with ferric carboximaltose in treatment of cancer- and chemotherapy-associated anemia/ T.Steinmets, B.Tschechne, O.Harlin [et al.]// Ann. Oncol.-2013.- 24(2):475–82.

59. Tumor necrosis factor alpha, its soluble receptor I, and -308 gene promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis with or without amyloidosis: implications for the pathogenesis of nephropathy and anemia of chronic disease in reactive amyloidosis/ С. P.Maury, M.Liljestrom, K.Laiho [et al.]// Arthritis Rheum.- 2003.- 48(11):3068–70.

60. Никитин, Е.Н. Эритропоэтин у больных железодефицитной анемией /Е.Н. Никитин, Л.Н. Красноперова, Ю.Е. Никитин// Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2008. – Т.7, №3.- С. 5-8.

61. Павлов, А.Д. Эритропоэз, эритропоэтин, железо/А.Д.Павлов, Е.Ф.Морщакова, А.Г.Румянцев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 304с.

62. Демихов, В.Г. Патогенез и лечение анемий беременных /В.Г. Демихов, Е.Ф. Морщакова, А.Г. Румянцев. – М.: Практическая медицина, 2015. – 224с.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

Никитин Е.Н.¹, Мясникова О.И.², Ахкиямов Р.Р.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281)

²Бюджетное учреждение здравоохранения Удмуртской Республики «Первая республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Удмуртской Республики, Ижевск, Россия (426039, г. Ижевск ул. Воткинское шоссе, 57)

CLINICAL CHARACTERISTIC AND TREATMENT EXPERIENCE OF ACUTE PROMYELOCYTIC LEUCOSIS

Nikitin E.N.¹, Myasnikova O.I.², Akhkiyamov P.P.¹

¹Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia, e-mail: nikitinen@list.ru, ahkiyamov@ya.ru

²First Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia (426039, Izhevsk, street Votkinsk highway, 57), e-mail: oly4343@yandex.ru

Представлена клиническая характеристика и результаты лечения 17 больных острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ), в том числе случая заболевания впервые возникшего у беременной женщины на сроке 24-25 недель. Пациенты получали программную химиотерапию по схеме «7+3+ATRA (полностью транс-ретиноевая кислота)». Пятилетняя общая выживаемость больных ОПЛ составила 88%, безрецидивная выживаемость – 82% и вероятность сохранения полной ремиссии – 94%, а семилетняя, соответственно, 82%, 59% и 76%.

Ключевые слова: острый промиелоцитарный лейкоз; клиника; химиотерапия; выживаемость больных

Clinical profile and results of treatment of 17 acute promyelocytic leukemia (APML) patients are presented along with a case of a new onset of the disease in a pregnant woman at GA of 24-25 weeks. Patients received scheduled chemotherapy according to a scheme “7+3+ATRA (all-trans-retinoic acid)”. Five-year overall survival of APML patients totaled 88%, relapse-free survival – 82% and the possibility of stable complete remission – 80%, the seven-year rates correspond 82%, 59% and 76%.

Keywords: acute promyelocytic leukemia; clinic; chemotherapy; patients survival rate

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) – редкая, особая форма острого миелоидного лейкоза. Из трудно излечимого заболевания, благодаря особым подходам в лечении, оно превратилось в заболевание с высокой степенью излеченности. Однако, на некоторые вопросы, связанные с лечением ОПЛ, до сих пор не найдены однозначные ответы с большой доказательной базой, что может повышать риск принятия ошибочных решений, особенно в учреждениях с ограниченным опытом лечения [1,6,7].

Цель исследования: изучить клинические особенности и эффективность лечения острого промиелоцитарного лейкоза на региональном уровне.

Материал и методы исследования. Под наблюдением с сентября 2009 по апрель 2017 года в БУЗ УР «1 Республиканская клиническая больница МЗ УР» г. Ижевска находились 17 больных ОПЛ. Из них женщин было 14, мужчин – 3 в возрасте 23 - 66 ($43,94 \pm 3,6$) лет. У одной 22 – летней пациентки ОПЛ впервые выявлен на сроке беременности 24-25 недель (II триместр).

Диагностику и лечение больных ОПЛ осуществляли согласно национальным клиническим рекомендациям [1,2]. Диагноз ОПЛ выставлен на основании стандартных морфологических (бластных клеток в костном мозге более 20% с высокой экспрессией миелопероксидазы и липидов), цитогенетических (обнаружение специфичной для ОПЛ хромосомной аберрации t(15;17) и/или молекулярно-генетических (выявление транскрипта PML/RAR α методом ПЦР) критериев. Пациенты получали 1-2 курса стандартной индукционной химиотерапии по схеме «7+3» в сочетании с АТРА (цитарабин - 100 мг/м² в/в 2 раза в сутки, 7 дней, даунорубицин –60 мг/м² в/в 1 раз в день, 3 дня, АТРА - 45 мг/м² внутрь ежедневно). Лечение полностью транс-ретиноевой кислотой (АТРА) начиналось с момента диагностики ОПЛ за 1-3 дня до начала терапии индукции и продолжалось 30-35 дней до достижения полной ремиссии. Профилактика и лечение ретиноидного синдрома проводилась внутривенным введением дексаметазона в дозе 10 мг/м². Лабораторный мониторинг в период индукции ремиссии включал ежедневное исследование гемограммы и 2-3 раза в неделю – биохимических показателей и коагулограммы (до купирования геморрагического синдрома коагулограмма исследовалась ежедневно). После достижения ремиссии проводились еще 2 курса консолидации по схеме «7+3» (цитарабин - 100 мг/м², даунорубицин - 60 мг/м²) без АТРА. У трех больных курсы консолидации проводились высокодозным цитозаром (1-3 г/м²) в сочетании с антрациклинами. При гиперлейкоцитозных формах основной курс профилактики нейтролейкемии методом 5 интратекальных введений трех препаратов (метотрексат, цитарабин, дексаметазон) выполнен на этапах индукции/консолидации ремиссии. Поддерживающее лечение по «ротационной» программе состояло из курсов 5-дневного введения цитарабина в дозе 100 мг/м² в/в 2 раза в сутки в сочетании с АТРА (45 мг/м² внутрь в 1-5-й дни) с поочередным добавлением к их сочетанию даунорубицина (45 мг/м², в/в, в 1-2-й дни до максимально допустимой дозы 650 мг/м²), или 6-меркаптопурина (по 60 мг/м² в сутки в 2 приема внутрь в 1-5-й дни), или циклофосфана (по 650 мг/м² в/в в 1-й день). Поддерживающее лечение продолжалось в течение 2-2,5 лет.

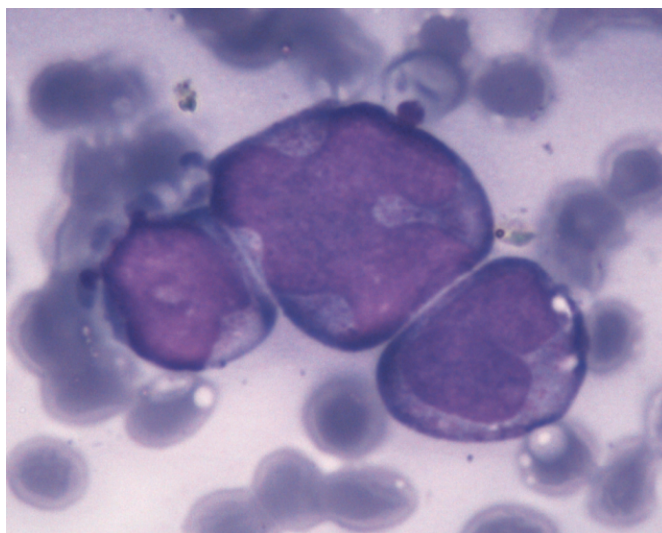
Беременной женщине с ОПЛ до родов проведены 2 курса химиотерапии (индукция/консолидация ремиссии) по схеме «7+3+АТРА» (цитарабин - 100 мг/м² в/в 2 раза в сутки, 7 дней; даунорубицин - 45 мг/м² в/в 1 раз в день, 3 дня; АТРА - 45 мг/м² внутрь ежедневно, 35 дней) до достижения молекулярной ремиссии. На сроке беременности 36 недель произведено родоразрешение живым недоношенным плодом операцией кесарево сечение.

После родов проведены еще 2 курса консолидации ремиссии по схеме «7+3» с даунорубицином 60 мг/м² и 15 курсов поддерживающего лечения в течение 2,5 лет по «ротационной» программе.

Индукционное лечение ОПЛ сопровождалось массивной заместительной инфузионной терапией, направленной на коррекцию тромбоцитопении и выраженной коагулопатии тромбоконцентратами и свежезамороженной плазмой (для поддержания числа тромбоцитов на уровне более 30-50×10⁹/л и уровня фибриногена более 1,5-2,0 г/л, протромбинового индекса более 80%). Профилактика и лечение инфекционных осложнений проводилась назначением антибиотиков широкого спектра действия, противовирусных и противогрибковых препаратов. Полученные результаты обработаны с применением программы Statistica 6.1 с построением кривых выживаемости по Каплану – Майеру.

Результаты и обсуждение. В дебюте болезни у 16 (94,12%) пациентов определялась анемия со снижением числа эритроцитов до 3,61– 1,43 (2,41 ± 0,19)×10¹²/л, уровня гемоглобина до 115 - 50 (80,79±5,21) г/л и симптомами в виде выраженной общей слабости, утомляемости, одышки, сердцебиения, бледности кожи. Геморрагический синдром был у всех обследованных, который проявился микроциркуляторно – пятнистого и/или микроциркуляторно – гематомного типа кровоизлияниями на коже и мягких тканях, кровоточивостью десен и кровоизлияниями на слизистой оболочке полости рта - у 7, маточными и носовыми кровотечениями - у 4, кровоизлиянием в вещество головного мозга - у 1, субдуральной гематомой, меленой и макрогематурией - у 1. Аналогичные геморрагические проявления у больных ОПЛ отмечают и другие исследователи [3,4].

Интоксикационный синдром (гипертермия, повышенная потливость, общая слабость) наблюдался у 9 (52,94%) пациентов. Лимфоаденопатия обнаружена в 5,88% случаев ОПЛ. Лейкопенический вариант ОПЛ с числом лейкоцитов 0,5 - 2,5 (1,4±0,14)×10⁹/л наблюдался у 8 (47,6%) больных, а гиперлейкоцитозный – у 5 (13,77±0,7×10⁹/л; 10,6-24,0×10⁹/л). У остальных 4 больных число лейкоцитов было в норме и составило 4,83±0,13×10⁹/л. Количество бластов в крови колебалось от 6 до 96 (39,29±12,90) %. Тромбоцитопения наблюдалась у 82,35% больных в пределах 7 - 68 (35,36 ± 5,64)×10⁹/л. У 3 (17,65%) пациентов число тромбоцитов не отличалось от референсных значений – 154-339 (277,0±6,3)×10⁹/л. Подобные изменения количества лейкоцитов и тромбоцитов при ОПЛ описывают и другие авторы [1,3,5]. Причем количество лейкоцитов более 20×10⁹/л некоторые исследователи [5] считают независимым маркером риска возникновения коагулопатических кровотечений. Количество бластных клеток в костном мозге было увеличено до 61,5 – 96 (77,41 ± 2,87)%, которые характеризовались значительным ядерным полиморфизмом (складчатостью и дольчатостью), наличием крупной, обильной зернистости в цитоплазме у 10 и палочками Ауэра - у 2 больных (Рис.1)



**Рис.1. Микрофотография мазка крови.
Бластные клетки при остром промиелоцитарном лейкозе**

Цитохимический анализ выявил положительные реакции на миело-пероксидазу в 96-100 ($98,56 \pm 0,5$)% бластов, на липиды – в 95-100 ($98,48 \pm 0,48$)%, на гликоген в мелкогранулярной форме – в 78 - 100 ($96 \pm 1,62$)%. Иммунофенотип бластов костного мозга был представлен выраженной экспрессией миелоидных маркеров CD 33 в 85,8%, CD 13 - в 70,4%, суMPO – в 84,4%, CD 15 – в 40,1%, CD117 – в 55,1%, CD 38 – в 70,3%, отсутствием или слабой экспрессией CD 34 в 12,8%, CD14 - в 4,6%, HLA-DR – в 22,63%, CD7 – в 15,67%. У 9 (52,94%) больных определялась абберантная экспрессия маркеров Т-клеток, из них CD3- у 2-х (47,4% и 43%), CD7- у 3-х (66,5%, 29,7% и 20%), CD2- у 3-х (68,4%, 46,1% и 27,8%), а у 1 больного В-клеточные маркеры- суCD79 α - 29,7%. У 4 (23,52%) больных Т-линейные маркеры были экспрессированы на гипогранулярных опухолевых бластах. Маркер ранних гемопоэтических предшественников HLA-DR был высоко экспрессирован в бластах у 4 (23,53%) больных (64,7%, 57,1%, 34,6% и 26,7%).

В результате программного лечения у 14 (82,35%) больных достигнута полная ремиссия, причем у 10 (58,82%) из них - после первого индукционного курса. У беременной женщины с ОПЛ молекулярная ремиссия подтверждена отсутствием в миелограмме исходно определявшегося методом ПЦР молекулярного маркера ОПЛ (изоформы bcr 3 транскрипта PML-RAR- α). Пациентка снята с программной терапии, находится в ремиссии 5 лет. Ребенок растет и развивается нормально. Смерть констатирована у трех (17,65%) больных. Один больной (60 лет) с выраженным геморрагическим синдромом скончался от кровоизлияния в мозг на третьи сутки после госпитализации, до начала лечения. У второго больного (62 года) с высоким индексом коморбидности сердечно – сосудистыми заболеваниями (гипертоническая болезнь III стадии, ИБС, постинфарктный кардиосклероз, ХСН) индукционная химиотерапия осложнилась острым коронарным синдромом. Химиотерапия прервана, больной умер от легочно-сердечной не-

достаточности. Третья больная умерла после курса консолидации высокодозным цитозаром от тяжелой двусторонней пневмонии и ДВС-синдрома. Ранняя летальность и летальность в период полной ремиссии составили, соответственно, 11,77% и 5,88%. Ранняя (семидневная) внутрибольничная смертность, по данным одних исследователей [4], случалась в 6,47-10,8% случаев ОПЛ, другие [3] констатировали во время индукционной терапии смерть 26% пациентов. У двух других больных наблюдался поздний рецидив после снятия с программного лечения (через 4 года от начала терапии): у одного из них достигнута повторная ремиссия, у второго после достигнутой ремиссии возник очередной ранний рецидив и достигнута вновь третья полная ремиссия. В настоящее время 6 больных сняты с программного лечения, состоят на диспансерном учете у гематолога, 8 пациентов находятся на разных этапах программного лечения. Пятилетняя общая и безрецидивная выживаемость составили, соответственно, 88% и 82%, вероятность сохранения полной ремиссии – 94%, а семилетняя, соответственно, 82%,59% и 76%, что не отличается от литературных данных [1,6].

Выводы:

1. ОПЛ сопровождается выраженной лейкопенией, тромбоцитопенией и анемией, а также - тяжелыми геморрагиями микроциркуляторно - гематомного типа, вплоть до ДВС-синдрома.
2. Бластные клетки при ОПЛ характеризуются полиморфизмом ядер, обильной зернистостью в цитоплазме и выраженными цитохимическими маркерными реакциями на миелопероксидазу и липиды.
3. Иммунофенотип опухолевых промиелоцитов представлен высокой экспрессией CD33 в 85,8% случаев, CD 13 - в 70,4%, суМРО – в 84,4%, CD15 – в 40,1%, CD117 – в 55,1%, CD38 – в 70,3%, отсутствием или слабой экспрессией CD 34-в 12,8%, CD14 - в 4,6%, HLA-DR – в 22,63%, CD7 – в 15,67%.
4. Пятилетняя общая выживаемость больных ОПЛ при использовании программы «7+3+АТРА (даунорубин 60 мг/м²), двух аналогичных курсов консолидации без АТРА и 2-2,5 лет поддерживающей терапии составляет 88%, безрецидивная выживаемость – 82% и вероятность сохранения полной ремиссии – 94%, а семилетняя, соответственно, 82%,59% и 76%.
5. Ранняя летальность (11,77%) и летальность в период полной ремиссии (5,88%) высоки, что снижает общую эффективность лечения больных ОПЛ.

Список литературы

1. Паровичникова, Е.Н. Протокол лечения острого промиелоцитарного лейкоза / Е.Н. Паровичникова, А.Н. Соколов, В.Г. Савченко // Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / Под ред. В.Г. Савченко .- М.: Практика, 2012.- С.267-285.
2. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова, Б.В. Афанасьев [и др.] // Гематол. и трансфузиол.- 2014.- № 1 (Прил. 2).- С. 1-29.
3. Coagulopathy in Acute Promyelocytic Leukemia: Strategies to Improve Assessment of

- Hemostatic Risk / S.David, V.Kamath, U.Kulkarni [et al.] // Blood. 2015.- Vol.126.- :P. 3758;
4. Early Mortality in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL) Treated in Teaching Versus Non-Teaching Hospitals/ A.Levin, A.Kleman, L. Rein [et al.] // Blood.- 2016.- Vol.128.- P. 2784.
 5. Determinants of fatal bleeding during induction therapy for acute promyelocytic leukemia in the ATRA era / S.Mantha, D. A.Goldman, S. M. Devlin [et al.] // Blood. 2017.- :blood-2016-10-747170;
 6. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net / M.A. Sanz, D. Grimwade, M.S. Tallmanm [et al.] // Blood.- 2009. - Vol. 113.- P. 1875-1891.
 7. Lessons taught by acute promyelocytic leukemia cure / H.Thé // The Lancet. 2015.- Vol. 386, No. 9990. - P. 247–248.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК С ИЗОЛИРОВАННОЙ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ДЕЛЕЦИЕЙ 13Q14 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Овсепян В.А.¹, Сарпова М.В.¹, Зотина Е.Н.¹, Минаева Н.В.¹, Загоскина Т.П.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия (610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Киров Россия (610027, Киров, ул.К.Марквa, 112)

PROGNOSTIC VALUE OF CONTENTS OF CELLS WITH ISOLATED INTERSTITIAL 13Q14 DELETION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Ovsepyan V.A.¹, Sarpova M.V.¹, Zotina E.N.¹, Minaeva N.V.¹, Zagoskina T.P.²

¹ Federal State Budgetary Institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical and Biologic Agency», Kirov, Russia (610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

E-mail: vovsepyan@mail.ru, marisarpova@mail.ru, enzotina@mail.ru, mnvgem@gmail.com

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kirov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kirov, Russia (610027, Kirov, K.Marksa str., 112)
E-mail: zagoskina@blood.kirov.ru

Для изучения прогностического значения содержания опухолевых клеток с изолированной делецией в момент постановки диагноза при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) 77 больных были разделены на 2 группы, на пациентов, у которых процент лейкозных клеток с делецией 13q14 составил $\geq 60\%$ и $< 60\%$. Установлено, что содержание клеток с изолированной del13q14 является предиктором выживаемости, свободной от терапии, и общей выживаемости больных ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, делеция 13q14, клинический исход, прогноз

To study the prognostic value of the content of tumor cells with isolated interstitial 13q14 deletion at the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL), 77 patients with this deletion were divided into 2 subgroups of patients with del13q14 in $\geq 60\%$ or $< 60\%$ cells It was found that the content of cells with isolated del13q14 is a predictor of free therapy survival and overall survival in CLL patients.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, 13q14 deletion, clinical outcome, prognosis

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) характеризуется клональной пролиферацией и накоплением опухолевых CD5- и CD23-позитивных В-клеток в костном мозге, периферической крови, лимфатических узлах, селезенке и является самым частым видом лейкозов у взрослых в России, странах Евросоюза и Северной Америки [1]. Ежегодно в нашей стране диагностируется около 3,8 тыс. новых случаев ХЛЛ [2]. Данное заболевание отличается вы-

раженной эпидемиологической и биологической гетерогенностью, а также вариабельностью клинического течения, ответа на терапию и прогноза [3]. Выживаемость отдельных пациентов может варьировать от нескольких месяцев до десятилетий. При этом одни больные не нуждаются в терапии в течение 20 лет и более, в то время как у других прогрессия опухоли заставляет начинать лечение с первых месяцев болезни [4].

На сегодняшний день накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о ведущей роли генетических аномалий в патогенезе ХЛЛ, об их влиянии на характер течения заболевания и ответ на терапию [5]. Применение молекулярно-цитогенетического метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) с ДНК-зондами к локусам 17p13, 11q22-23, 13q14 и 12p11-q11 позволяет выявлять эти цитогенетические нарушения в лимфоцитах у более 80% больных ХЛЛ [6, 7]. Наиболее частыми и прогностически значимыми хромосомными абберациями являются del13q14 (40-60%), трисомия хромосомы 12 (15-30%), del11q22-23 (15-20%) и del17p13 (8-15%) [8, 9]. Примерно у половины больных ХЛЛ с клональными нарушениями кариотипа наблюдается одна хромосомная аномалия, у остальных – две или более. У пациентов с одним цитогенетическим нарушением прогноз лучше, чем у больных с двумя или более аномалиями. С клинической точки зрения ХЛЛ с изолированной делецией 13q14 характеризуется благоприятным течением. Медианы выживаемости, свободной от терапии (ВСТ - время от момента постановки диагноза до начала первой терапии), и общей выживаемости (ОВ) у больных ХЛЛ с изолированной делецией 13q14 больше, чем при любой другой абберации и даже при нормальном кариотипе. Пациенты с del11q22-23 и del17p13 относятся к группе неблагоприятного прогноза (низкая выживаемость и короткое время до начала прогрессирования) [6]. Отсутствие хромосомных нарушений и трисомия 12 считаются промежуточными по прогнозу. Следует отметить, что при длительных наблюдениях имеются немногочисленные сведения о лучшей выживаемости больных с отсутствием хромосомных нарушений по сравнению с пациентами-носителями del13q14 [10]. Такие результаты можно объяснить небольшим объемом выборок, включенных в анализ, а также гетерогенностью групп больных с del13q14 и нормальным кариотипом. В частности, обращает на себя внимание тот факт, что больные ХЛЛ значительно отличаются друг от друга по содержанию (проценту) клеток с указанным хромосомным нарушением в период постановки диагноза. Эти различия могут отражать длительность опухолевого процесса и, соответственно, риск накопления дополнительных (в том числе, точковых) мутаций, ухудшающих прогноз течения заболевания.

Целью настоящего исследования явилась оценка прогностического значения содержания клеток с изолированной del13q14 у больных ХЛЛ в момент постановки диагноза

В исследование включены 77 больных ХЛЛ, у которых при FISH-

исследовании мононуклеарной фракции костного мозга в период постановки диагноза была выявлена изолированная del13q14. Медиана возраста пациентов составила 61 год. Среди них было 45 (58%) мужчин, 32 (42%) женщины. У 15 (19%) больных установлена стадия А, у 52 (68%) - стадия В и у 10 (13%) - стадия С по классификации J. Binet [11]. Медиана времени наблюдения за больными равнялась 70 мес. У всех больных до начала лечения оценивались экспрессия белка ZAP-70 с применением проточной цитофлуориметрии и содержание тимидинкиназы (ТК) в сыворотке крови радиоферментным методом.

Мононуклеарную фракцию, содержащую лимфоциты, выделяли с использованием сепарационной среды LMS (MP Biomedicals, США). Клеточную суспензию, фиксированную в смеси метанола и уксусной кислоты, наносили на сухие предварительно очищенные предметные стекла. В работе был использован коммерческий многоцветный набор ДНК-зондов («Abbott/Vysis», США), состоящей из 2 коктейлей: LSI p53/LSI ATM (SpectrumOrange/SpectrumGreen) и LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 (SpectrumOrange/SpectrumAqua/SpectrumGreen) («Abbott/Vysis»). Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioplan-2-mot» («Carl Zeiss», Германия) с набором фильтров DAPI, Orange, Green, Aqua (Vysis, США). В каждом случае анализировали не менее 200 интерфазных клеток с четкими сигналами. Пороговые значения всех исследованных делеций и трисомии 12 составляли соответственно 9% и 3%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью статистического пакета Statistica 6.1. Показатели ВСТ и ОВ рассчитывали по методу Каплана-Майера (log-rank) [12]. Оценку прогностической ценности признаков в отношении ОВ и ВСТ изучали, применяя модель пропорциональных рисков Кокса. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Больные с изолированной del13q14 были разделены на две группы в зависимости от содержания клеток, имеющих данную аберрацию. Согласно результатам ROC-анализа, пороговое значение (чувствительность – 95%, специфичность – 87%) равнялось 60%. В первую группу был включен 41 (53%) больной, имеющий изолированную del13q14 в менее чем 60% клеток, во вторую - 36 (47%) пациентов с содержанием клеток с указанной делецией не менее 60%.

Результаты исследования показали, что медиана ОВ в первой группе не была достигнута и статистически значимо превышала таковую во второй, равной 139 мес ($p = 0,034$).

Наряду с этим установлено достоверное межгрупповое различие между медианами ВСТ, а именно: 45 мес и 27 мес у пациентов с содержанием клеток с del13q14 соответственно $< 60\%$ и $\geq 60\%$ ($p = 0,002$). Следовательно, у больных с содержанием клеток с del13q14 не менее 60% наблюдается короткое время до первой терапии, что связано с прогрессирующим течением

заболевания.

Согласно результатам многофакторного анализа, в который были включены такие параметры как возраст (≤ 60 лет или > 60 лет), пол (мужской или женский), стадия заболевания (стадия А или стадии В и С), содержание ТК (≤ 20 Ед/л или > 20 Ед/л) в сыворотке, уровень экспрессии белка Zap-70 ($< 20\%$ и $\geq 20\%$) и содержание клеток с изолированной del13q14 ($< 60\%$ или $\geq 60\%$), статистически значимыми независимыми факторами прогноза ВСТ у больных ХЛЛ явились содержание клеток с del13q14 ($p = 0,016$), уровень экспрессии Zap-70 ($p = 0,014$) и содержание ТК ($p = 0,036$). В отношении же ОВ независимыми факторами прогноза у больных ХЛЛ стали стадия заболевания ($p < 0,001$), содержание ТК в сыворотке крови ($p = 0,010$), а также число клеток, имеющих изолированную del13q14 ($p = 0,025$).

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что содержание опухолевых клеток с изолированной del13q14 влияет как на продолжительность ВСТ, так и на ОВ больных ХЛЛ. Содержание клеток с del13q14 не менее 60% обуславливает более низкую ОВ и более короткое время до начала первой терапии по сравнению с уровнем клеток с указанной делецией менее 60%. При этом число клеток с изолированной del13q14 в комплексе с такими факторами, как содержание ТК в сыворотке крови и уровень экспрессии белка Zap-70, обеспечивает более точную стратификацию пациентов на группы риска, позволяя тем самым в момент диагностики более точно идентифицировать больных, которые подвержены быстрому прогрессированию.

Список литературы

1. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia / D. Oscier [et al.]. // Br. J. Haematol. - 2004. - Vol. 125. - P. 294-317.
2. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. - Москва: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. - 250 с.
3. Caligaris-Cappio, F. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of different feather / F. Caligaris-Cappio, T. J. Hamblin. // J. Clin. Oncol. - 1999. - Vol. 17. - P. 399-412.
4. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia / G.W. Dewald [et al.]. // Br. J. Haematol. - 2003. Vol. 121. - P. 287-295.
5. Hallek, M. Хронический лимфолейкоз / M. Hallek. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. - 2010. - Т. 3, № 1. - С. 101-102.
6. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. / H. Dohner [et al.]. // N. Engl. J. Med. - 2000. - Vol. 343, №26. - P. 1910-1916.
7. Controversial fluorescence in situ hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort / M.S. Davids [et al.]. // Br. J. Haematol. - 2015. - Vol. 170, № 5. - P. 694-703.
8. Цитогенетические нарушения при хроническом В-клеточном лимфолейкозе и их связь с клинико-биологическими особенностями и прогнозом заболевания / А.И. Захарова [и др.] // Терапевтический архив. - 2006. - Т. 78, № 7. - С. 57-62.
9. Biological and clinical characterization of recurrent 14q deletions in CLL and other

mature B-cell neoplasms / F. Dicker [et al.] // Br.J. Haematol. - 2010. - Vol. 151, № 1. - P. 25-36.

10. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia / A. Valetto [et al.] // Blood. - 1999. - Vol. 94. - P. 1840-1847.

11. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. / J.L. Binet [et al.] // Cancer. - 1981. - Vol. 48, № 1. - P. 198-206.

12. Kaplan, E.L. Nonparametric estimation from incomplete observations / E.L. Kaplan, P.J. Meier // Amer. Statis. Assn. - 1958. - Vol. 53, № 282. - P. 457-481.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ, ОСЛОЖНЕННОЙ ДИАЛИЗ-ЗАВИСИМОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Сёмочкин С. В.^{1,2}, Желнова Е. И.², Юрова Е. В.¹, Гаглоева Д. Э.²,
Архипова Н. В.², Толстых Т. Н.², Мисюрина Е. Н.²

¹ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И.Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
(117997, Москва, ул. Островитянова, д.1)

²ГБУЗ Городская клиническая больница №52 Департамента здравоохранения,
Москва, Россия (123182, г. Москва, улица Пехотная, дом 3)

THE EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF NEWLY DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA, COMPLICATED BY DIALYSIS-DEPENDENT RENAL INSUFFICIENCY

Semochkin S. V.^{1,2}, Zhelnova E. I.², Yurov E. V.¹, D. E. Gagloeva²,
Arkhipova N. In.², Tolstick T. N.², Misurina E. N.²

FSBEI Russian National Research Medical University. N. And.Pirogov, Moscow, Russia
(117997, Moscow, Ostrovityanova str., 1)

City Budgetary Institution of Healthcare Municipal Clinical Hospital No. 52
of the Department of health
(123182, Moscow, Ostrovityanova str., 1), e-mail: s.semochkin@gmail.com

Проанализирован собственный опыт лечения диализ-зависимых пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой по бортезомиб-содержащим программам. Показано, что миеломная нефропатия потенциально обратима на ранних этапах ее выявления. Подчеркнута важность ранней диагностики и незамедлительного начала системной противоопухолевой терапии. На протяжении индукционной химиотерапии важны все компоненты сопроводительной терапии, включая коррекцию гиперкальциемии, адекватную гидратацию, заместительную терапию препаратами крови и фармакологический контроль системы гемостаза.

Ключевые слова: гемодиализ, множественная миелома, почечная недостаточность

Analyzed own experience in the treatment of dialysis-dependent patients with newly diagnosed multiple myeloma in the bortezomib-containing programs. It is shown that myeloma nephropathy is potentially reversible in the early stages of detection. Podcerkwa the importance of early diagnosis and immediate start of systemic anti-cancer therapy. For induction chemotherapy, all are important components of supportive therapy including correction of hypercalcemia, adequate hydration, replacement therapy with blood products and pharmacological control of hemostasis.

Keywords: hemodialysis, multiple myeloma, renal failure

Почечная недостаточность (ПН) представляет собой один из базовых симптомов множественной миеломы (ММ), определяющих показания для незамедлительного начала системной противоопухолевой терапии. Миеломная нефропатия характеризуется протеинурией, постепенным снижением концентрационной функции почек, развитием острой или хронической ПН и возникает на разных этапах у 20-50% больных. Около 2-5% пациентов с

впервые диагностированной ММ непосредственно презентируют с тяжелой ПН, требующей почечной заместительной терапии, что значительно ухудшает качество жизни и увеличивает стоимость лечения [1]. Диализ-зависимая ПН ассоциируется с высокой частотой осложнений и ранней летальностью. Как правило, пациенты с тяжелой ПН исключаются из клинических исследований, в связи с чем данные по эффективности лечения данной категории пациентов выпадают из общего анализа. Текущие рекомендации по лечению ММ, осложненной ПН, основываются на данных небольших исследований или ретроспективного анализа отдельных наблюдений.

В большинстве клинических исследований стандартом лечения пациентов с впервые диагностированной ММ, осложненной тяжелой ПН, являются индукционные режимы, основанные на применении бортезомиба [2]. Терапия пациентов с диализ-зависимой ПН может дополняться плазмаферезом или гемодиализом с фильтрами высокой отсечки («high cut-off») для быстрого удаления из крови свободных легких цепей (FLC) [3].

Исходя из изложенного выше, целью данной работы явился анализ собственного опыта лечения диализ-зависимых пациентов с впервые диагностированной ММ по бортезомиб-содержащим программам.

Материалы и методы

В период с 12.2014 по 12.2015 года лечение в условиях нашей клиники проходило 113 пациентов с впервые диагностированной ММ, из которых для целей представленного анализа было отобрано 37 (33%) случаев (муж. – 19, жен. – 18) с тяжелой ПН, требующей проведения гемодиализа. Медиана возраста в целевой когорте составила 62 (разброс 46-78) года. Пятнадцать (41%) пациентов были старше 65 лет. В качестве индукционной терапии химиотерапии 25 (68%) пациентов получили программу VCD, 3 (8%) – PAD, VD – 5 (14%) и VMP – 4 (11%). Высокодозную консолидацию с аутологичной ТГСК удалось реализовать у 2 (5%) пациентов.

Для определения почечного ответа использовали критерии IMWG [4]. Под полным почечным ответом (CRrenal) понимали значительное повышение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по сравнению с базовым до уровня более 60 мл/мин/м²; под частичным (PRrenal) – увеличение с < 15 до 30-50 и под минимальным (MRrenal) – увеличение с < 15 до 15-29 или с исходных 15-29 до 30-59 мл/мин/м². Противомиеломный ответ оценивали в соответствии со стандартными критериями IMWG [5]. Показатели общей выживаемости (ОВ) рассчитывали с помощью метода Каплана–Майера. Статистический анализ проводился с помощью программы SPSS (версия 23.0).

Результаты исследования

Медиана уровня креатинина сыворотки крови до начала лечения составила 790 (разброс 242-1787) мкмоль/л. Расчетная медиана скорости клубочковой фильтрации (СКД-EPI) – 5 (2-11) мл/мин/1,73м². Cast нефропатия в качестве причины ПН была идентифицирована у 36 (97%) больных, ги-

перкальциемия в 4 (11%) и AL-амилоидоз в 1 (2,7%) случае. Медиана исходного уровня FLC в крови составила 5600 (2290-13100) мг/л, в моче – 2,20 (0,00 – 6,60) г/сутки. Уровень β 2-микроглобулина в крови – 18,0 (4,3-18,6) мг/л. Цитогенетический вариант ММ определен у 11 пациентов. К группе высокого риска было отнесено 3 (27%) из 11 оцененных пациентов на основании обнаружения t(4;14) – 2 и del(17p) – 1. Наличие остеодеструктивного синдрома подтверждено в 22 (59%) и внекостной плазмоцитомы в 1 (27%) случае. Значимая сопутствующая кардиологическая патология имела место у 21 (57%) пациента, включая стенокардию и постинфарктный кардиосклероз – 15, нарушения ритма и проводимости – 6, хроническую сердечную недостаточность (ХСН) – 5 и артериальную гипертензию – 14.

Медиана времени от момента диагностики ПН до начала химиотерапии миеломы составила 1,5 (0,1-76) мес. Почечный ответ получен у 3 пациентов: 1 – полный и 2 – малый. Все пациенты, достигшие почечного ответа, имели длительность «диализного» анамнеза менее 1 мес.

Противомиеломный ответ (\geq PR) по всей группе пациентов получен в 73% случаев, включая 16% полных (CR) и 11% почти полных ремиссий (nCR), 32% очень хороших частичных (VGPR) и 16% частичных ремиссий (PR). Однолетняя общая ОВ составила $70 \pm 6\%$. Наиболее частыми (более 5% случаев) клинически значимыми нежелательными явлениями на протяжении первых 4-х циклов индукционной терапии были нейтропения 4 ст. – 4 (10,8%), тромбоцитопения 4 ст. – 4 (10,8%), фебрильная нейтропения – 3 (8,1%), пневмония – 11 (29,7%), сепсис – 2 (5,4%), клостридиальный колит – 4 (10,8%), распространенная инфекция Herpes zoster – 4 (10,8%), тромбоз артериовенозной фистулы – 2 (5,4%) и периферическая нейропатия 3-4 ст. – 2 (5,4%).

Заключение

Миеломная нефропатия потенциально обратима, что определяет важность ранней диагностики и незамедлительного начала системной противоопухолевой терапии. На протяжении индукционной химиотерапии важны все компоненты сопроводительной терапии, включая коррекцию гиперкальциемии, адекватную гидратацию, заместительную терапию препаратами крови и фармакологический контроль системы гемостаза.

К возможным причинам неудовлетворительного почечного ответа следует отнести позднюю диагностику ПН (медиана 1,5 мес.), по крайней мере, в части случаев в результате неверно выбранного метода диагностики (биопсия почки вместо определения FLC в сыворотке крови и моче) и отсутствие раннего доступа к противомиеломным иммуномодуляторам в соответствующих дозах (леналидомид 5 мг).

Список литературы

1. Gavriatopoulou M., Terpos E., Kastritis E. [at al.] Current treatments for renal failure due to multiple myeloma // Expert Opin Pharmacother. – 2016. – Vol. 17, N 16. – P.2165 – 2177.
2. Рехтина И.Г., Менделеева Л.П., Бирюкова Л.С. Диализ зависимая почечная недо-

статочность у больных множественной миеломой: факторы обратимости // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87, № 7. – С. 72-76.

3. Dimopoulos M.A., Roussou M., Gavriatopoulou M. [at al.] Bortezomib-based triplets are associated with a high probability of dialysis independence and rapid renal recovery in newly diagnosed myeloma patients with severe renal failure or those requiring dialysis // Am J Hematol. – 2016. – Vol. 91, N 5. – P. 499 – 502.

4. Dimopoulos M.A., Terpos E., Chanan-Khan A. [at al.] Renal impairment in patients with multiple myeloma: a consensus statement on behalf of the International Myeloma Working Group // J Clin Oncol. – 2010. – Vol. 28, N 33. – P. 4976 – 4984.

5. Rajkumar S.V., Harousseau J.L., Durie B. [at al.] Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1 // Blood. – 2011. – Vol. 117, N 18. – P. 4691 – 4695.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА ПЕРИОД 2002-2016 гг.

Сергеева Л. Г., Целоусова О. М., Васкина Е. А., Татаурова И. П.
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)

THE INCIDENCE OF ACUTE LEUKEMIA OF CHILDREN POPULATION OF KIROV REGION FOR THE PERIOD 2002-2016

Sergeeva L. G., Celousova O. M., Vackina E. A., Tataurova I. P.
FSBSI «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency» Kirov, Russia
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)
E-mail: lara-sergeeva@mail.ru, celousova.kirov@yandex.ru,
vaskina_e@inbox.ru, irinatatayrova@yandex.ru

Лейкозы являются самыми распространенными онкологическими заболеваниями в детском возрасте, их доля составляет 1/3 всех новых случаев опухолевых заболеваний, ежегодно возникающих у детей. Проведенный анализ заболеваемости острыми лейкозами детского населения Кировской области показал, что среднегодовая заболеваемость сопоставима со средними данными по РФ и составляет 4,24 на 100 000 детского населения. В структуре заболеваемости преобладает острый лимфобластный лейкоз — 3,27 на 100 000 детей.

Ключевые слова: острые лейкозы, детское население, острый лимфобластный лейкоз, острый нелимфобластный лейкоз, заболеваемость, Кировская область, возраст, пол

Leukemia is the most common oncological disease in childhood, their proportion is one-third of all new cases of tumors that occur annually in children. The carried out analysis of the incidence of acute leukemia in the children's population of the Kirov region showed that the average annual incidence is comparable with the average data for the Russian Federation and is 4.24 per 100,000 children's population. In the structure of morbidity, acute lymphoblastic leukemia predominates - 3.27 per 100 000 children.

Keywords: acute leukemia, child population, acute lymphoblastic leukemia, acute non-lymphoblastic leukemia, morbidity, Kirov region, age, gender

Актуальность. Острые лейкозы (ОЛ) у детей — наиболее частые злокачественные новообразования, которые в структуре всех злокачественных опухолей у детей составляют 32-40%. При этом в структуре детских лейкозов доминирует острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), на долю которого приходится 75–80 %. Острый нелимфобластный лейкоз (ОНЛЛ) более характерен для детей старшего возраста и составляют около 20% ОЛ, а у детей раннего возраста (до 2-х лет) – до 40% [1, 2, 3, 4]. Пик заболеваемости ОЛЛ у детей приходится на дошкольный возраст (2-5 лет, медиана 4,7 г.), при ОМЛ пик заболеваемости — старший возраст. Согласно данным литературы, мальчики ОЛЛ болеют чаще, чем девочки [1, 3, 5]. Среднегодовая заболеваемость ОЛ 3,2-4,4 на 100 000 детского населения, ОЛЛ — около 4 на

100 000, ОНЛЛ — 0,5-0,7 [2, 6, 7, 8, 9].

Цель. Оценить статистику заболеваемости острыми лейкозами детского населения Кировской области за 15 лет.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное исследование заболеваемости острым лейкозом у детей в возрасте от 0 до 18 лет, проживающих на территории Кировской области, за период 2002-2016гг. Для изучения эпидемиологии ОЛ использовалась первичная документация заболевших острым лейкозом детей, получавших лечение в детском отделении гематологии и химиотерапии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства».

Среднегодовая численность детей от 0 до 18 лет в Кировской области за 15 лет составила $219601,5 \pm 3201,7$ (информация о численности населения получена из территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Кировской области).

Показатель заболеваемости рассчитывался на 100 000 детского населения в возрасте от 0 до 18 лет. Результаты представлены в виде средних величин и стандартной ошибки — $M \pm m$.

За данный период исследования было выявлено 140 детей с диагнозом ОЛ (108 [77,14%] — с ОЛЛ и 32 [22,86%] — ОНЛЛ). Среди всех заболевших 62 мальчика — 44,29% (49 с диагнозом ОЛЛ — 35% и 13 — с ОНЛЛ — 9,29%) и 78 девочек — 55,71% (59 с ОЛЛ — 42,1%, 19 — ОНЛЛ — 13,6%). Соотношение мальчики : девочки — 1:1,3 (ОЛ), 1:1,2 (ОЛЛ) и 1:1,4 (ОНЛЛ) (рис.1).

Среднегодовая заболеваемость в Кировской области ОЛ составляет $4,24 \pm 0,36$ (ОЛЛ — $3,27 \pm 0,35$; ОНЛЛ — $0,97 \pm 0,12$). Минимальный показатель заболеваемости ОЛ — 1,93 был отмечен в 2008г. (ОЛЛ — 1,28 в 2004г., ОНЛЛ — 0 в 2008г.). Максимальный показатель заболеваемости ОЛ был в 2016 — 7,03 (ОЛЛ — 6,15 в 2016 г., ОНЛЛ — 1,92 в 2010г.) (таблица 1).

При анализе (рис 2.) отмечается, что динамика заболеваемости ОЛЛ детского населения Кировской области имеет тенденцию к росту, что подтверждается линейным трендом.

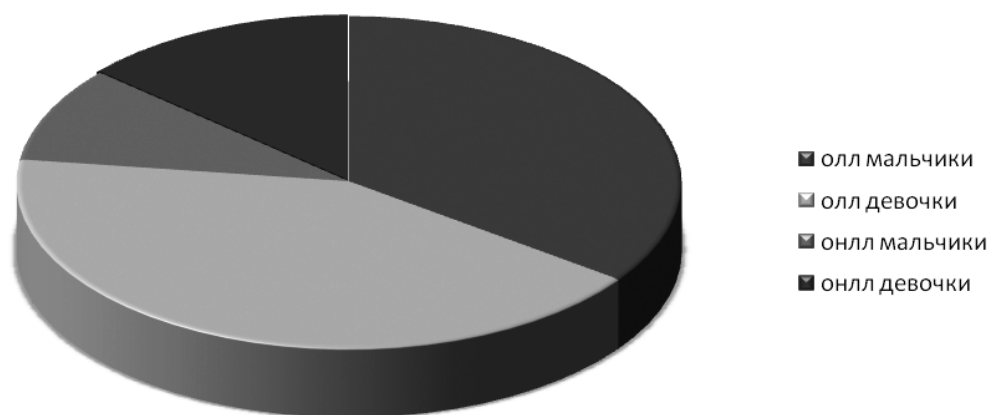


Рисунок 1. Заболеваемость мальчиков и девочек ОЛЛ и ОНЛЛ в Кировской области за 15 лет

Таблица 1.

Заболееваемость детей ОЛ в Кировской области в 2002-2016 гг.

Год	n(ОЛ)	n(ОЛЛ)	n(ОНЛЛ)	Z(ОЛ)	Z(ОЛЛ)	Z(ОНЛЛ)
2002	14	10	4	5,70	4,07	1,63
2003	11	9	2	4,60	3,76	0,84
2004	5	3	2	2,14	1,28	0,86
2005	9	7	2	4,05	3,15	0,9
2006	7	5	2	3,30	2,36	0,94
2007	10	9	1	4,82	4,34	0,48
2008	4	4	0	1,93	1,93	0
2009	11	9	2	5,27	4,31	0,96
2010	8	4	4	3,84	1,92	1,92
2011	12	10	2	5,72	4,77	0,95
2012	7	4	3	3,31	1,89	1,42
2013	10	7	3	4,62	3,23	1,39
2014	7	5	2	3,17	2,26	0,91
2015	9	8	1	4,02	3,57	0,45
2016	16	14	2	7,03	6,15	0,88
Средне годовой показатель	9,33	7,20	2,13	4,24	3,27	0,97

Примечание: ОЛ — острый лейкоз; ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз; ОНЛЛ — острый нелимфобластный лейкоз; n — количество впервые выявленных больных; Z — заболеваемость.

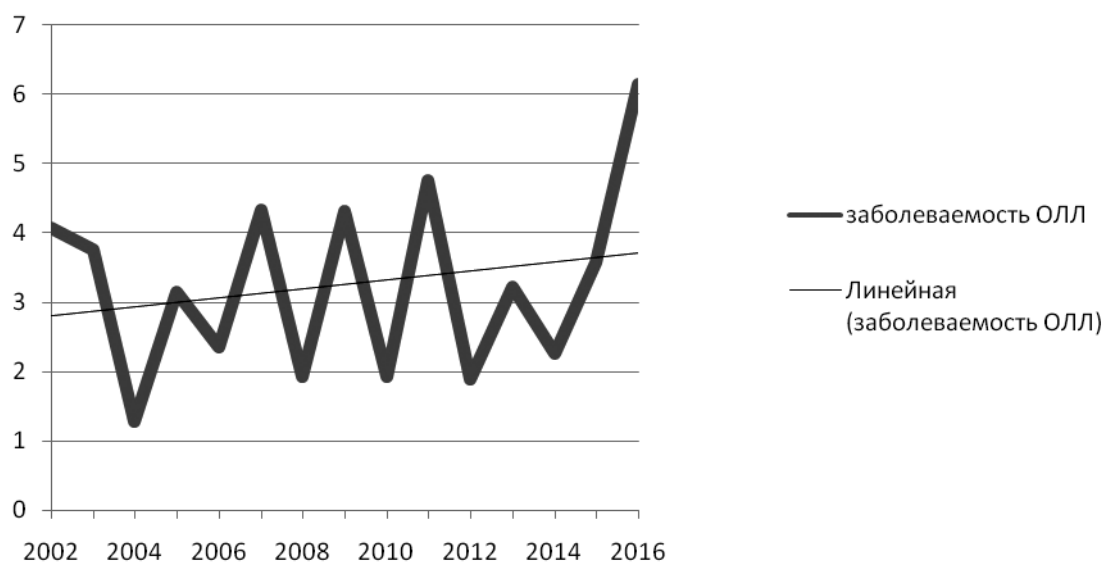


Рисунок 2. Динамика заболеваемости ОЛЛ детского населения Кировской области за 15 лет и линейный тренд. Уравнение тренда — $f(x)=0,065x+2,75$

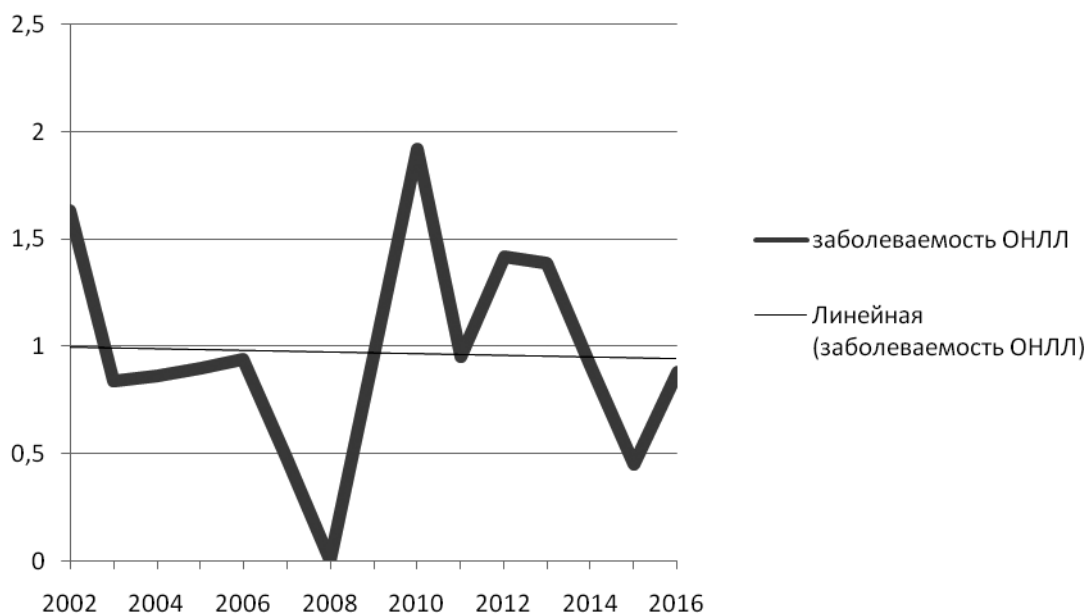


Рисунок 3. Динамика заболеваемости ОНЛЛ детского населения Кировской области за 15 лет и линейный тренд. Уравнение тренда — $f(x) = -0,004x + 0,99$

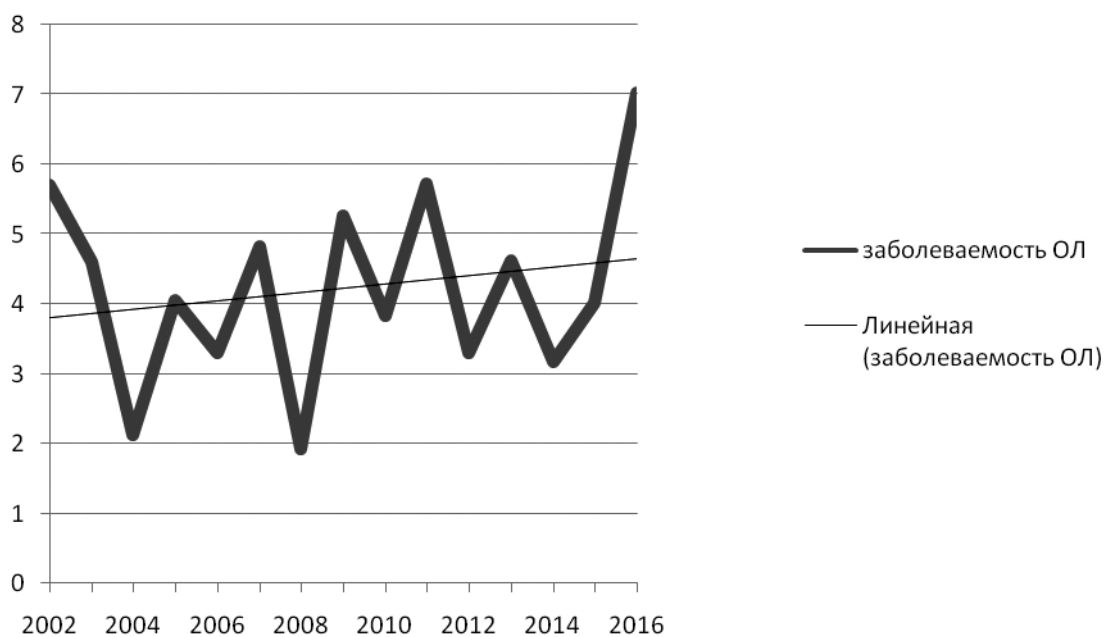


Рисунок 4. Динамика заболеваемости ОЛ детского населения Кировской области за 15 лет и линейный тренд. Уравнение тренда — $f(x) = 0,061x + 3,75$

На рисунке 3 отмечается тенденция к падению заболеваемости ОНЛЛ у детей Кировской области за последние 15 лет.

На данном графике (рис. 4) прослеживается рост заболеваемости ОЛ детского населения Кировской области за счёт роста заболеваемости ОЛЛ.

Проведён территориальный анализ заболеваемости детей ОЛ, проживающих в Кировской области (таблица 2, таблица 3). Максимальная заболеваемость отмечается в Санчурском и Нагорском районах, минимальная – в 6 районах (Арбажский, Куменский, Малмыжский, Немский, Тужинский, Фаленский), где за последние 15 лет не зарегистрировано случаев больных детей с ОЛ.

Таблица 2.

**Среднее количество детей с впервые, выявленным, ОЛ
и среднегодовая численность детского населения за 15 лет
в районах Кировской области**

Район	n	N	Район	n	N	Район	n	N	Район	n	N
Арбажский	0	1203	Киль-мезкий	3	2719	Немский	0	1628	Слободской	6	10780
Афанасьевский	2	3242	Кирово-Чепецкий	9	15031	Нолинский	2	3734	Советский	5	4566
Белохолуницкий	4	3369	МО Киров	49	74812	Омутнинский	4	7745	Сунской	1	1238
Богородский	1	854	Котельничский	1	6445	Опаринский	1	1983	Тужинский	0	1371
Верхнекамский	1	5088	Куменский	0	3193	Оричевский	3	5163	Унинский	1	1762
Верхошижемский	1	1726	Лебяжский	1	1656	Орловский	2	2242	Уржумский	2	5561
Вятскополянский	9	11242	Лузкий	2	3257	Пижанский	1	2037	Фаленский	0	2043
Даровской	1	1933	Малмыжский	0	5025	Подосиновский	1	3011	Шабалинский	2	1803
Зуевский	5	4064	Мурашинский	2	2266	Санчурский	3	1645	Юрьянский	3	3451
Кикнурский	2	1655	Нагорский	3	1828	Свечинский	1	1343	Яранский	3	4710

Примечание: n – среднее количество детей, с впервые выявленным ОЛ за 15 лет; N – среднегодовая численность детского населения за 15 лет.

Среднегодовая заболеваемость ОЛ детского населения в районах Кировской области за 15 лет

Район	Z	Район	Z	Район	Z	Район	Z
Санчурский	12,16	Юрьянский	5,80	Кирово-чепецкий	4,00	Уржумский	2,34
Нагорский	10,94	Мурашинский	5,74	Лузкий	4,00	Подосиновский	2,32
Богородский	8,20	Сунской	5,65	Унинский	3,97	Верхнекамский	1,38
Зуевский	8,12	Вятскополянский	5,34	Оричевский	3,87	Котельничский	1,09
Белохолуницкий	8,01	Свечинский	5,21	Слободской	3,71	Арбажский	0
Кикнурский	7,85	МО Киров	4,37	Даровской	3,62	Куменский	0
Кильмезский	7,36	Яранский	4,25	Опаринский	3,52	Малмыжский	0
Советский	7,23	Лебяжский	4,23	Омутнинский	3,49	Немский	0
Шабалинский	7,21	Афанасьевский	4,11	Нолинский	3,48	Тужинский	0
Орловский	5,80	Верхошижемский	4,06	Пижанский	3,44	Фаленский	0

Примечание: Z – заболеваемость.

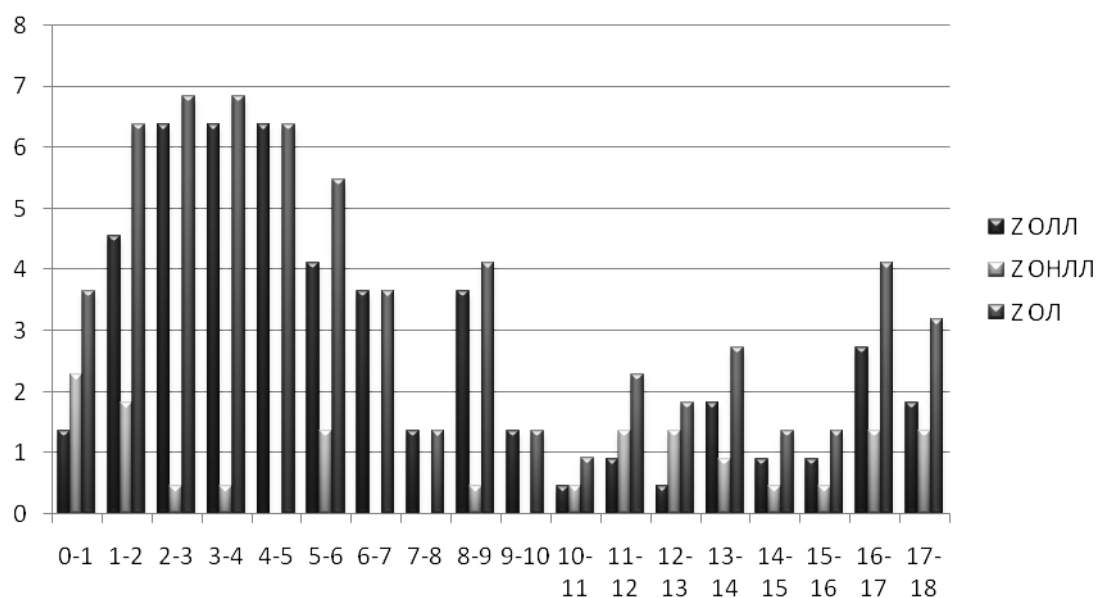


Рисунок 5. Заболеваемость ОЛ (ОЛЛ, ОНЛЛ) детского населения Кировской области за последние 15 лет по возрастам. Примечание: Z – заболеваемость

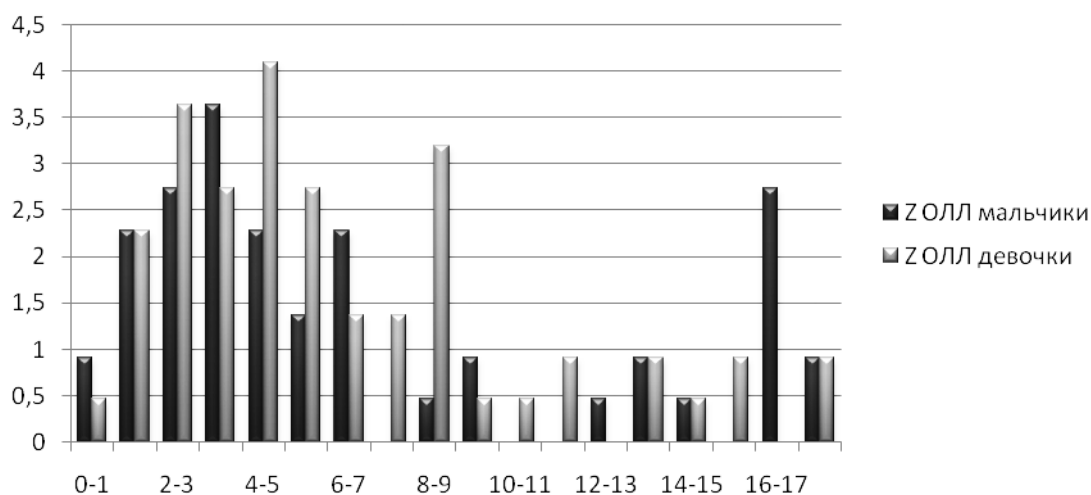


Рисунок 6. Заболеваемость ОЛЛ детского населения Кировской области за 15 лет по полу и возрасту. Примечание: Z – заболеваемость

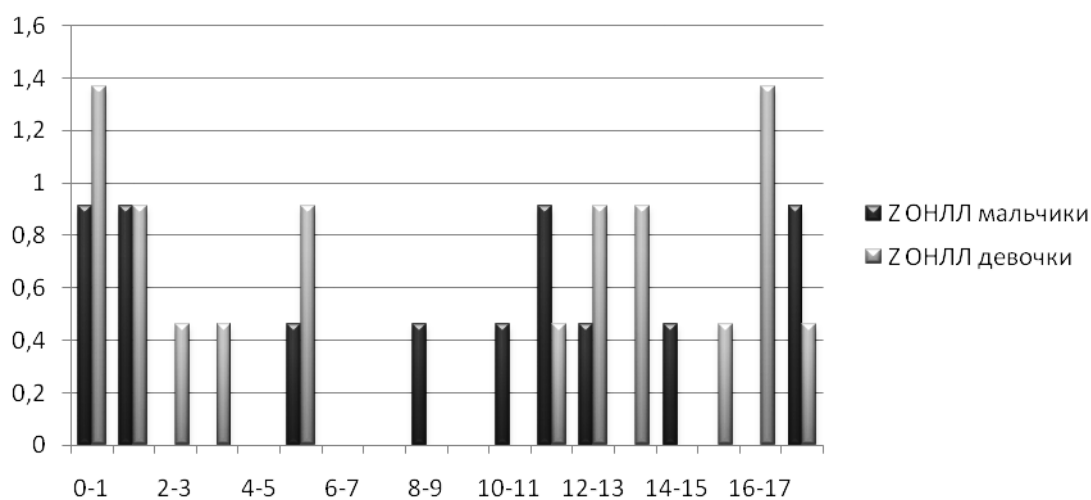


Рисунок 7. Заболеваемость ОНЛЛ детского населения Кировской области за 15 лет по полу и возрасту. Примечание: Z – заболеваемость

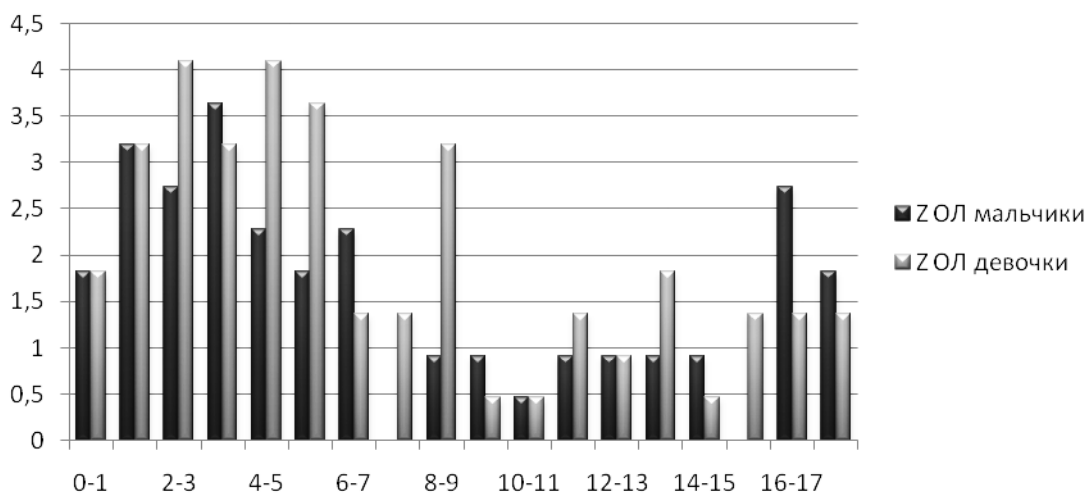


Рисунок 8. Заболеваемость ОЛ детского населения Кировской области за 15 лет по полу и возрасту. Примечание: Z – заболеваемость

Проведённый статистический анализ показал, что лейкоз встречается во всех возрастных группах, медиана возраста ОЛ – 5 лет (медиана ОЛЛ – 4 года, ОНЛЛ – 10,5 лет). Пик заболеваемости для ОЛ 2-3 года, для ОЛЛ – 2-4 года, для ОНЛЛ – до года (Рис. 5).

Подъем заболеваемости ОЛ и ОЛЛ для девочек и мальчиков Кировской области за 15 лет характерен для дошкольного возраста (61% и 67%, соответственно) (рис. 6, 8). ОНЛЛ у девочек и у мальчиков преобладает в подростковом возрасте (50%) (рис. 7).

Выводы

1. Заболеваемость ОЛ детского населения Кировской области составляет 4,24 на 100 000 детского населения.

2. В Кировской области ОЛ девочки болеют чаще мальчиков.

3. ОЛ и ОЛЛ встречаются во всех возрастных группах, медиана возраста — 5 лет и 4 года, соответственно. ОНЛЛ был выявлен не во всех возрастных группах, медиана — 10,5 лет.

3. Пик заболеваемости ОЛ для мальчиков — 3 года (ОЛЛ — 3 года, ОНЛЛ — 0-1, 11, 17 лет), ОЛ для девочек — 2 и 4 года (ОЛЛ — 4 года, ОНЛЛ — до 1 года и в 16 лет).

4. Высокая заболеваемость ОЛ у детей зарегистрирована в Санчурском и Нагорском районах, в 6 районах Кировской области не выявлены дети, больные ОЛ.

5. Анализ статистических данных о заболеваемости ОЛ среди детского населения Кировской области выявил тенденцию к росту, в структуре заболеваемости преобладают больные с ОЛЛ.

Список литературы

1. Педиатрия. Национальное руководство в двух томах/ глава 58, 59 Москва: Издательская группа «ГЕОТАР-Медиа», 2009. - т.1. - с. 941-943, 944

2. Маякова, С.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению детей, больных острыми лейкозами / С.А. Маякова, В.С. Немировченко, А.В. Попа // Общероссийский союз общественных объединений ассоциация онкологов России. Москва 2014, - с.2

3. Румянцев, А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков / А.Г. Румянцев А.А. Масчан, Ю.В. Румянцева, А.И. Карачунский / Москва, 2015, - с.8

4. Румянцев, А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого миелоидного лейкоза у детей / А.Г. Румянцев, А.А. Масчан / Москва, 2015, - с. 5

5. Масчан, М.А. Острый лимфобластный лейкоз у детей / М.А. Масчан, М.В. Мякова // онкогематология. 2006. № 1-2.- с. 50-63.

6. Балашева, И.И. 50 лет клинико-эпидемиологических исследований острых лейкозов у детей Томской области / И.И. Балашева, Р.Н. Лучинина, Л.Ф. Десятова // Сибирский онкологический журнал. - №1. - 2010. с.23-28

7. Беликова, Л.Ю. Пособие для врачей гематологов / Л.Ю. Беликова, А.И. Карачунский, Е.В. Самочатова. Москва : 2002. с. 51

8. Практическое руководство по детским болезням. Гематология /онкология детского возраста / под ред. Румянцев А.Г. Москва : ИД Медпрактика, 2004. т.4. с.518-536

9. Коцкая, Н.Н. Эпидемиологические характеристики острого лимфобластного лейкоза у детей омской области за период 1993-2010 гг. / Н.Н. Коцкая // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. Т. 11. №1. 2012 — с. 9-13.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

*Федоровская Н.С., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Минаева Н.В.,
Лагунова О.Р., Самарина С.В., Целоусова О.М., Парамонов И.В.*
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND FREQUENCY OF OCCURRENCE OF NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS IN THE KIROV REGION

*Fedorovskaya N. S., Rosin V. A., Diakonov D. A., Minaeva N. V.,
Lagunova O. R., Samarina S. V., Tselousova O. M., Paramonov I. V.*
Federal State Budgetary Institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology
and Blood Transfusion of Federal Medical and Biologic Agency», Kirov, Russia
(610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya, 72)
E-mail: fednadst@mail.ru, v.a.ros@mail.ru, diakonovda@rambler.ru,
mnvgem@gmail.com, lagunova@niigpk.ru, samarinasv2010@mail.ru,
tselousova@niigpk.ru, director@niigpk.ru

Цель исследования – анализ структуры и частоты встречаемости неходжкинских лимфом (НХЛ) среди населения Кировской области. В работу вошло 207 случаев первичной диагностики неходжкинских лимфопролиферативных заболеваний за 2015 – 2016 гг. Диагноз НХЛ формулировали в соответствии с классификацией ВОЗ (2008). Полученные сведения важны для создания комплекса мероприятий по профилактике данной патологии в регионе.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы; морфологические варианты; распространенность; эпидемиология

The aim of the study was to analyze the structure and frequency of occurrence of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) among the population of the Kirov region. The work included 207 cases of primary diagnosis of non-Hodgkin's lymphoproliferative diseases in 2015 - 2016. The diagnosis of NHL, formulated in accordance with the WHO classification (2008). The obtained information is important for creating a set of measures for the prevention of this pathology in the region.

Keywords: non-Hodgkin's lymphoma; morphological variants; prevalence; epidemiology

Введение. В структуре гематологических неоплазий неходжкинские лимфомы (НХЛ) занимают особое место ввиду их широкой распространенности и биологической гетерогенности. Многообразие нозологических форм этой группы заболеваний, схожесть их гистологических картин, способность маскироваться под другие патологические процессы вызывают существенные сложности диагностики. В последние годы во всем мире отмечается устойчивая тенденция роста заболеваемости НХЛ, особенно в старших возрастных группах [1]. Этот процесс объясняется улучшением качества дифференциальной диагностики за счет широкого внедрения молекулярных технологий, увеличением продолжительности жизни, а также

распространением вирусных и других инфекций, влияющих на лимфопоз [2]. Вместе с тем обнаруживается вариабельность заболеваемости НХЛ в зависимости от генетических особенностей популяции, экологических факторов [3]. Отмечены также региональные особенности в выявлении отдельных нозологических вариантов опухолей лимфоидной ткани, однако количество работ, посвященных данной проблеме, невелико. В этой связи появление новой информации по Кировской области дополнит имеющиеся сведения о распространенности НХЛ в различных регионах страны и может способствовать выявлению возможных этиологических факторов.

Цель исследования – анализ структуры и частоты встречаемости НХЛ на территории Кировской области.

Материалы и методы. Работа выполнена на базе лаборатории патоморфологии крови ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с ноября 2014 г. по ноябрь 2016 г. Планирование исследования осуществляли с учетом нововведений в организации оказания медицинской помощи онкогематологическим больным региона. Так, с ноября 2014 г. в Кировской области вступила в действие новая программа маршрутизации пациентов с подозрением на лимфопролиферативное заболевание.

В разработку вошли 207 пациентов с впервые установленным диагнозом НХЛ на основании гистологического и иммуногистохимического анализов биопсий лимфатических узлов или других органов и тканей (при экстра nodальной локализации опухоли). Диагностическую оценку проводили до назначения специфической терапии. В исследование не были включены случаи лимфом (В- и Т- лимфобластных лейкозов, плазмоклеточной миеломы и др.), диагностика которых выполнялась с помощью цитологического анализа и/или проточной флуориметрии образцов периферической крови и/или пунктатов костного мозга.

Все пациенты, участвовавшие в данном исследовании, жители города Кирова и Кировской области, их средний возраст составил $58,3 \pm 16,4$ лет с разбросом от 10 до 87 лет. Отмечалось небольшое численное преобладание лиц женского пола (53% женщин, 47% мужчин). Взрослых было 205, детей – 2.

Среди образцов биологического материала, направленного в лабораторию для диагностики, были преимущественно лимфоузлы (53,6%), а также другие органы и ткани: кожа, селезенка, миндалины и др. Для фиксации использовался 10% раствор забуференного формалина. Обезвоживание и заливка в парафин выполнялись по стандартным протоколам. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. После гистологической оценки препаратов составляли панель иммуногистохимических маркеров, необходимых для дифференциальной диагностики патологического процесса. При иммуногистохимическом окрашивании применяли иммунопероксидазный метод. Диагноз лимфомы формулировали на основании классификации ВОЗ

(2008) в сопоставлении с клинической информацией [4]. Формирование групп лимфоидных неоплазий выполняли с учетом общепринятых рекомендаций для иерархической систематизации лимфом при эпидемиологических исследованиях [5].

Результаты. Распределение морфологических подтипов НХЛ по частоте встречаемости отражены в таблице. Из представленных данных видно, что преобладали В-клеточные опухоли, которые составили 87,4% от всех лимфом.

Таблица.

Распределение морфологических вариантов НХЛ

Морфологический вариант	Абс, n=207	%
В-клеточные лимфомы		
Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома	70	33,8
Лимфома из малых лимфоцитов/ХЛЛ	28	13,5
Лимфома маргинальной зоны	28	13,5
Лимфома из клеток мантии	18	8,8
Плазмоклеточная миелома	13	6,3
Фолликулярная лимфома	11	5,3
Медиастенальная крупноклеточная В-клеточная лимфома	7	3,4
Лимфома Беркитта	3	1,4
Лимфоплазмочитарная лимфома	1	0,5
Волосатоклеточный лейкоз	1	0,5
Лимфобластная лимфома(лейкоз) из В-клеток предшественников	1	0,5
Т-клеточные лимфомы		
Анапластическая крупноклеточная лимфома	8	3,8
Лимфобластная лимфома(лейкоз) из Т-клеток предшественников	7	3,4
Грибовидный микоз	4	1,9
Т-клеточная НХЛ неспецифицированная	3	1,4
Ангиоиммунобластная лимфома	2	1,0
Первичная кожная Т-клеточная лимфома	1	0,5
Периферическая Т-клеточная лимфома	1	0,5

Наиболее часто встречающейся нозологией среди них оказалась диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома. Другие варианты В-клеточных новообразований - лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и лимфома маргинальной зоны определялись

в значительно меньшем проценте случаев. У пациентов с лимфомой маргинальной зоны чаще диагностировали нодальную форму заболевания (7,2%). Экстранодальная (3,9%) и селезеночная (2,4%) разновидности болезни выявляли реже. Следующей по встречаемости была лимфома из клеток мантии. Фолликулярная лимфома установлена у 11 пациентов, из них у 7 (63,6%) по морфологическому составу опухоли выявлен цитологический тип – Grade III, у 4 (36,4%) – Grade I и II. К вариантам В-клеточных лимфом с низкой представленностью в данной выборке (3% и менее) относились первичная медиастенальная крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, лимфо-плазмочитома, волосатоклеточный лейкоз.

Т-клеточные лимфомы составили 12,6% от всех НХЛ (26 случаев). Клетки опухолевого клона при этом экспрессировали пан-Т-клеточные антигены; во всех наблюдениях выявляли aberrантное выпадение одного или нескольких маркеров, что соответствует общепринятым критериям [7]. Наиболее частой формой заболеваний из этой группы была анапластическая крупноклеточная лимфома. В меньшем количестве определены лимфобластная лимфома (лейкоз) из Т-клеток предшественников и грибовидный микоз. Другие опухоли Т-клеточной природы: Т-клеточная неспецифицированная лимфома, ангиоиммунобластная лимфома, первичная кожная и периферическая Т-клеточные лимфомы – установлены в единичных случаях.

Выявление особенностей распространенности НХЛ в разных регионах страны остается актуальной задачей, решение которой позволит расширить представление об этиологии НХЛ и механизмах лимфомогенеза [8]. Считается, что на эпидемиологию лимфопролиферативных заболеваний существенное влияние оказывают этнические, социально-экономические, экологические и другие факторы, присущие определенной территории. Кроме того, предполагается, что факторы риска могут варьировать в зависимости от подтипа лимфомы. Так, установлено, что лимфому из малых лимфоцитов/ХЛЛ чаще регистрировали среди фермеров, подвергавшихся хроническому воздействию сельскохозяйственных химикатов. Для фолликулярных лимфом характерно преимущественное распространение в регионах с низким экономическим уровнем и высокой частотой инфекционных заболеваний, а также повышенная встречаемость в тех географических зонах, где зарегистрирован длительный контакт населения с пестицидами. Распространенность крупноклеточных лимфом повышена в промышленно развитых районах с загрязнением источников воды токсичными отходами [9, 10].

Для понимания механизмов лимфомогенеза, обуславливающих специфику встречаемости отдельных нозологических форм в Кировской области, определенное влияние на итоговый результат исследования оказала организационная структура онкологической помощи в регионе [11, 12]. Вместе с тем необходимы дополнительные исследования по выявлению воз-

можных ассоциаций с разнообразными факторами, действующими на население региона (инфекционные агенты, влияние окружающей среды, профессиональные вредности, питание и пр.), а также изучение генетической предрасположенности к возникновению отдельных вариантов лимфом.

Данные о распределении различных клинико-морфологических вариантов НХЛ в Кировской области служат дополнением к общей эпидемиологической картине распространенности этих заболеваний в нашей стране. Полученные сведения важны для поиска возможных этиологических факторов, создания комплекса мероприятий по профилактике патологии органов лимфоидной системы и обеспечению защиты окружающей среды, а также могут быть использованы при планировании бюджетного финансирования лечебно-диагностической помощи населению региона.

Список литературы

1. Palackdharry, C. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: why the increased incidence? / C. Palackdharry // *Oncology (Huntingt)*. – 1994. – Vol. 8 (8). – P. 67-73.
2. Weisenburger, D. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic / D. Weisenburger // *Ann.Oncol.* – 1994. – Vol.5. – P. 19-24.
3. Baris, D. Epidemiology of lymphomas / D. Baris, S. H. Zahm // *Curr.Opin.Oncol.* – 2000. – Vol.12 (5). – P. 383-394.
4. The 2016 revision of the World Health Organization classification of limfoid neoplasms / S. Swerdlow, E. Campo, S. Pileri [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol.127. – P. 2375-2390.
5. InterLymph hierarchical classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research based on the WHO classification (2008): update and future directions / J. Turner, L. Morton, M. Linet [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol.116. – P.90-98.
6. Anderson, J. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project / J. Anderson, J. Armitage, D. Weisenburger // *Ann.Oncol.* – 1998. – Vol.9 (7). – P. 717-720.
7. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин, 4-е изд. – Казань: Титул, 2008. – 624с.
8. Rationale and Design of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project / L. Morton, J. Sampson, J. Cerhan [et al.] // *J Natl Cancer Inst Monogr.* – 2014. – Vol. 48. – P. 1-14.
9. Environmental pollution and malignant lymphomas: a tentative contribution to geographic pathology / I. Hatzissabas, G. Krueger, J. Medina [et al.] // *Anticancer Res.* – 1993. – Vol.13 (2). – P. 411-417.
10. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis / J. Agopian, J. Navarro, A. Ga [et al.] // *J. Exp.Med.* – 2009. – Vol.206. – P. 1473-1483.
11. Криволапов, Ю.А. Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования первичных биопсий у 400 больных неходжкинскими лимфомами в Северо-Западном регионе России (в соответствии с классификацией ВОЗ)/ Ю.А. Криволапов // *Тер. архив.* – 2004. – № 7. – С. 64–70.
12. Федоровская, Н.С. Оценка частоты встречаемости различных вариантов неходжкинских лимфом по результатам работы лаборатории патоморфологии крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови / Н.С. Федоровская, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов [и др.] // *Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины.* – 2015. – №1. – С. 378-381.

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С., Киселева Е.Е.,
Кайтанджан Е.И., Стижак Н.П., Бурyleв В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский
научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального
медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

CLINICAL AND ETIOLOGICAL FEATURES OF VIRAL-BACTERIAL INFECTIONS IN PATIENTS WITH HEMOBLASTOSIS

Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E.,
Kaytandzhan E.I., Stizhak N.P., Burylev V.V.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.Petersburg
E-mail: vitnikcheb@mail.ru, bsshem@hotmail.com, venefika989@gmail.com,
kei_47@mail.ru, vitnikcheb@mail.ru, vitaliy_burylev@mail.ru

Изучены клинические и этиологические особенности вирусно-бактериальных и грибковых инфекций кровеносного русла у 64 больных гемобластозами, госпитализированных в Российский НИИ гематологии и трансфузиологии. Установлено преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными среди возбудителей сепсиса (69,2 и 30,8% соответственно). Однако сепсис, вызванный грамотрицательными бактериями, протекал значительно тяжелее, с высокой частотой летальных исходов. Показано, что развитие бактериемий достоверно чаще происходит на фоне обнаружения геномов цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барр.

Ключевые слова: инфекционные осложнения, герпесвирусы, сепсис, бактериемия, гемобластозы

Clinical and etiological features of viral-bacterial and fungal infections of the blood stream were studied in 64 patients with hemoblastosis hospitalized at the Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology. The predominance of Gram-positive bacteria over Gram-negative bacteria among the causative agents of sepsis was established (69.2 and 30.8%, respectively). However, sepsis caused by gram-negative bacteria was significantly more severe with a high incidence of deaths. It is shown that the development of bacteremia is significantly more frequent when the genomes of the cytomegalovirus and the Epstein-Barr virus are detected.

Keywords: infectious complications, herpesviruses sepsis, bacteremia, hemoblastosis

Введение. Современное лечение гемобластозов основано на применении цитостатических препаратов, высокодозной химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Их использование позволило добиться значительных успехов в лечении онкогематологических больных, однако привело к возникновению ряда побочных эффектов, связанных в первую очередь с развитием тяжелых инфекционных осложнений. Развитие инфекционных осложнений у иммуносупрессированных онкогематологических больных усугубляет течение основного заболевания и может стать причиной летального исхода. Известно, что большую роль в развитии инфекционных осложнений у онкогематологических больных наряду

с бактериями и микромицетами играют вирусы [1]. Особое место среди них занимают вирусы группы герпеса, поскольку они способны формировать латентную инфекцию и при отсутствии своевременной диагностики и терапии могут приводить к тяжелым последствиям. Однако роль вирусов группы герпеса при бактериемиях и сепсисе у онкогематологических больных изучена недостаточно и требует уточнения.

В работе была поставлена цель изучить клинические и этиологические особенности инфекций кровеносного русла у иммуносупрессированных онкогематологических больных и уточнить роль герпесвирусных инфекций в их развитии.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 64 пациента, госпитализированных в гематологическую клинику ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» в период с 2008 по 2016 год. У всех указанных больных были выявлены эпизоды обнаружения патогенов в крови. Характеристика обследованных пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика обследованных пациентов

Клинический диагноз	Число больных	Мужчины	Женщины	Средний возраст, лет
Множественная миелома	6	3	3	58,0 (44-79)
Острый лимфобластный лейкоз	8	3	5	34,0 (19-65)
Острый миелобластный лейкоз	27	11	16	52,4 (22-74)
Хронический лимфолейкоз	8	7	1	55,8 (46-72)
хронический миелолейкоз	5	4	1	44,8 (42-66)
Неходжкинские лимфомы	8	7	1	44,9 (18-71)
Миелодиспластический синдром	2	1	1	61,5 (56-67)
Всего	64	36	28	

Инфекционные осложнения диагностировали на основании клинических и лабораторных исследований. В период нейтропении IV степени (содержание нейтрофилов в периферической крови $<0,5 \times 10^9/\text{л}$) инфекционные осложнения устанавливались на основании однократного повышения температуры тела $>38,0^\circ\text{C}$ или повторного повышения $>38,5^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, не объясняемых течением основного заболевания и проводимой терапией.

Диагноз у всех наблюдаемых больных подтверждался данными исследования периферической крови, пунктата костного мозга, трепанобиоптата подвздошной кости, изучением цитогенетических, молекулярно-биологических и иммунологических показателей крови и костного мозга, результатами рентгенологического исследования органов грудной клетки и костей

скелета, ультразвукового исследования органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Диагностический процесс при неходжкинской лимфоме (НХЛ) включал в себя также иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани лимфатического узла и трепанобиоптата, компьютерную и магнитно-резонансную томографии органов грудной и брюшной полости, забрюшинного пространства.

Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) устанавливали при регистрации, по крайней мере, 2 из 4 клинико-лабораторных признаков [2]: температура тела $>38^{\circ}\text{C}$ или $<36^{\circ}\text{C}$; частота сердечных сокращений $>90/\text{мин}$; частота дыхания $>20/\text{мин}$ или гипервентиляция ($\text{PaCO}_2 < 32 \text{ мм рт.ст.}$); лейкоциты крови $>12 \times 10^9/\text{л}$ или $<4 \times 10^9/\text{л}$, или незрелых форм $>10\%$.

Диагностика сепсиса основывалась на клинических данных и подтверждалась выявлением возбудителя в крови и других биосубстратах.

Забор крови для проведения бактериологического исследования выполнялся до начала противомикробного лечения. У большинства больных образцы крови забирали 2-3 и более раз за период нахождения на стационарном лечении. Микробиологические анализы проводились по единой методике в течение всего периода исследования, в соответствии с действующей нормативной документацией. Определение чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам осуществлялось диско-диффузионным методом [3].

Идентификацию культур микромицетов проводили по их морфологическим свойствам. Оценивали характер роста культуры гриба на агаровых (с использованием хромагара) и жидких питательных средах. Определяли ферментативную активность, филаментацию, т.к. чаще всего обнаруживали дрожжеподобные грибы рода *Candida* [4]. Для определения галактоманна в сыворотке крови использовали метод одностадийного иммуноферментного анализа с помощью диагностической тест-системы «PlateliaTMAspergillusAg» (Bio-RadLaboratories, США). Диагностически значимым считался индекс $>0,5$.

Для выявления в крови геномов вирусов группы герпеса (герпеса 1, 2 типов (ВПГ-1,2), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6)) использовали полимеразную цепную реакцию в мультипраймерном формате в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Применяли наборы производства ООО «ИнтерЛабСервис». Заявленная аналитическая чувствительность тест-систем для выявления ВПГ-1,2 составляла $5,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ ГЭ/мл. Для ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6 – 5 копий ДНК на 105 клеток крови.

При выявлении инфекционных осложнений немедленно начинали антибактериальную терапию. Выбор первого препарата, как правило, осуществляли эмпирически в зависимости от клинической и эпидемиологической ситуации, в соответствии с общепринятой методикой, в среднетерапевтических дозах [5]. После получения результатов бактериологического

исследования и определения чувствительности к антибиотикам проводили коррекцию антибиотикотерапии.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы STATISTICA 6.1.

Результаты и обсуждение

Анализ видового состава микроорганизмов, выделенных из крови онкогематологических больных, выявил преобладание грамположительных бактерий. За исследованный период с 2008 по 2015 гг. частота выявления грамположительных бактерий составила 66,6%, причем коагулазонегативные стафилококки (КНС) составили 57,7% из общего числа выделенных патогенов. Частота выявления грамотрицательных бактерий составила 27,8%. Среди грамотрицательных микроорганизмов чаще всего выделялись *Escherichia coli*, а в целом бактерии семейства *Enterobacteriaceae* составили 21%. *Acinetobacter spp.* и *Pseudomonas spp.* были выявлены в 3,1% и 2,5% случаев соответственно.

Была проанализирована также частота выявления микромицетов в крови обследованных больных. Установлена тенденция к увеличению удельного веса микромицетов среди других инфекционных агентов. Так, в 2008-2009 гг. из крови высевались исключительно бактерии и вплоть до 2011 года частота выявления микромицетов не превышала 4,5%. В то же время доля микромицетов среди высеваемых возбудителей в 2011, 2012, 2013 и 2015 годах составила, соответственно, 11,5%, 5,3%, 5,5% и 16,7%. При этом в 55% случаев выявлены дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Выявлено 2 случая смешанной бактериально-грибковой инфекции: в одном случае выделены КНС и дрожжевые грибы *Rhodotorula spp.*, у другого пациента вместе с КНС дважды за 10 дней выделялся *Aspergillus flavus*.

Выше было отмечено, что большое количество работ указывают на значительную роль герпесвирусов в развитии инфекционных осложнений у онкогематологических больных [1]. Однако роль вирусов группы герпеса при бактериемиях и сепсисе у этих больных изучена недостаточно и требует уточнения.

Ранее нами было показано, что геном вирусов группы герпеса достоверно чаще выявляется в крови онкогематологических больных с бактериемиями по сравнению с пациентами у которых бактерии в крови обнаружены не были. Особенно это касается геномов вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса.[6]

В данной работе были изучены клинические проявления и исходы бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных, а также исследована роль герпесвирусов в их развитии.

Из обследованных 64 больных сепсис был диагностирован у 33 пациентов. В 14 случаях он был вызван грамотрицательными микробами и в 19-ти – грамположительными. Установлено, что грамотрицательный сепсис протекает значительно тяжелее грамположительного. В четырех из 14 слу-

чаев наблюдался септический шок. В пяти диагностирована ассоциированная герпесвирус-бактериальная инфекция: в двух случаях с ЦМВ, в одном с ВЭБ. В одном случае наблюдалась ассоциация с 3 вирусами (ВПГ1,2, ВЭБ и ВГЧ-6) и в одном – с 4 (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ1,2 и ВГЧ-6). При этом установлено, что при сочетанной бактериально-вирусной инфекции тяжесть течения инфекционного процесса возрастает (табл.2).

Таблица 2.

Течение и исход бактериальных и смешанных герпесвируско-бактериальных инфекций

Сепсис		Количество случаев	Летальный исход
Грамотрицательный n=14	В сочетании с герпесвирусами	5	4
	Без вирусов	9	4
Грамположительный n=19	В сочетании с герпесвирусами	6	0-
	Без вирусов	13	2

Из 9 случаев грамотрицательного сепсиса без вирусной инфекции умерло 4 пациента, а при инфекции, ассоциированной с герпесвирусами из 5 случаев 4 закончились летально.

Заключение

Таким образом, представленные материалы указывают на необходимость постоянного мониторинга возбудителей инфекций у онкогематологических больных. Развитие тяжелых инфекционных осложнений (пневмонии, сепсиса) нередко происходит на фоне присоединения грибковых инфекций. Установлено, что у больных гемобластозами значительную роль играют вирусы, в частности вирусы группы герпеса, способствующие значительному утяжелению течения заболевания.

Список литературы

1. Чеботкевич, В.Н. Вирусные инфекции у онкогематологических больных (патогенез, диагностика, клиника, профилактика, лечение) / В.Н. Чеботкевич, К.М. Абдулкадыров // 2002. – Спб, РОЗА МИРА. – 134 с.
2. Сепсис: классификация, клиничко-диагностическая концепция и лечение / Практическое руководство. Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. 3-е изд.: МИА, 2013. - 360 с.
3. Поляк, М.С. Определение чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам «методом дисков» / М.С. Поляк – Спб., 1997. - 20 с.
4. Стижак Н.П., Е.И. Кайтанджан. Пейзаж микромицетов, выделенных из биоматериалов от больных гематологических клиник РосНИИГТ в период 2009-2011 гг. / Н.П. Стижак, Е.И. Кайтанджан // Вестник гематологии. - 2012. - т.VIII. - № 1. - С. 84.
5. Бессмельцев, С.С. Множественная миелома:руководство для врачей / С.С. Бессмельцев, К.М. Абдулкадыров. - М: МК, 2016. - 504 с.
6. Этиология бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами / Е.Е. Щетинкина, В.В. Бурылев, Е.И. Кайтанджан [идр.] // Биомедицинский журнал Medline. - 2014. - Т.15. - статья 41. - С. 511-518.

ОСТРЫЕ ПОРФИРИИ

Черепанова В.В., Курьшцева М.А.

*ГБУЗ НО «Городская больница №33», Нижний Новгород, Россия
(Нижний Новгород, пр. Ленина, д. 54)*

ACUTE PORPHYRIA

Cherepanova V.V., Kuryshcheva M.A.

*Public health facility city clinical hospital № 33 (Nizhegorolsky region) Russia
(Nizhny Novgorod, Lenin Avenue, 54)
E-mail: cherepanova.v@inbox.ru, Marina Kuryshcheva <mari196710@rambler.ru*

Острые порфирии редкие заболевания, представляющие патологию, связанную с наследственными или приобретенными аномалиями биосинтеза гема. Особенности этих нозологических форм являются: преобладание среди лабораторно определяемых метаболитов предшественников порфиринов, быстро прогрессирующее клиническое течение заболевания. Описаны трудности диагностики острой порфирии, современная классификация, пример дебюта острой порфирии.

Ключевые слова: острая порфирия, диагностика, результаты лечения, нормосанг

Acute porphyria is a rare (orphan) disease affects a small part of the population and represents the pathology associated with hereditary or acquired abnormalities of the biosynthesis of heme. The main features that distinguish these nosological forms from other forms of porphyry, are: the prevalence of precursors of porphyrins among laboratory-defined metabolites and rapid clinical progression of the disease. The article describes the difficulties in the diagnosis of acute porphyria, modern classification, an example of the debut of acute porphyria.

Keywords: acute porphyria, diagnosis, treatment results, normosang

Порфирии – наследственные болезни, характеризующиеся нарушением биосинтеза гема, при которых в органах и тканях накапливаются порфирины (тетрапирролы) или их предшественники.

Этиопатогенез. Развитие различных форм порфирий связано с нарушениями в цикле биосинтеза гема и имеет общие черты. В основе развития каждой формы порфирии лежит генетически обусловленное снижение или отсутствие активности определённого фермента в цепи биосинтеза гема, в результате чего происходит избыточное накопление продуктов порфиринового обмена перед ступенью, где находится дефектный фермент (рис. 1). При токсических концентрациях проявляется клиника болезни. Гены ферментов расположены на разных хромосомах и не имеют групповой сцепленности. Снижение активности фермента до 50% от нормы может не иметь клинических проявлений. Распространенность острых форм порфирии составляет 7-12 случаев на 100 000 здоровых людей. В тоже время распространенность бессимптомного носительства генетических дефектов, приводящих к острым порфириям, составляет 5-100 случаев на 100 000 человек. Порфирия классифицируется в соответствии с тремя фактами: основное место продукции аномального порфирина (печень или эритроциты); острая или подострая клиническая форма; ферментатические нарушения при синтезе гема (таблица).

Классификация острых и неострых порфирий
(цит. по P. Poblete-Gutierrez, T. Wiederholt, H.F. Merk, J. Frank, 2006)

Острая порфирия	Наименование гена и локус	Тип наследования	Важные аспекты
Острая перемежающаяся порфирия	Порфобилиноген деаминаза; 11q24.1-q24.2	Аутосомно-доминантный	Наиболее обычный тип порфирии; нет кожных симптомов
Вариегатная порфирия	Протопорфириноген оксидаза; 1q22-23	Аутосомно-доминантный	Основатели мутаций идентифицируются в Южной Африке и Чили; кожные симптомы могут иметь место
Наследственная копропорфирия	Копропорфириноген оксидаза; 3q12	Аутосомно-доминантный	Малораспространенный; Возможны кожные симптомы
Порфирия, обусловленная дефицитом дегидратазы АЛК	Дегидратаза АЛК; 9q34	Аутосомно-рецессивный	Очень редкий (в мире описано менее 10 случаев)
Неострые порфирии	Наименование гена и локус	Тип наследования	Важные аспекты
Поздняя кожная порфирия	Уропорфириноген декарбоксилаза ; 1p34	Аутосомно-доминантный	Наиболее распространенный тип порфирии; встречаются наследственные и приобретенные варианты
Эритропоэтическая протопорфирия	Феррохелатаза; 18q21.3	Аутосомно-доминантный	Приблизительно в 5% случаев может иметь место тяжелая болезнь печени; описано рецессивное наследование
Неострые порфирии	Наименование гена и локус	Тип наследования	Важные аспекты
Врожденная эритропоэтическая протопорфирия	Уропорфирноген III синтаза; 10q25.3-q26.3	Аутосомно-доминантный	Очень тяжелое клиническое течение; мутации; гемолитическая анемия; депозиты порфирина в костях и зубах
Гепатоэритропоэтическая порфирия	Уропорфириноген декарбоксилаза; 1p34	Аутосомно-доминантный	Гомозиготный вариант поздней кожной порфирии; весьма увеличивает фотосенсибилизацию.

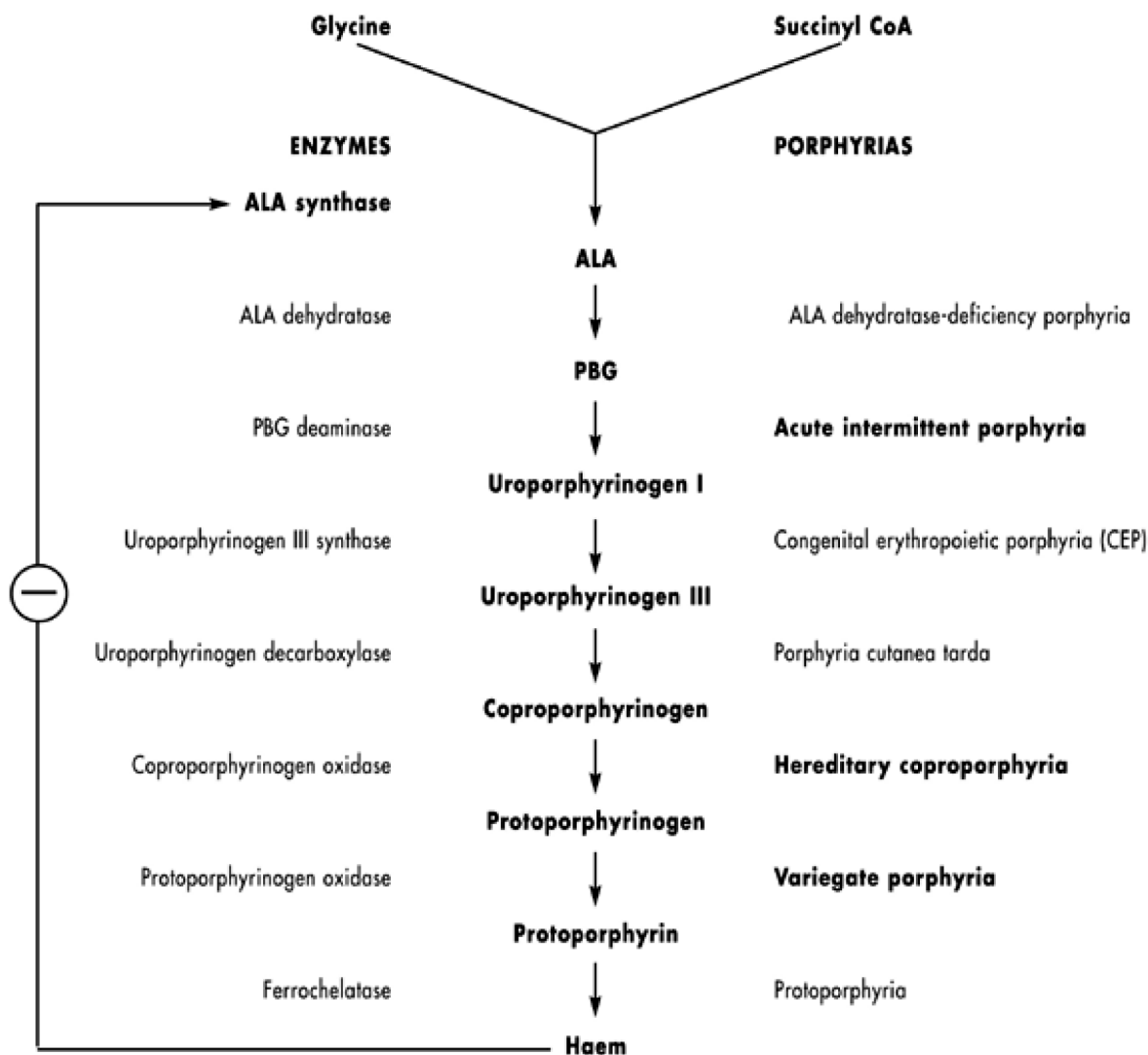


Рисунок 1. Схема биосинтеза гема

Факторы, провоцирующие острое течение заболевания: лекарственные препараты (включая пероральные контрацептивные средства); контакт с ядохимикатами (к примеру, с/хозяйственные удобрения); нарушение гормонального профиля у женщин в предменструальный период или при беременности; резкое изменение характера питания, голодание; инфекционные заболевания; стрессовые ситуации; прием алкоголя. Эти факторы приводят к повышенному потреблению гема. Как следствие, вышеперечисленные факторы стимулируют активность первого фермента системы биосинтеза гема — синтетазы δ-аминолевулиновой кислоты, что приводит к ускорению синтеза всех промежуточных продуктов метаболизма порфиринов. В случае острой перемежающейся порфирии, которая ассоциирована с пониженной активностью порфобилиногендезаминазы (другое название оксиметилбилансинтетаза третьего фермента цикла синтеза гема) происходит избыточное накопление δ-аминолевулиновой кислоты (δ-АЛК) и порфобилиногена (ПБГ), вызывающее клиническое проявление болезни. Чаще всего заболевание проявляется после достижения пубертатного возраста [1, 3]. Среди

заболевших преобладают лица женского пола, что связано с функционированием их репродуктивной системы. В клинике острой перемежающейся порфирии (ОПП) доминирует поражение нервной системы, обусловленные избытком δ -АЛК и ПБГ в тканях больного, приводящих к сегментарной демиелинизации нервных волокон с нарушением их проводимости. От дебюта заболевания и до верификации диагноза зачастую проходил от одного до четырех месяцев, а в редких случаях несколько лет [2]. За это время у больных успевают сформироваться тяжелые осложнения, требующие длительного и дорогостоящего лечения. До недавнего времени летальность при ОПП в среднем составляла 40-60%. Своевременная точная диагностика и адекватная терапия позволяют спасти подавляющее большинство больных.

Диагностика острой порфирии

Предположительный диагноз острой порфирии у такого рода больных может быть поставлен на основании появления окрашенной мочи во время приступа — от слегка розового до красно-бурого цвета, что становится еще более заметным при стоянии мочи на свету. Розовый цвет мочи обусловлен повышенным содержанием в ней порфиринов, а красно-бурый — присутствием порфобилина, продукта деградации порфобилиногена. Для постановки диагноза рекомендуется провести следующие лабораторные исследования: 1) качественный тест мочи с реактивом Эрлиха на избыток порфобилиногена (порфобилиноген реагирует с реактивом Эрлиха, образуя в кислом растворе окрашенный продукт розово-красного цвета); 2) определение общих порфиринов и их предшественников — ПБГ и δ -аминолевулиновой кислоты (АЛК) в моче. В норме содержание общих порфиринов в моче не превышает 0.15 мг/л; ПБГ — 2 мг/л; АЛК — 4.5 мг/л.; 3) определение общих порфиринов в кале. У здоровых людей содержание общих порфиринов в кале < 200 нмоль/г сухого веса; 4) определение активности фермента порфобилиноген-дезаминазы (в случае ОПП), копропорфириноген-оксидазы (в случае наследственной копропорфирии) и протопорфириноген-оксидазы (в случае вариетатной порфирии); 5) проведение молекулярного анализа ДНК.

Клиника острой порфирии

Наиболее характерные клинические синдромы этого заболевания. I. Абдоминальный — боли в животе, как правило в эпигастральной или правой подвздошной областях, реже не имеют четкой локализации; чаще всего носят приступообразный характер, иногда бывают постоянными, продолжающимися несколько часов или дней; тошнота, рвота; запор, реже понос. II. Сердечно-сосудистый: стойкая синусовая тахикардия (до 160 ударов в минуту); гипертония. III. Неврологический: мышечная атония (затрагивает чаще мышцы конечностей и пояса); боли в конечностях, голове, шее и грудной клетке; потеря чувствительности (наиболее выражена в плечевой и бедренной областях); поражение черепно-мозговых нервов (в виде дисфагии, диплопии, афонии, пареза лицевого и глазодвигательного нервов); нарушение тазовых функций; двигательные расстройства в виде вялых парезов и

параличей; паралич дыхания. IV. Расстройства психики: бессонница; сильное беспокойство; депрессивные и истерические компоненты; спутанность сознания и дезориентация; зрительные и слуховые галлюцинации; тонико-клонические судороги; мании; коматозное состояние; эпилептические припадки. V. Кожный (только для больных с наследственной копропорфирией и вариетатной порфирией): повышенная фоточувствительность; изменение пигментации.

Лечение острых порфирий. Заместительная терапия аргинатом гема (3 мг/кг в/в капельно 1 раз в сутки в течение 4-7 дней); углеводная нагрузка; элиминация порфириновых метаболитов серией плазмаферезов, иногда гемодиализацией, объем эксфузии 1/3 объема циркулирующей плазмы за сеанс, частота 2-3 раза в неделю, курс – 10 сеансов; введение избыточного количества углеводов (200-600 г сухого вещества глюкозы) – глюкоза 40%, 1000 мл в/в капельно 1 раз в сутки в течение 2-4 недель; рибоксин 2%, 10 мл в 100-200 мл 0,9% раствора NaCl, в/в капельно 1-2 раза в сутки в течение 2-4 недель; подавлению вегетативной симптоматики при приступе ОП способствуют инъекции октреотида в дозе 100-300 мкг/сут подкожно 1-3 раза в сутки на протяжении от 3 недель до 6 мес., в сочетании с п/а; лечебная физкультура, массаж.

Профилактика острых приступов заболевания у членов семьи больного. Все кровные родственники больного обязательно должны обследоваться на предмет носительства аномального гена. В случае положительного результата они должны быть предупреждены об особенностях заболевания, об угрожающих факторах, провоцирующих острые его приступы. В данной работе описано клиническое наблюдение манифестации и клинического течения острой порфирии.

Клиническое наблюдение. Больная N. Дата рождения — 14.02.1980 г. Поступила 29.05.13- с жалобами на повышение t тела до 38,5°C, онемение конечностей, боли в животе, боли в поясничной области. Заболела остро 02.05.13, после пикника проведенного на свежем воздухе в солнечный день, имело место употребление алкоголя. Появились боли в животе, повышение температуры. Пациентка получала помощь на дому по поводу обострения хронического цистита. В связи с отсутствием эффекта от лечения была госпитализирована в стационар по месту жительства с подозрением на обострение хронического пиелонефрита, в последующем переведена в нефрологическое отделение, где с 30.05.13 отмечена отрицательная динамика в виде прогрессирования неврологического дефицита: развитие вялого тетрапареза, дизартрии, нарушения тазовых функций, двустороннего пареза лицевых нервов, бульбарного синдрома; 31.05.13 переведена в отделение реанимации. Состояние при осмотре в отделении тяжелое. Больная в сознании, быстро истощается, эйфорична. Дыхание – самостоятельное с ЧД 20 в 1 мин., с периодической инсuffляцией кислорода через маску со скоростью 1 – 3 л/мин, в легких дыхание жесткое, хрипов нет, SaO₂ – 99%. Тоны сердца

– ритмичные чистые, гемодинамика – ровная: АД – 125/80 мм.рт.ст., ЧСС – 125 в мин. Живот мягкий безболезненный, питание с помощью мед. персонала перорально. Физиологические отправления: стул самостоятельный произвольный до 2 раз в сутки, диурез – адекватный. Неврологический статус: менингеальные симптомы и патологические стопные знаки не выявляются. Зрачки D=S, корнеальные и зрачковые рефлексы – живые, полуптоз с 2 сторон. Глоточные рефлексы – снижены. Мышечный тонус конечностей несколько снижен. Активные движения в нижних конечностях сохранены в кончиках пальцев, в верхних конечностях – сила до 2 баллов. Болевая, проприоцептивная чувствительность – снижена с уровня С7 до LII-LIII. Фасцикуляции и фибрилляций не отмечается. Сухожильные рефлексы снижены. Нарушение тазовых функций по типу недержания.

ОАК от 19.06.13: НВ— 10^9 г/л, Нt-32%, Эр— $3,32 \times 10^{12}$ /л, Le— $13,5 \times 10^9$ /л, П/Я—4, С/Я—69, Э—1, М—5, Лим—21, Тг— 180×10^9 /л, ретикулоциты 15%. Сывороточное железо — 9,9 ммоль/л, ферритин — 326,28 ng/ml. Анализ мочи от 17.06.13: цвет желтый, реакция нейтральная, уд.вес 1025, прозрачность неполная, Le—30-32 в п/з. Посев мочи от 30.05.13: E.coli 106 КОЭ. Биохимические исследования: фибриноген — 2,76 г/л, АсАт-51 мкмоль/л; АлАт 29,9 мкмоль/л; глюкоза крови 4,6 ммоль/л; мочевины крови 5,22 ммоль/л; общий белок — 51 г/л; креатинин – 93 ммоль/л. Трехкратные посева крови на стерильность – отрицательные. **Порфирины в моче от 19.06.13:** общие порфирины в суточной моче – 0,37 мг/л (N 0-0,15); порфобилиноген в разовой моче - 32,6 мг/л (N 0-2); дельта-аминолевуленовая кислота — 10,7 мг/л (N 0,1-4,5).

МРТ головного мозга от 30.05.13: признаки очаговых изменений обоих полушарий дисциркуляторного характера. МРТ от 30.05.13: признаки дегенеративных изменений грудного отдела позвоночника. Исследования спинномозговой жидкости от 31.05.13: бесцветная, неполной прозрачности, белок – 0,297%, Le-0-1, Ер 8-10, цитоз -1кл. ПЦР спинномозговой жидкости – возбудителей гнойных и серозных менингитов не выявлено. УЗИ органов малого таза от 04.06.13: признаки параовариальной кисты справа или гидросальпинкса справа, свободной жидкости 40 мл. УЗИ органов брюшной полости от 19.06.13: синдром «выделяющихся» пирамидок. Свободной жидкости в брюшной полости не выявлено. КТ брюшной полости от 05.06.13: гепатомегалия, хронических панкреатит. КТ малого таза от 06.05.13: киста правого яичника, лимфоаденопатия. Рентгенография органов грудной клетки от 17.06.13: без патологии. ЭХО-КС от 30.05.13: гипертрофия ЛЖ, пролапс митрального клапана I степени.

Клинический диагноз: Основное заболевание: Острая порфирия. Острый период. Тяжелое течение. *Осложнение основного заболевания:* сенсорно-моторная полинейропатия; тетраплегия, энцефалопатия, бульбарный синдром; гиперкинетический синдром. *Сопутствующие заболевания:* Параовариальная киста правого яичника. Гепатомегалия. Лимфоаденопа-

тия малого таза неуточненного генеза. Мочевая инфекция.

Проведенное лечение. Был установлен ЦВК. Дыхание – ИВЛ через трахеостомическую трубку в режиме SIMV PSV f-12 It-1,1 FiO₂ 45% РЕЕР-5 PCV-14 PSV-13. Проведен плазмаферез № 6 с общим объемом удаленной плазмы ~ 9,5 литров; введение нормосанга (25.06 – 28.06.2013 из расчета 3 мг/кг 1 раз в сутки в/в) — на фоне патогенетической терапии развился медикаментозный дерматит; углеводная нагрузка; ванкомицин, поляризирующая смесь, стабизол, фраксипарин, ригевидон, рефортан, реамберин, панкреатин, витамины группы В, цитофлавин, стерофундин. Питание через назоэнтеральный зонд, зондовое питание «Нутризон –стандарт» 30-60 мл/час. Каждый лекарственный препарат проверялся по списку, разрешенных к использованию при острых порфириях. После проведенного курса лечения препаратом «Нормосанг» отмечалась положительная динамика в виде увеличения объема движений мимической мускулатуры, уменьшения степени артралгий, снижение степени гипертермии, увеличение активности дыхательной мускулатуры. Дальнейшее лечение больной проводилось в центре орфанных заболеваний (г. Москва) - проведен дополнительный курс аргинатом гема, начаты реабилитационные мероприятия (ЛФК, массаж, высаживание в кровати, постановка на ноги).

Список литературы

1. The porphyrias:clinical presentation, diagnosis and treatment/ P. Poblete-Gutierrez, T. Wiederholt, H.F. Merk, J.Frank // Eur J Dermatol 2006; 16 (3). – P. 230-40.
2. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых порфирий / Составитель Я.С. Пустовойт. – Москва – 2013. – 37 с.
3. The porphyrias A. Kappas, S. Sassa, R. Galbraith, Y. Nordmann / // In: Scriverer CR, Beaudet A.L, Sly W.S, Valle D, editors. Metabolic basis of inherited disease. – 7 th ed. New York: McGraw-Hill. – 1995. – P. 2103-59.



**ВОПРОСЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК**

АНАЛИЗ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ХИМЕРИЗМА НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ

Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Зорина Н.А., Минаева Н.В.,
Хоробрых М.Н., Коряковцева Т.А.

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров,
Россия (610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

ANALYSIS OF CHIMERISM AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON THE BASE OF THE STUDY OF RED CELL ANTIGENS

Butina E. V., Zaitseva G. A., Zorina N. A., Minaeva N. V.,
Khorobrykh M. N., Koryakovtseva T. A.

FSBIS «Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-
biological Agency», Kirov, Russia (610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

E-mail: butina@niigpk.ru, zaytseva@niigpk.ru, zorina@niigpk.ru,
minaeva@niigpk.ru, khmn-nii@mail.ru

Исследование антигенов эритроцитов является информативным, чувствительным, простым в применении и экономичным методом исследования посттрансплантационного донорского химеризма.

Ключевые слова: химеризм, аллоТГСК, антигены эритроцитов

The study of red cell antigens is an informative, sensitive, easy-to-use and relatively inexpensive method for monitoring post-transplant donor chimerism.

Keywords: chimerism, allo-HSCT, red blood cell antigens

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) является единственным потенциально излечивающим способом достижения долгосрочной выживаемости пациентов с тяжелыми заболеваниями крови [1]. Основные осложнения аллоТГСК связаны с реакцией «трансплантат против хозяина», отторжением трансплантата, рецидивом основного заболевания и инфекционными осложнениями [2]. Соответственно, выбор чувствительных методов оценки посттрансплантационного донорского химеризма (ДХ) является крайне актуальным [3]. Известны способы диагностики ДХ, основанные на цитогенетическом анализе [4], амплификации высокополиморфных отрезков ДНК - tandemных повторяющихся блоков ДНК (VNTR - variable number tandem repeats и STR - short tandem repeats) [5], исследовании биаллельных полиморфизмов InDel (инсерции-делеции) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [6]. Несмотря на разнообразие методов мониторинга химеризма, в основе всех протоколов исследования лежит алгоритм, включающий в себя поиск генетических различий донора и реципиента, определение информативных маркеров, анализ ДХ после трансплантации с проведением качественного и количественного анализа [7].

Определение фенотипа эритроцитов после пересадки костного мозга

позволяет оценить интенсивность эритропоэза из донорского ростка кроветворения, т.е. провести мониторинг посттрансплантационного химеризма. Преимущества данного способа заключаются в простоте и высокой скорости выполнения. Недостатками считаются относительно низкая чувствительность (1-5%) и возможность использования не ранее, чем через 4-6 недель после аллотГСК [1].

Известно, что маркер, используемый в качестве информативной метки, должен встречаться в популяции с частотой, близкой к менделевскому распределению, при котором лица, гомозиготные по одному из антигенов, соотносятся с гетерозиготами как 1:2:1. Данное правило справедливо для биаллельных генетических систем. Однако информативным может стать и маркер из систем с другим типом наследования, например из системы АВО, в которой, несмотря на наличие только двух антигенов (А и В), количество возможных фенотипов равняется четырем (О, А, В, АВ).

На основании обследования 11566 доноров компонентов крови, проживающих на территории города Кирова и области, определена частота встречаемости антигенов, фенотипов и соотношение фенотипов эритроцитов между собой (табл. 1). Как видно из таблицы 1, наиболее близкой к «нормальному» распределению является распределение в популяции антигенов С и с в системе Резус и М и N в системе MNS.

Таблица 1.

Частота встречаемости антигенных сочетаний, используемых в качестве информативных маркеров ДХ

Система	Фенотип	Частота встречаемости в популяции	Соотношение фенотипов
АВО	О	37,66%,	4:3:2:1
	А	29,84%;	
	В	22,98	
	АВ	9,53	
Резус	D-пол	83,13	8:2
	D-отр	16,87	
Резус	СС	19,43	2:5:3
	Сс	46,82	
	сс	33,75	
Резус	ЕЕ	3,23	1:10:22
	Ее	28,83	
	ее	67,94	
Келл	К-пол	95,19	19:1
	К-отр	4,81	
MNS	ММ	28,33	3:5:2
	МN	50,0	
	NN	21,67	

MNS	SS	10,1	1:4:4
	Ss	45,7	
	ss	44,2	
Даффи	Fya Fya	13,8	1:3:5
	Fya Fyb	34,8	
	Fyb Fyb	51,5	
Левис	Lea Lea	74,8	75:24:1
	Lea Leb	24,1	
	Leb Leb	1,1	
Кидд	Jk a Jk a	27,2	3:2:5
	Jk a Jk b	22,4	
	Jk a Jk a	50,4	

При анализе возможности использования антигенов эритроцитов в качестве посттрансплантационной метки были изучены фенотипы эритроцитов в 24 парах донор-реципиент. Для 8 пациентов доноры были подобраны в регистре потенциальных доноров ФГБУ РМНПЦ «Росплазма» ФМБА России. Для 16 больных донорами явились их родственники (сиблинги или родители), идентичные пациентам по системе HLA в 14 случаях и гаплоидентичные – в двух. АллотТГСК были выполнены в отделении трансплантации костного мозга института в 2013-2017 гг. Исследование антигенов эритроцитов проводили методом центрифугирования в геле с использованием реактивов и оборудования фирмы BioRad (США). Определяли различия фенотипов доноров и реципиентов по системам ABO, Резус и Келл, MNS, Даффи, Лютеран.

Фенотипические различия выявлены у 21 из 24 пар – 87,5%. Результаты исследования представлены в таблице 2. Наиболее часто информативными являлись антигены: А – в 6 случаях; К – в 5 парах; В, С и М – в 4 парах донор-реципиент.

Таблица 2.

Системы эритроцитов, содержащие информативные маркеры посттрансплантационного химеризма в парах донор-реципиент

Система эритроцитов	Количество выявленных различий	Информативные маркеры (число пар)
ABO	10 (41,7%)	A (6), B (4)
Резус	13 (54,2%)	D (2), C (4), c (5), E (3), e (1)
Келл	5 (20,8%)	K (5)
MNS	6 (25,0%)	M (4), N (2)
Лютеран	1 (4,2%)	Lua (1)
Даффи	2 (8,3%)	Fya (2)

Среди родственных пар донор-реципиент антигенные различия выявлены у 14 из 17 (82,4%). Общее число информативных меток в этих парах составило 20 (1,4 на пару). У 100% неродственных пар выявлены различия в фенотипах эритроцитов, число меток составило 14 (2 на пару). На предтрансплантационном этапе выстраивалась калибровочная кривая в серии разведений эритроцитов донора в эритроцитах реципиента и наоборот. Мониторинг химеризма проводился через 21, 28, 35, 42, 50, 60, 75, 90, 100, 120, 200, 250, 330, 360 дней после аллотГСК. При отслеживании химеризма предпочтение отдавалось антигену, имеющемуся у донора и отсутствующему у реципиента. Данная ситуация наблюдалась в 13 парах.

При исследовании на 21 день после аллотГСК у 75,0% реципиентов наблюдался смешанный эритроцитарный химеризм, при этом значения ДХ в пределах 1-5% выявлялись у 37,5% больных, в пределах 6-10% - у 37,5%. Результаты исследования гемопоэтического химеризма представлены в таблице 3. ДХ, превышающий 25%, был достигнут у 40% больных через 28 дней после аллотГСК. На 42 день после аллотГСК у 50% пациентов уровень ДХ был $\geq 76\%$. Полный ДХ зарегистрирован у 37,5% реципиентов на +75 день, у 33,9% - на +100 день, у 16,1% - на +200 день и у 12,5% - на +250 день после аллотГСК.

Таблица 3.

Результаты исследования донорского химеризма

День после аллоТГСК	Донорский химеризм (% от числа больных, переживших данный срок)							
	0%	1-5%	6-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-99%	100%
21	25,0	37,5	37,5	-	-	-	-	-
28	20,0	10,0	30,0	10,0	30,0	-	-	-
35	20,0	10,0	10,0	-	40,0	20,0	-	-
42	-	20,0	-	-	20,0	10,0	50,0	-
50	-	10,0	10,0	-	20,0	-	60,0	-
60	-	-	11,1	-	22,2	-	66,7	-
75	-	-	-	-	-	12,5	50,0	37,5
100	-	-	-	-	-	-	28,6	71,4
200	-	-	-	-	-	-	12,5	87,5
250	-	-	-	-	-	-	-	100

Таким образом, исследование антигенов эритроцитов является информативным (информативность более 80% для родственных пар и 100% - для неродственных), чувствительным (анализ возможен с 21 дня после аллотГСК), легко воспроизводимым и экономичным методом мониторинга посттрансплантационного химеризма.

Список литературы

1. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation / F. Lion, S. Watzinger, H. Preuner et al. // *Leukemia*.- 2012.- V. 26(8). - P. 1821–1828.
2. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction/ M. Alizadeh, M. Bernard, B. Danic et al. // *Blood*.- 2002.-V. 99. - P. 4618–4625.
3. Flow cytometric method for the routine follow-up of red cell populations after bone marrow transplantation/ E.C.Hendriks, A.J.de Man, Y.C. van Berkel et al. // *Br. J. Haematol.*- 1997.- V. 97. - P. 141–145.
4. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia / C.M.Seong, S.Giralt, H.Kantarjian et al. // *J. Clin. Oncol.* - 2000.- V. 18. - P. 1831–1836.
5. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings of the international bone marrow transplant registry and the American society of blood and marrow transplantation / J.H. Antin, R. Childs, A.H. Filipovich et al. // *Biol Bone Marrow Transplant.*- 2001.- V.7(9). - P. 473–485.
6. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion / N. Schaap, A. Schattenberg, B. Bar et al. // *Br. J. Haematol.*- 2000.- V. 108. – P. 116–125.
7. Analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the study of genetic polymorphisms associated with thrombophilia [Текст]/ E. Butina, N. Minaeva, G. Zaitseva, A. Kiseleva// *Haematologica*.- 2016. –V. 101(s.1). – P. 869.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ХИМЕРИЗМА ПРИ
АНАЛИЗЕ ГЕНОВ F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677,
MTHFR: 1298, MTR, MTRR**

*Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Зорина Н.А., Минаева Н.В.,
Хоробрых М.Н., Киселева А.Н.*

*ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России»,
Киров, Россия (610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)*

**DETERMINATION OF CHIMERISM AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC
STEM CELL TRANSPLANTATION IN THE ANALYSIS OF GENES F2, F5, F7,
F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR**

*Butina E. V., Zaitseva G. A., Zorina N. A., Minaeva N. V.,
Khorobrykh M. N., Kiseleva A. N.*

*Federal state budgetary science institution «Kirov research Institute of Hematology and Blood
Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency» Russia, Kirov
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)*

*E-mail: butina@niigpk.ru, zaytseva@niigpk.ru, zorina@niigpk.ru,
minaeva@niigpk.ru, khmn-nii@mail.ru, kiseleva@niigpk.ru*

Гены F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR отвечают основным требованиям, предъявляемым к маркерам оценки химеризма: анализ основан на идентификации участков генома, отличающихся одной нуклеотидной последовательностью; исследуются два аллельных варианта гена; частота встречаемости в популяции гомо- и гетерозиготных вариантов достаточна для обнаружения генетических различий у 90% пар донор-реципиент.

Ключевые слова: химеризм, аллоТГСК

Genetic polymorphisms F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR meet the basic requirements of the markers of hematopoietic chimerism: the analysis is based on the identification of regions of the genome that differ by one nucleotide sequence; two allelic variants of the gene are investigated; frequency of occurrence in the population of homo- and heterozygous is sufficient for the detection of genetic differences at 90% of donor-recipient pairs.

Keywords: chimerism, HSCT

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) является эффективным методом лечения тяжелых заболеваний системы крови и иммунной системы [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи в области трансплантологии, аллоТГСК сопряжена с развитием острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», возможностью отторжения трансплантата, возникновением рецидивов основного заболевания [3, 4]. Мониторинг приживления гемопоэтических стволовых клеток необходим для оценки состояния кроветворной системы и планирования цитостатической и иммуносупрессивной терапии [5, 6].

В настоящее время уделяется большое внимание разработке простых, информативных и экономичных методов диагностики посттрансплантаци-

онного химеризма [7]. Основное условие для контроля химеризма – наличие различий в нуклеотидной последовательности гомологичных участков генов у донора и реципиента [8]. В представленной работе проведено изучение возможности использования аллельных вариантов генов тромбофилии и фолатного цикла в качестве маркеров химеризма после аллоТГСК.

Проведено исследование распространенности полиморфизмов генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR у населения, проживающего на территории Кировской области. Генетический скрининг осуществлен у 114 доноров крови и ее компонентов. Частота встречаемости аллельных сочетаний генов представлена в таблице 1. Ни один из представленных генов не соответствует нормальному (менделевскому) распределению, при котором число гомо- и гетерозиготных сочетаний аллелей в популяции составляет 1:2:1. Ближе других к нормальному распределению стоят гены F13, FGB, ITGA2, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTRR.

В таблице 2 представлены результаты исследования полиморфизмов генов тромбофилии и фолатного цикла в группе из 48 человек, включающей в себя 24 больных, которым в 2014-2017 гг. была выполнена аллоТКМ в отделении химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, и 24 донора гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Донорами ГСК для 18 пациентов были родные братья или сестры, для 6 больных – лица, подобранные в регистре потенциальных доноров ФГБУ РМНПЦ «Росплазма» ФМБА России. В 22 случаях донор и реципиент идентичны по генам HLA I и II классов, в 2 – гаплоидентичны. Исследование полиморфизмов генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием отечественного оборудования и реактивов (КардиоГенетика, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Генетические различия выявлены у 23 из 24 пар донор-реципиент – 95,8%. Количество полиморфных различий в парах составило от 1 до 9, медиана - 4. Наибольшее число аллельных различий установлено в гене MTR (у 12 из 24 пар – 50,0%), в гене MTHFR: 1298 (45,8%), в генах F13 и FGB (41,7%), в генах ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677 (33,3%). Также высокая частота генетических различий выявлена для генов ITGA2 и MTR (29,2%). При сопоставлении полученных результатов с данными, представленными в таблице 1, можно заметить, что распределение полиморфных аллелей данных генов наиболее близко к менделевскому распределению. Наименьшее количество различий установлено для генов F5: 1691 G/A (1 из 24) (4,2%) и F2: 20210 G/A (8,4%).

Таблица 1.

**Частота встречаемости генетических полиморфизмов, связанных с
тромбофилией, протромботическими состояниями и
гипергомоцистеинемией**

Ген	Генотип	Частота встречаемости, %	
		в популяции (n=114)	у доноров и реципиентов ГСК (n=48)
F2: 20210 G>A	G/G	97,4	95,8
	G/A	2,6	4,2
	A/A	0	0
F5: 1691 G>A	G/G	94,7	97,7
	G/A	4,4	2,3
	A/A	0,9	0
F7: 10976 G>A	G/G	78,9	87,5
	G/A	19,3	12,5
	A/A	1,8	0
F13: 103 G>T	G/G	45,6	37,5
	G/T	46,5	56,3
	T/T	7,9	6,3
FGB: -455 G>A	G/G	51,8	64,6
	G/A	42,1	27,1
	A/A	6,1	8,3
ITGA2: 807 C>T	C/C	40,5	41,7
	C/T	48,6	47,9
	T/T	10,8	10,4
ITGB3: 1565 T>C	T/T	77,2	66,7
	T/C	19,3	33,3
	C/C	3,5	0
PAI-1:-675 5G>4G	5G/5G	16,7	10,4
	5G/4G	53,5	54,2
	4G/4G	29,8	35,4
MTHFR: 677 C>T	C/C	52,8	47,9
	C/T	38,9	37,5
	T/T	8,3	14,6
MTHFR: 1298 A>C	A/A	57,1	37,5
	A/C	37,1	43,8
	C/C	5,7	18,8
MTR: 2756 A>G	A/A	70,0	62,5
	A/G	21,4	29,2
	G/G	8,6	8,3
MTRR: 66 A>G	A/A	11,4	16,7
	A/G	44,3	60,4
	G/G	44,3	22,9

**Частота генетических различий в парах донор-реципиент
по генам тромбофилии и фолатного цикла**

Ген	Число генетических различий в парах					
	Родственная аллоТГСК (n=18)		Неродственная аллоТГСК (n=6)		Всего (n=24)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
F2: 20210 G/A	0	0	2	33,3	2	8,3
F5: 1691 G/A	1	5,6	0	0	1	4,2
F7: 10976 G>A	4	22,2	0	0	4	16,7
F13: 103 G>T	7	38,9	3	50,0	10	41,7
FGB: -455 G>A	7	38,9	3	50,0	10	41,7
ITGA2: 807 C>T	5	27,8	2	33,3	7	29,2
ITGB3: 1565 T>C	5	27,8	3	50,0	8	33,3
PAI-1:-675 5G>4G	5	27,8	3	50,0	8	33,3
MTHFR: 677 C>T	5	27,8	3	50,0	8	33,3
MTHFR: 1298 A>C	7	38,9	4	66,7	11	45,8
MTR: 2756 A>G	2	11,1	5	83,3	7	29,2
MTRR: 66 A>G	9	50,0	3	50,0	12	50,0
Итого:	57		31		88	

В 18 парах, в которых донор являлся родственником больного, установлено 57 генетических различий, что в среднем составляет 3,2 на пару, медиана - 3. В 6 парах, в которых донор был подобран в регистре неродственных доноров ГСК, выявлена 31 различная аллельная специфичность - 5,2 на пару, медиана - 5,5. Закономерно, что лица, не состоящие в кровном родстве, генетически более разнообразны, чем родственники.

Для каждой пары были выбраны полиморфизмы, выполняющие роль молекулярного маркера для дифференцирования клеток донора и реципиента после аллоТГСК. В 7 случаях доноры и реципиенты были гомозиготны по разным аллелям в одном гене. В 17 случаях идентификационной меткой считался полиморфизм, в котором один аллельный вариант был общим для донора и реципиента, другой - специфичный только для реципиента. Исследование химеризма проводили на 28, 42, 56, 70, 100, 120 дни после трансплантации. Отторжение трансплантата с изменением генотипа и отсутствием донорского химеризма наблюдалось у двух больных - у первого реципиента через 60 дней после аллоТГСК, у второго через 350 дней.

Таким образом, гены тромбофилии и фолатного цикла отвечают основным требованиям, предъявляемым к маркерам оценки химеризма: анализ основан на идентификации участков генома, отличающихся одной нуклеотидной последовательностью; исследуются два аллельных варианта гена; частота встречаемости в популяции гомо- и гетерозиготных вариантов достаточна для обнаружения генетических различий более чем у 90%

пар донор-реципиент. Использование оборудования, программного обеспечения и наборов реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциирующихся с риском развития тромбофилии, методом ПЦР в режиме реального времени компании «ДНК-Технологии» (Россия) имеет следующие преимущества: технологичность – применение стандартных методик; высокую чувствительность – достоверное различие аллельных состояний гена; внутренний контроль – оценку количества ДНК в амплификационной пробирке и исключение ошибок генотипирования; высокую скорость – не более суток на определение генотипа пациента; автоматическую выдачу результатов; низкую стоимость анализа; наличие регистрационного удостоверения на медицинское изделие.

Список литературы

1. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? / P.Bader, D.Niethammer, A.Willasch [et al.] // Bone Marrow Transplantation.- 2005. - V. 35(2). - P.107-119.
2. Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами / В.А. Лавриненко, Т.В. Савицкая, Е.В. Волочник [и др.] // Онкогематология.- 2014. - №9(2). - С. 29-36.
3. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences / M.Koldehoff, N.K.Steckel, M. Hlinka [et al.] // Am. J. Hematol.- 2006.- V.81(10). - P. 735-746.
4. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction / M.Alizadeh, M.Bernard, B.Danic [et al.] // Blood. – 2002. – V.99(12). – P. 4618–25.
5. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples / D.Kristt, M.Israeli, R.Narinski [et al.] // J. Biomolecular Techniques.- 2005.- V. 16(4).- P. 378–389.
6. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation / B. Fehse, A.Chuchlovin, K.Kuhcke [et al.] // J. Hematother. Cell Res . - 2001.- V.10(3). - P. 419-425.
7. Analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the study of genetic polymorphisms associated with thrombophilia [Текст] / E. Butina, N. Minaeva, G. Zaitseva, A. Kiseleva // Haematologica.- 2016. –V. 101(s.1). – P. 869.
8. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience / H.Kreyenberg, W.Holle, S. Mohrle [et al.] // Leukemia.- 2003.- V.17.- P. 237-240.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ В ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

*Исаева Н.В., Утемов С.В., Минаева Н.В., Ветошкин К.А.,
Костяев А.А., Шерстнев Ф.С.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)*

THE RESULTS OF THE EVALUATION OF THE VIABILITY OF THE LEUKOCYTES IN LEUKOCONCENTRATES CONTAINING HEMATOPOIETIC STEM CELLS

*Isaeva N. V., Utemov S. V., Minaeva N. V., Vetoshkin K. A.,
Kostyaev A. A., Sherstnev P. S.*

*Federal state budgetary science institution «Kirov research Institute of Hematology and blood
transfusion of the Federal medical-biological Agency», Russia, Kirov
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)*

*E-mail: isaevanatalia@yandex.ru, utemovs@mail.ru, mnvgem@gmail.com, kostyavetoshkin@
yandex.ru, kirov_ak@bk.ru, sherstnyov_phil@mail.ru*

Одной из характеристик трансплантационного материала, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, является число жизнеспособных лейкоцитов. Представлены результаты оценки числа жизнеспособных лейкоцитов на основании негативности клеток по включению в них флуоресцирующего витального красителя – 7-аминоактиномицина D. Установлено отсутствие влияния аппаратного афереза на степень жизнеспособности лейкоцитов. Показано, что процедура криоконсервирования существенно образом не отражается на жизнеспособности клеток в трансплантационном материале. Хранение лейкоконцентратов в жидком азоте под защитой диметилсульфоксида и их оттаивание приводит к существенному понижению содержания жизнеспособных лейкоцитов, процент жизнеспособных клеток может быть снижен до критического уровня в 20 % таких лейкоконцентратов. Длительность хранения в замороженном состоянии не оказывает влияния на изучаемый показатель.

Ключевые слова: жизнеспособность, 7-аминоактиномицин D, лейкоциты, лейкоконцентрат, гемопоэтические стволовые клетки

One of the characteristics of a graft material containing hematopoietic stem cells, is the number of viable leukocytes. This paper presents the results of the evaluation of the number of viable leukocytes based on the negativity of the cells by inclusion of a fluorescent vital dye 7-aminoactinomycin D. It was established the lack of influence of hardware apheresis on the level of viability of leukocytes. It was shown that the cryopreservation procedure does not substantially affect the viability of the cells in the transplant material. Storage of leukoconcentrates in liquid nitrogen under the protection of dimethylsulfoxide and thawing leads to a significant decrease in the content of viable leukocytes, the percentage of viable cells can be reduced to the critical level of 20 % of such leukoconcentrates. The duration of storage in frozen condition has no effect on the studied parameter.

Keywords: viability, 7-aminoactinomycin D, leukocytes, leukoconcentrate, hematopoietic stem cells

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время является эффективным методом терапии гемобластозов и депрессий кроветворения. Использование этой технологии позволяет повысить частоту достижения полных ремиссий и увеличить период безрецидивной выживаемости при ряде заболеваний системы крови [1, 2].

Сущность трансплантации заключается в переносе плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) донора или самого больного после назначения миелоаблативных доз цитостатических препаратов с целью частичного или полного замещения кроветворных клеток пациента. Продуктом клеточной терапии при этом является лейкоконцентрат (ЛК), содержащий ГСК. Внедрение в клиническую практику рекомбинантных человеческих гемопоэтических ростовых факторов, которые способствуют выходу клеток-предшественниц из костного мозга и увеличению их концентрации в крови, расширяет возможности использования мобилизованной периферической крови в качестве источника ГСК [3, 4]. В современных условиях трансплантационный материал с достаточным содержанием ГСК может быть получен из крови при проведении аппаратного лейкоцитозера и из костного мозга - при миелоэкспузии.

В России количество центров, располагающих опытом проведения мобилизации, заготовки, хранения, транспортировки и трансплантации ГСК крайне ограничено. Большинство аспектов этой проблемы требует единого методологического подхода. В Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» накоплен многолетний опыт по проведению аутологичных и аллогенных трансплантаций и заготовке гемопоэтического материала для нужд других трансплантационных центров России [5].

Следует отдельно остановиться на нормативной базе, касающейся контроля ГСК-содержащего трансплантационного материала.

Приказ Минздрава Российской Федерации от 27 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий» регламентирует порядок действий при получении и хранении стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека [6].

Технический регламент от 26 января 2010 г. № 29 «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» включает в себя методы контроля и сроки хранения продукта крови – «гранулоцитов, полученных методом афереза». Согласно данному регламенту, клеточный продукт должен храниться в течение 24 часов при температуре $+ 20 \pm 24$ °С, а его контроль - включать в себя определение объема компонента крови и оценку числа лейкоцитов в нем [7].

Таким образом, на сегодняшний день законодательная база по методам контроля и условиям хранения ГСК периферической крови и костного

мозга отсутствует.

Для стандартизации заготовки, транспортировки и хранения крови и ее компонентов в 2009 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала комплекс мероприятий под названием «Холодовая цепь крови». Согласно требованиям ВОЗ, хранение крови только в диапазоне от +2 °С до +6°С позволяет сдерживать ее бактериальную контаминацию и сохранять ее лечебные свойства. На практике при хранении и транспортировке ГСК-содержащих ЛК, которые не планируется замораживать, руководствуются именно этими рекомендациями [8]. При более длительных сроках сохранность трансплантационного материала обеспечивает метод замораживания под протекцией криоконсервирующих растворов [6].

Работы по получению трансплантационного материала – это цепь обязательных технологических процедур, которые обеспечивают стабильную функцию трансплантата и в конечном счете гарантируют успех трансплантации. В соответствии с требованием European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) абсолютно обоснованным является организация контроля качества клеточного продукта; помимо идентификации и подсчета клеток, обладающих доказанной эффективностью, необходим подсчет и тех клеток, которые потенциально способны нанести вред больному; в случаях, если клеточный продукт подвергается манипуляциям, воздействующим на клеточный состав, особую актуальность приобретает лабораторное подтверждение жизнеспособности клеток [9].

Нежизнеспособными принято считать клетки, которые имеют проницаемую мембрану. Контроль жизнеспособности возможен при суправитальном окрашивании трипановым синим при микроскопировании и с использованием флуоресцирующего красителя 7-аминоактиномицина D (7-AAD) в цитометрическом анализе [10, 11]. Оба эти метода входят в стандарт EBMT по тестированию трансплантационного материала. Из пояснений к стандарту следует, что референтным методом должно стать автоматизированное тестирование, а результаты микроскопических методов оценки жизнеспособности должны быть сопоставлены с данными автоматизированного анализа. Таким образом, в каждом учреждении, безусловно, имеющем свои особенности, важно определить допустимые диапазоны жизнеспособных лейкоцитов в трансплантационном материале [9].

Лабораторный контроль образца ГСК-содержащего ЛК в обязательном порядке включает в себя идентификацию и подсчет стволовых клеток. В настоящее время для оценки ГСК наиболее приемлемыми считаются рекомендации, разработанные Международным обществом гематотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE) [9]. Согласно указанному протоколу, клетка может быть отнесена к гемопоэтической стволовой, если она удовлетворяет ряду требований: экспрессирует на высоком уровне антиген CD34, экспрессирует CD45 на уровне, сопоставимом с бластными клетками, характеризуется степенью гранулярности, сопоставимой с таковой у

зрелых лимфоидных элементов, кроме того, она является жизнеспособной. Такой анализ возможен только при использовании многоцветного иммунологического связывания клеточного материала с антителами к клеточным детерминантам, совмещенного с включением витального красителя, и с последующей оценкой методом лазерной проточной цитофлуориметрии [12]. Протокол ISHAGE, формируя числовое значение ГСК в образце, предполагает расчет доли ГСК среди всех лейкоцитов, не пропускающих витальный краситель. Однако это не исключает того, что в ЛК отсутствуют нежизнеспособные клетки.

Цель работы: анализ жизнеспособности лейкоцитов в ГСК-содержащих ЛК на этапах их получения и хранения.

Материалы и методы. В данном исследовании учитывали процент 7-AAD-негативных лейкоцитов во всех оцениваемых образцах крови и ЛК в качестве самостоятельной характеристики жизнеспособности клеток.

Изучали 189 образцов крови больных онкогематологическими заболеваниями (реципиентов аутоТГСК), являющихся аутодонорами для трансплантации ГСК. Кроме того, исследовали образцы крови 44 доноров для аллогенных ТГСК. Все образцы были взяты для исследования в утренние часы, непосредственно перед началом аппаратного лейкоцитафереза.

ЛК доноров оценивали однократно – сразу после получения, а ЛК больных анализировали сразу после их получения и смешивания с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО), который является хладоограждающим раствором I класса – эндоцеллюлярным криоконсервантом [13]. ДМСО относится к оксидам, хорошо проникает в клетки, при этом получается близкая к аморфной, мелкочаеистая кристаллизация льда. В 2003 г., согласно приказу Минздрава РФ № 325 «О развитии клеточных технологий», высокоочищенный ДМСО начали применять для клинических целей при конечной концентрации 5% после смешивания с биосредой (6).

Непосредственно перед трансплантацией ЛК быстро отогревали в водяной ванне при $+39^{\circ}\div 41^{\circ}\text{C}$ и незамедлительно переливали пациенту, отмывание клеточных продуктов от криоконсерванта не проводили. Следующим этапом контроля жизнеспособности лейкоцитов в ЛК был момент декриоконсервирования после его хранения в жидком азоте, непосредственно перед клиническим использованием.

Достоверность различия показателей в выборках оценивали с помощью методов непараметрической статистики. В таблицах данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

Результаты и их обсуждение

При анализе крови больных и доноров было установлено, что включение витального красителя 7-AAD в лейкоциты является достаточно стабильным показателем. У доноров и больных жизнеспособность лейкоцитов крови, взятой перед началом лейкоцитафереза, оказалась сопоставимой (таблица 1).

Процент жизнеспособных лейкоцитов в периферической крови и ЛК

Анализируемый образец	Процент 7-AAD-негативных лейкоцитов в ЛК	
	пациентов с онкогематологическими заболеваниями – доноров аутологичных ГСК	доноров аллогенных ГСК
Кровь	99,7 (98,1; 99,9)	99,8 (97, 5; 99,9)
ЛК	99,6 (98,5; 99,8)	98,4 (97,5; 99,8)
p	p > 0,05	p > 0,05

Содержание жизнеспособных лейкоцитов в нативных ЛК перед замораживанием практически не отличалось от такового в образцах крови, из которых они были получены методом лейкоцитафереза (табл. 1). Это в равной мере относилось к ЛК и доноров, и больных. Таким образом, процедура аппаратного лейкоцитафереза не оказывает негативного влияния на жизнеспособность лейкоцитов в ЛК.

На основе многолетней работы определен диапазон значений 7-AAD-негативных лейкоцитов в ЛК, заготавливаемых в учреждении. Поскольку трансплантационный материал, полученный от доноров, может транспортироваться для выполнения аллотГСК в другой трансплантационный центр, целесообразно исследовать жизнеспособность лейкоцитов в таких ЛК в смоделированных условиях хранения при транспортировке.

Процент 7-AAD-негативных лейкоцитов в ЛК после их смешивания с ДМСО более широко варьировал по сравнению с результатами, получаемыми в образцах нативных ЛК (табл. 2). В то же время полученное среднестатистическое значение существенно не отличалось от такового в образцах нативных ЛК. Понижение жизнеспособности лейкоцитов в процессе криоконсервирования в некоторых ЛК является ожидаемым фактом; в дальнейшем необходимо углубленное изучение факторов, способных оказывать влияние на изучаемый показатель.

Таблица 2.

Содержание жизнеспособных лейкоцитов в ЛК пациентов с онкогематологическими заболеваниями на разных этапах контроля

Этапы контроля ЛК	Процент 7-AAD-негативных лейкоцитов в ЛК, Ме (I кв.; II кв.)
Нативные ЛК	98,4 (97,5; 99,8)
ЛК с ДМСО	96,1 (94,0; 98,8)
ЛК после оттаивания	92,2 (85,2; 96,4)
p	p I-II > 0,05 p II-III < 0,01

В ЛК после хранения и оттаивания процент лейкоцитов, не включивших витальный краситель, варьировал от 99,5 до 62%, медиана составила 92,2%. Этот показатель оказался существенно более низким, чем измеренный перед криоконсервированием изучаемого клеточного продукта.

Таким образом, при замораживании ГСК-содержащих ЛК, их хранении в замороженном состоянии до оттаивания и трансплантации возрастает число лейкоцитов с поврежденной мембраной.

Число жизнеспособных лейкоцитов в оттаянных ЛК на уровне 98-94,9% регистрировали в 52% образцов, на уровне 95 – 90% - в 28%. Снижение числа лейкоцитов, не пропускающих 7-AAD, до 90% и ниже мы отнесли к критическим значениям, поскольку это может негативно отражаться на качестве трансплантата и на результатах трансплантации в целом. Такие результаты регистрировались нами в 20% наблюдений.

Изучили зависимость процента жизнеспособных клеток от времени хранения ЛК больных в замороженном состоянии в жидком азоте. Наличия корреляционной связи между этими двумя параметрами выявлено не было. Проведенный анализ показал, что срок хранения не сказывается на проницаемости мембран размороженных лейкоцитов.

При выявлении критических значений жизнеспособных лейкоцитов в ЛК были подробно изучены графики флуоресценции 7-AAD в разных видах лейкоцитов. Установлено, что регион 7-AAD-позитивных событий в меньшей степени представлен лимфоцитоподобными элементами, в наибольшей - содержал гранулоциты (миелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), присутствующие в достаточном количестве в ЛК. Менее стабильным, с точки зрения структурной целостности, после размораживания оказался пул гранулоцитов. В дальнейшем актуально проанализировать эффективность таких ЛК для восстановления гемопоэза у больных после трансплантации. Согласно требованиям ЕВМТ, диапазон приемлемых значений жизнеспособности клеток в ЛК, которые получают и используются в условиях конкретного учреждения, может быть установлен только на основании такого анализа.

Сведения об уровне жизнеспособности лейкоцитов в трансплантационном материале после размораживания имеют важное практическое значение. Возможные потери в процессе хранения и транспортировки должны учитываться при расчете планируемой трансплантационной дозы ГСК в целях обеспечения эффективности трансплантации.

Список литературы

1. Трансфузиология: Клиническое руководство / под ред. М.Ф. Заривчацкого. – Пермь: ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России, 2014. – 900 с.
2. Егоров, В.В. Стволовые клетки человека [Текст] / В.В. Егоров, А.А. Иванов, М.А. Пальцев // Молекулярная медицина. – 2003. – № 2. – С. 3-13.
3. Ings, S. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilized with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used [Text] / S. Ings, C. Balsa, D. Leverett [et al.] // Br. J. Haematology. - 2006. - № 134. – P. 517-525.
4. Попов, А.Ю. Факторы прогноза эффективности получения аутологичных клеток-предшественников гемопоэза для последующей трансплантации после высокодозной химиотерапии. Обзор литературы и собственные данные / А.Ю. Попов, Н.В. Жуков, С.В. Миненко [и др.] // Онкогематология. – 2008. - № 3. – С. 34-44.

5. Минаева, Н.В. Опыт обеспечения аллогенными гемопоэтическими стволовыми клетками отечественных трансплантационных центров [Текст] / Н.В. Минаева, М.Н. Хоробрых, Н.А. Зорина [и др.] // Гематология и трансфузиология (Материалы докладов III Конгресса гематологов России). – 2016. – Т. 61 (S1). – С. 24.
6. О развитии клеточных технологий // Приказ Минздрава № 325 от 25 июля 2003 г.
7. О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии // Технический регламент № 29 от 26 января 2010 г.
8. Руководство по организации, обслуживанию и использованию оборудования холодовой цепи для крови. URL: http://www.who.int/bloodsafety/testing_processing (дата обращения 16.05.16).
9. International standards for hematopoietic cellular therapy product collection, processing, and administration accreditation manual. Sixth Edition, Version 6.1. URL: <https://docs.google.com/viewer> (дата обращения 21.04.17).
10. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. – М.: Мир, 1990. - 50 с.
11. Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета // Методические рекомендации МР 1.2.0052-11 утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 29 декабря 2011 г.
12. Sutherland, D.R. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry [Text] / Sutherland D.R., Anderson L, Keeney M. [et al.] // Journal of Hematotherapy. – 1996. - № 5. - P. 213-26.
13. Костяев, А.А. Четырехклассная систематизация биоконсервантов. I класс хладоограждающих растворов - эндоцеллюлярные криоконсерванты [Текст] / А.А. Костяев, С.В. Утемов, А.А. Андреев [и др.] // Вестник гематологии. – 2016. - № 3, Т. XII. – С. 28-35.

НОВЫЙ АЛЛЕЛЬ ЛОКУСА HLA-C, HLA-C*06:02:48, ВЫЯВЛЕННЫЙ У БУРЯТ

Логинова М. А.^{1,2}, Парамонов И. В.¹, Рылов А. В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови» ФМБА России, г. Киров
(610027 Киров, ул. Красноармейская, 72)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский медицинский
научно-производственный центр «Росплазма» ФМБА России, г. Киров
(610002 Киров, ул. Ленина, 104)

THE NEW HLA-C ALLELE, HLA-C*06:02:48, IDENTIFIED IN BURYAT

M.A. Loginova^{1,2}, I.V. Paramonov¹, A.V. Rylov¹

¹Federal state budgetary institution of science «Kirov scientific-research institute of hematology
and blood transfusion of FMBA of Russia», Kirov
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

²Federal state budgetary institution «Russian medical scientific and production center
«Rosplasma» of FMBA of Russia, Kirov
(610002 Kirov, Lenin str., 104)

E-mail: mlogin2010@gmail.com, iparamon@gmail.com, av.rylov@gmail.com

При проведении HLA-типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, идентифицирующих себя бурятами, проживающими на территории Иркутской области, по локусам (HLA)-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 выявлен новый аллель, ранее не зарегистрированный Международным комитетом по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ.

Ключевые слова: человеческие лейкоцитарные антигены, секвенирование, новые аллели

Sequence based typing was used to identify human leukocyte antigen (HLA)-A, B, -C, -DRB1, -DQB1 alleles from recruited volunteers in Irkutsk region (Buryats), Russia for unrelated hematopoietic stem cell registry. During the carried out research in the study population identified new allele, which were registered by The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System.

Keywords: human leukocyte antigen, sequencing, new allele

Человеческие лейкоцитарные антигены (Human leucocyte antigens - HLA) являются наиболее полиморфными локусами в геноме человека. По данным Международного комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ (The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), на март 2017 года HLA-локусы представлены 16 755 аллелями [1]. Следует отметить, что за последние несколько лет количество известных аллелей HLA-локусов увеличилось почти вдвое, что связано не только с расширением числа изученных мировых популяций, но и с развитием методов HLA-типирования, позволяющих выявлять единичные нуклеотидные замены в различных структурных элементах HLA-генов.

Российская Федерация до 30 сентября 2014 года не имела ни одного

зарегистрированного нового HLA-аллеля. 30 сентября 2014 года Международный комитет по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ зарегистрировал сразу два новых аллеля, выявленных в российских популяциях [2, 3]. На сегодняшний день их число превышает 50 [4-6], при этом часть из них не является случайными мутациями, а циркулирует в некоторых российских популяциях [5].

Выявление новых аллелей связано с увеличением количества потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток в российских регистрах доноров костного мозга – по состоянию на 26.04.2017 в них состояло 66 369 доноров [7], а также с введением в практику HLA-лабораторий современных методов анализа, позволяющих идентифицировать единичные нуклеотидные замены в различных регионах генов.

Цель настоящего исследования состояла в идентификации нового аллеля локуса HLA-C, выявленного у представителя бурят.

Материал и методы

В исследование включено 403 образца цельной крови, полученных от взрослых индивидуумов, идентифицирующих себя бурятами, проживающими на территории Иркутской области. Образцы были получены от доноров из числа кадровых доноров крови и ее компонентов ГБУЗ «Иркутская областная станция переливания крови» в марте-апреле 2016 г.

Препараты ДНК для проведения HLA-типирования выделены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт - ЭДТА) методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Концентрация препаратов ДНК составляла в среднем 30-70 нг/мкл при соотношении A260/A280=1,70÷1,90.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в высоком разрешении проводили по технологии секвенирования с использованием наборов реагентов HLAssure SE SBT Kit (TIBCO Diagnostics Limited, Тайвань).

Капиллярный электрофорез осуществляли с помощью 48-капиллярного генетического анализатора 3730 (Applied Biosystems, США); сиквенсы анализировали в программном обеспечении AccuType™ (Texas Bio Gene Inc., Texas, США).

Результаты и обсуждение

В 2016 году в ходе проведения исследования 403 образцов ДНК, выделенных из цельной крови потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, идентифицирующих себя бурятами, проживающими на территории Иркутской области, для одного образца не было найдено полного соответствия с библиотекой HLA аллелей IMGT/HLA 3.25.0 по локусу HLA-C - №2415.

В ходе проведения высокоразрешающего HLA-типирования образца №2415 был определен следующий генотип HLA-A*24:02, 30:01; B*07:02, 13:02; DRB1*07:01, 15:01, DQB1*02:21, 06:02, C*06, 07 с одним несоответстви-

ем базе данных HLA-аллелей: в позиции 408 третьего экзона вместо G стоит R, четкий двойной пик выявлен в прямом и обратном направлениях при постановке реакции амплификации с локус-специфичными праймерами, что представлено на рисунке 1.

Без проведения дополнительных исследований не представлялось возможным определить, какой из пары аллелей является новым, а какой – уже известным. Для определения аллеля, в позиции 408 третьего экзона которого произошла замена нуклеотида G на A, были поставлены две дополнительные реакции амплификации с аллель-специфичными праймерами – С-07 (амплифицируются аллели групп 05, 06, 08, 12, 15) и С-08 (амплифицируются аллели группы 07).

Последовательности третьего экзона, полученные при секвенировании продуктов амплификации с аллель-специфичными праймерами С-07 и С-08, представлены на рисунке 1. Они расположены ниже последовательностей, полученных с локус-специфичными праймерами. Из данных, представленных на рисунке 1, следует, что новым является аллель С*06, и генотип образца 2415 по локусу С – HLA-C*07:02, 06:новый, причем кодон 112 аллеля HLA-C*06:новый меняется с GGG на GGA (рисунок 2), что, однако, не приводит к замене аминокислоты – глицин.

В ходе реакции секвенирования продукта амплификации с локус-специфичными праймерами С-07 получены последовательности нуклеотидов нового аллеля для первого, второго, третьего и четвертого экзонов. Это позволило представить данный аллель на регистрацию (номер последовательности в базе данных EMBL – LT718450). 28 февраля 2016 года указанному аллелю был присвоен номер HLA-C*06:02:48.

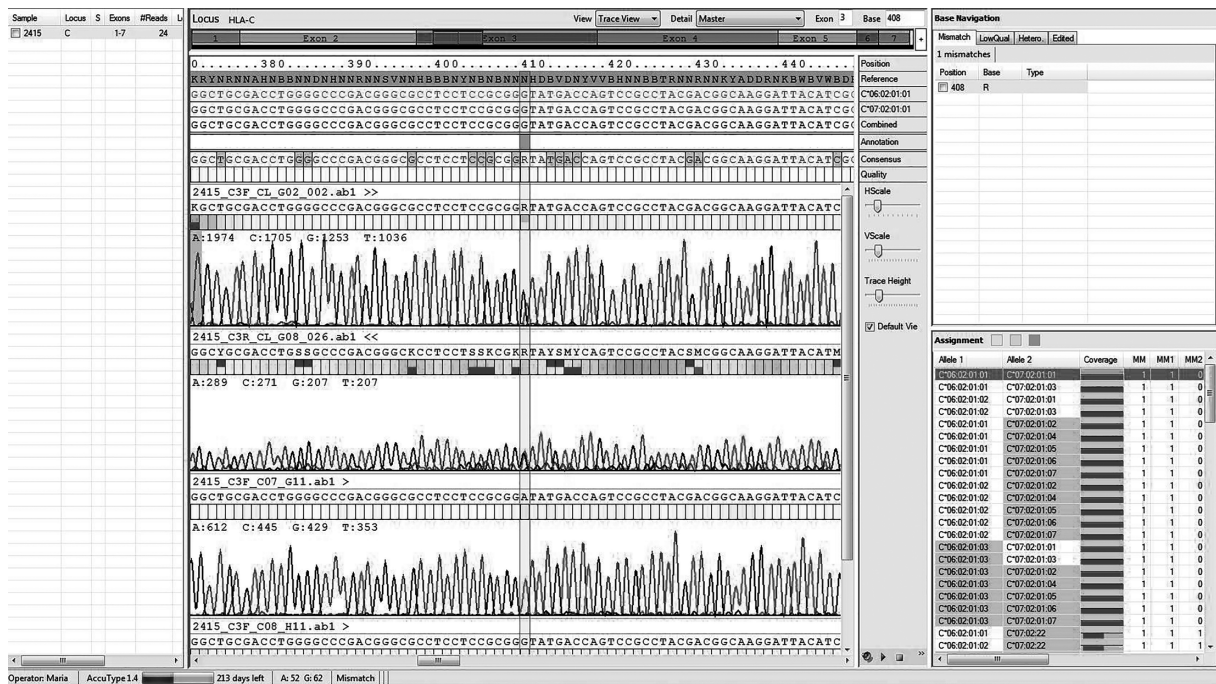


Рисунок 1. Результат анализа образца №2415 по локусу С в программном обеспечении AccuType

AA Codon	95	100	105	110	115
C*06:02:01:01	GG TCT CAC ACC CTC CAG TGG ATG TAT GGC TGC GAC CTG GGG CCC GAC GGG CGC CTC CTC CGC	GGG	TAT	GAC	CAG
C*06:02:48	---	---	---	---	---
AA Codon	120	125	130	135	140
C*06:02:01:01	TCC GCC TAC GAC GGC AAG GAT TAC ATC GCC CTG AAC GAG GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCC GCG GAC ACG GCG GCT				
C*06:02:48	---	---	---	---	---
AA Codon	145	150	155	160	165
C*06:02:01:01	CAG ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT GAG GCG GAG CAG TGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG				
C*06:02:48	---	---	---	---	---
AA Codon	170	175	180		
C*06:02:01:01	GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ACG CTG CAG CGC GCG G				
C*06:02:48	---	---	---	---	---

Рисунок 2. Сравнение последовательностей 3-го экзона аллелей HLA-C*06:02:01:01 с HLA-C*06:02:48 (в кодонах)

Выявление нового аллеля даже в такой довольно небольшой популяционной выборке (403 образца) еще раз подтверждает, что использование современных молекулярно-генетических методов анализа при проведении HLA-типирования оправдано при исследовании малоизученных популяций, к которым можно отнести большинство российских популяций.

Дальнейшие исследования целесообразно направить на расширение пула потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток из данного региона, а также из других регионов Российской Федерации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00059).

Список литературы

1. Nomenclature for Factors of the HLA System. HLA alleles number. 2017. Available at: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. Last update 12-04-2017.
2. Новый аллель HLA-C*12:138, выявленный у больной хроническим миелолейкозом в процессе поиска неродственного донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / Б.В.Бидерман, И.А.Якутик, Е.Г.Хамаганова [и др.] // Гематология и трансфузиология. -2015/- 60(2): 4-5.
3. Loginova, M. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:133, in a Russian individual / M. Loginova, I. Paramonov // Tissue Antigens. - 2015. - 86: 211-212.
4. Loginova, M. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:05:31, in a Russian individual / M. Loginova // Immunogenet open access. - 2016. - 1 (1).
5. Новый аллель локуса HLA-A, HLA-A*24:314, выявленный в популяциях Северного Кавказа / М.А.Логинова, И.В.Парамонов, З.М.Татаева, А.И.Кабардиева // Гематология и трансфузиология. -2016 /- 61 (2): 96-100.
6. Логинова, М.А. Новые HLA-аллели в Российских популяциях / М.А. Логинова, И.В. Парамонов // Трансфузиология. - 2016. - 3 (17): 13-20.
7. Счетчик регистра (2017). Доступен: http://www.rusfond.ru/registr_stat/001 (обновление 26.04.2017).

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: СВОЙСТВА, ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

Н. В. Минаева, К. А. Ветошкин, Н. В. Исаева, С. В. Утемов

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия
(610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)*

MULTIPOTENTIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS: PROPERTIES, SOURCES AND PERSPECTIVES OF APPLICATION AT TRANSPLANTOLOGY

Minaeva N. V., Vetoshkin K. A., Isaeva N. V., Utemov S. V.

*Federal State Budgetary Institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood transfusion of the Federal medical-biological Agency», Kirov, Russia
(610027 Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)*

*E-mail: mnvgem@gmail.com, kostyavetoshkin@yandex.ru,
isaevanatalia@yandex.ru, utemovs@mail.ru*

В статье приводятся основные современные сведения об источниках получения, критериях идентификации, свойствах, функциях мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках костного мозга и их иммунологических маркерах, а также возможностях и перспективах клинического применения клеток в трансплантологии.

Ключевые слова: *мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, источники, свойства, функции, клиническое применение*

Article present basis modern data on sources, identification criteria, properties, functions and immune marks of bone marrow`s multipotential mesenchymal stromal cells, and their clinical application possibilities and perspectives.

Keywords: *multipotential mesenchymal stromal cells, sources, properties, functions, clinical application*

Костный мозг – орган, в котором сосуществуют и функционально взаимодействуют два различных типа клеток – гемопоэтические и мезенхимальные (стромальные). Последние представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включая ретикулоциты, эндотелиоциты, фибробласты, адипоциты и остеогенные клетки-предшественники, регулирующие гемопоэз. Впервые существование в костном мозге клеток стромы, образующих в культуре фибробластоподобные колонии и способных к адгезии к поверхности лабораторного пластика, было показано А.Я. Фриденштейном и соавт. [1, 2]. Данные клетки получили название колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф). Установлено, что КОЕ-Ф имеют стволовую природу, то есть обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные мезенхимальные клеточные линии (адипогенную, хондрогенную, остеогенную). С учетом способности этих клеток к самоподдержанию и дифференцировке в различные клеточные линии мезенхимы А.И. Caplan

ввел термин «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК) [3].

Международным обществом клеточной терапии (International society of Cellular Therapy, ISCT) был предложен термин «мультипотентные МСК» (ММСК) и введен минимум критериев для их определения [4]:

1) способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования;

2) экспрессия молекул адгезии CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 или CD19 и HLA-DR;

3) способность дифференцировки в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

ММСК, отличающиеся некоторыми иммунофенотипическими признаками и дифференцировочными способностями, обнаружены во многих тканях организма: надкостнице и мышечной ткани [5], синовиальной оболочке суставов [6], в костном мозге, печени и крови плода [7], жировой ткани [8, 9], пуповинной крови [10, 11]. Значение для клеточной терапии имеют, в основном, 3 источника ММСК: костный мозг, жировая ткань и пуповинная кровь. Выбор этих тканей определяется их доступностью, относительной атравматичностью выделения и достаточно высоким содержанием ММСК. Однако, получение достаточного для терапии количества ММСК (1×10^6 / кг веса реципиента) происходит в условиях культивирования *in vitro*.

Особенностью культивирования ММСК для клинического применения является низкая плотность посева клеточной суспензии [12]. При этом стромальные костномозговые клетки быстро адгезируются к пластиковой поверхности культуральной посуды, приобретая фибробластоподобную морфологию, после чего могут быть отделены от неприкрепленных гемопоэтических клеток посредством повторных отмываний. Не существует единого протокола культивирования ММСК *in vitro*. Наиболее приемлемой является схема, предложенная E. Clarke [13], основные этапы которой схематически можно представить в следующем виде:

1. Аспирация (взятие) костного мозга.

2. Выделение фракции мононуклеарных клеток.

3. Культивирование прикрепившихся к пластиковой поверхности клеток в специальной питательной среде в условиях 90 – 95% влажности и 5% углекислого газа.

4. При покрытии порядка 70% культуральной поверхности проводят снятие культуры (открепление клеток от поверхности пластика) при помощи ферментов.

5. Повторный посев на большую площадь (пассаж).

6. Снятие культуры клеток, отмывание от питательной среды и использование для клеточной терапии.

В исследованиях разных авторов показана идентичность основных свойств ММСК, полученных из разных источников: типичная морфология; характер роста в культуре; способность дифференцироваться под действи-

ем специфических стимуляторов в остеогенные, адипогенные и хондрогенные предшественники [14]; поддержка кроветворения в культуре [15]; экспрессия общих поверхностных маркеров и идентичность профиля экспрессии большинства генов [16]. В то же время есть и некоторые различия в зависимости от первичного источника биологического материала: ММСК, полученные из костного мозга, более коммитированы к остеогенезу, а выделенные из пуповинной крови - к ангиогенезу [17]; клеточность колоний костномозговых ММСК выше, чем клеток, выделенных из других источников [18].

Вне зависимости от условий и технологии культивирования клеточная культура, выделенная по способности адгезии к пластику, достаточно гетерогенна. Ее клетки различаются по своим дифференцировочным и пролиферативным способностям. Для более полной идентификации ММСК, изолированных из костного мозга человека, проведено большое количество исследований, направленных на определение профиля поверхностных антигенов клеток [12, 19].

При анализе иммунофенотипа ММСК следует иметь в виду, что исследованию подвергаются не первичные клетки, а ММСК, размноженные в культуре под действием различных стимуляторов и других экзогенных факторов, способных влиять на отдельные эпитопы поверхностных молекул и менять экспрессию тестируемых генов. Возможно, эти обстоятельства определяют некоторую вариабельность маркерных характеристик ММСК и не связаны с их происхождением [20].

Известно, что ММСК не экспрессируют CD11b (маркер клеток миелопоэза), гликопорин А (маркер клеток эритроидной линии), CD14 (рецептор липополисахаридов), CD45 (маркер лейкоцитов), CD34. Белки CD31 (экспрессируются эндотелиальными и гемопоэтическими клетками) и CD117 (маркер стволовых гемопоэтических клеток) практически всегда отсутствуют на поверхности ММСК [21, 22]. Кроме того, ММСК не должны экспрессировать CD79 α , CD19 и HLA II класса (допустимо, что не более 2% популяции могут быть положительными по указанным маркерам) [12,19].

К настоящему времени обнаружено большое число позитивных маркеров ММСК. Так, иммунологический фенотип ММСК представлен экспрессией ряда неспецифических маркеров. Свыше 95% популяции клеток должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 [12, 19]. Часто наблюдается вариабельная экспрессия ММСК CD90 (Thy 1.1), CD117 (c-kit), SH-2 (CD105), SH-3 или SH-4 (CD73), Stro-1 [19].

Тем не менее, до настоящего времени не обнаружен антиген или комбинация антигенов, которые специфически характеризуют только популяцию ММСК костного мозга человека. В связи с этим, каждая научная группа использует свой набор антигенов, который считает наиболее специфичным, либо наиболее подходящим и удобным для поставленных целей.

В своей работе мы применяем набор «Human MSC Analysis Kit» (BD

«Biosciences»), который разработан в соответствии с требованиями ISCT. Эти реактивы позволяют производить многопараметрический анализ изучаемых клеток. Включенные в него моноклональные антитела против «позитивных» клеточных маркеров конъюгированы с разными флуорохромами, например, CD90 – с FITC (флуоресцеин изотиоцианат), CD105 – с PerCP-Cy[™] 5.5 (перидинхлорофилловый протеин), CD73 – с APC (аллофикоцианин). Следует отметить, что данный комплект реактивов сконструирован как модульный, поскольку в нем остается свободным канал флуорохрома фикоэритрина (PE). Канал PE используется нами при изучении образцов клеточного материала при помощи комбинации «негативных» антител (CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA –DR), входящих в состав набора. Кроме того, планируется задействовать канал PE для связывания с вспомогательными «позитивными» маркерами ММСК (CD44, CD29, CD200, CD166, CD146 и CD271).

Исходя из основных биологических свойств ММСК и их функций (формирование гемопоэзинулирующего и стромального микроокружения, самоподдержание и восстановление собственного пула клеток, участие в гомеостатических реакциях организма и в процессах регенерации и репарации), направления клеточной терапии, связанные с использованием мезенхимальных стромальных клеток, могут быть разделены на 3 группы:

1) поддержка кроветворения при котрансплантации с аутологичными гемопоэтическими стволовыми клетками;

2) замещение и восстановление функции поврежденных негемопоэтических тканей (кости, хряща, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани, печени и других) [23-31];

3) подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах [32, 33].

Системное введение ММСК было предложено как потенциальный подход для улучшения результатов трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на основании следующих фактов.

1. Обеспечение стромальной поддержки для трансплантируемых ГСК, которая может ускорять восстановление кроветворения после пересадки и обеспечивать приживание даже относительно небольшого количества CD34+ клеток [34].

2. Уникальные иммунологические свойства ММСК могут редуцировать реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) [35, 36].

Результаты доклинических испытаний котрансплантации ММСК с кроветворными стволовыми клетками на экспериментальных моделях позволили прийти к следующим заключениям:

- трансплантация ММСК ускоряет и улучшает приживание ГСК [34];

- действие ММСК, стимулирующее приживание и пролиферацию ГСК, не является линейноспецифическим, способствует в равной мере пролиферации миелоидных и лимфоидных клеток;

- действие ММСК реализуется через высвобождение цитокинов, регулирующих приживание, пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток (гранулоцитарный и гранулоцитарно-маркофагальный колониестимулирующие факторы, ИЛ-6) и иммуносупрессивный эффект.

Указанные данные явились основанием для клинического использования ММСК совместно с ГСК с целью повышения эффективности трансплантаций гемопоэтической ткани. Так, котрансплантация ГСК с ММСК, выращенными в культуре (4 – 7 пассажей) и введенными внутривенно в количестве $1 - 5 \cdot 10^6$ / кг массы тела реципиента, приводила к ускорению приживания ГСК, восстановления показателей периферической крови, а также к снижению частоты и интенсивности острой и хронической РТПХ [34 - 36].

Иммуносупрессивные свойства ММСК имеют огромное значение в трансплантологии в отношении предотвращения отторжения трансплантата, профилактики и лечения острой РТПХ после пересадки ГСК. К настоящему времени проведен ряд клинических исследований по оценке безопасности и эффективности введения донорских ММСК. Так, было показано, что инфузия ММСК безопасна, приводит к более быстрому восстановлению гемопоэза после высокодозной химиотерапии, не сопровождается побочными эффектами и формированием эктопических очагов ткани, не сопровождается повышением частоты возникновения или утяжелением течения РТПХ.

Результаты Европейского мультицентрового исследования I—II фазы по применению ММСК после гаплоидентичных ТГСК свидетельствуют о возможности использования МСК как для профилактики развития РТПХ, так и для лечения развившегося осложнения [36]. С 2012 г. Британским комитетом по стандартам в гематологии и Британским обществом по трансплантации костного мозга применение ММСК предложено в качестве одного из вариантов терапии третьей линии острой РТПХ [37].

Таким образом, ММСК являются неотъемлемой частью современной клеточной терапии. Их применение позволяет существенно улучшить результаты трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток.

Список литературы

1. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантантов костного мозга/ А.Я.Фриденштейн, К.В.Петракова, А.И.Куралесова, Г.П.Фролова // Цитология. – 1968. - № 5. – С. 557 - 567.
2. Friedenstein, A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chaikakhjan, K.S. Lalykina // Cell tissue kinetics. – 1970. – N. 3 – P. 393 – 403.
3. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells/ A.I.Caplan // Journal of Orthopedic Research. – 1991. – N 9. – P. 641 - 650.
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – N 8. – P. 315 - 317.

5. Nathanson M. Bone matrix-directed chondrogenesis of muscle in vitro / Nathanson M. // *Clinical Orthopaedic* . - 1985. - N 200. - P. 142 - 158.
6. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells / H. Ohnishi, Y. Oda, T. Aoki [et.al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2012. – N. 6. – P. 261 – 271.
7. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow / C.Campagnoli, S.Roberts, S.Kumar [et al.] // *Blood*. - 2001. - N 98. - P. 2396 - 2402.
8. Loncar, D. Ultrastructural analysis of differentiation of rat endoderm in vitro, Adipose vascular-stromal cells induce endoderm differentiation, which in turn induces differentiation of the vascular-stromal cells into chondrocytes / D. Loncar // *Journal of submicroscopic cytology pathology*. - 1992. - N 24. - P. 509 - 519.
9. Park, S.R Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro / S.R Park, R.O.Oreffo, J.T. Triffitt // *Bone*. - 1999. - N 24. - P. 549 - 554.
10. Erices, A. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood / A. Erices, P.Conget, J.J. Minguell // *British Journal of Haematology*. - 2000. - N 109. - P. 235 - 242.
11. Gutierrez-Rodriguez, M. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood / M.Gutierrez-Rodriguez, E.Reyes-Maldonado, H.Mayani // *Stem Cells*. - 2000. - N 18. - P. 46 - 52.
12. Пулин, А.А. Выбор оптимальных методов культивирования и трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях эксперимента: Автореф. дис канд. мед. наук. - М., 2008.
13. *Methods in molecular biology. Basic cell culture protocols. Third edition* / Edited by C.D. Helgason, C.L. Miller. - Humana Press Inc., Totowa, N.J., 2000. - P. 173 – 186.
14. Minguell, J.J. Mesenchymal stem cells / J.J.Minguell // *Experimental in biology and medicine*. - 2001. - N 226. - P. 507 - 520.
15. Владимирская, Е.Б. Влияние мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на пролиферацию гранулоцитарно-макрофагальных предшественников при культивировании in vitro / Е.Б.Владимирская, Б.Б.Пурбуева, А.Г. Румянцев // *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. - 2006. - № 5. - С. 1 - 6.
16. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood / W.Wagner, F.Wein, A.Seckinger [et al.] // *Experimental hematology*. - 2000. - N 33. - P. 1402 - 1416.
17. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells / R.A.Panepucci, J.L.Siufi, W.A. Jr. Silva [et al.] // *Stem Cells*. - 2004. - N. 22. - P. 1263 - 1278.
18. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues, superiority of synovium as a cell source / Y. Sakaguchi, I.Sekiya, K.Yagishita, T. Muneta // *Arthritis*. - 2005 - N 52. - P. 2521 - 2529.
19. Пулин, А.А. Поверхностные маркеры, характеризующие мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга человека / А.А. Пулин, И.Н. Сабурин, В.С. Репин // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2008. – Т. III, № 3. – С. 25 – 30.
20. Bianco, P. Marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications / P.Bianco, P.Robey // *Journal of clinical investigations*. - 2000. - N 105. - P. 1663 - 1668.
21. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck [et al.] // *Science*. – 1999. – N. 284. – P. 143 – 147.
22. Kolf, C.M. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulatory of niche, self-renewal and differentiation / C.M. Kolf, E. Cho, R.S. Tuan // *Arthritis research and therapy*. – 2007. – N. 9, Vol. 1. – P. 204.

23. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells // *Journal of Orthopedic Research*. – 1991. – N 9. – PP. 641 - 650.
24. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep // *Nature Medicine*. – 2000. – N 6. – PP. 1282 - 1286.
25. Pochampally R.R., Neville B.T., Schwarz E.J. et al. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9282—5.
26. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion // *Cells, Tissues, Organs*. – 2001. – N 169. – PP. 12 - 20.
27. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates // *Blood*. – 2003. – N 101. – PP. 2999 - 3001.
28. Crevensten G., Walsh A.J., Ananthakrishnan D. et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs // *Annals of Biomedical engineering*. – 2004. – N 32. – PP. 430 - 434.
29. Arinzeh T.L., Peter S.J., Archambault M.P. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect // *Journal of Bone and Joint Surgery*. – 2003. – N 85 A. – PP. 1927 - 1935.
30. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfect // *Science*. – 2004. – N 303. – PP. 1198 - 1201.
31. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation*. – 2002. – N 105. – PP. 93 - 98.
32. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III – IV acute graft – versus – host disease / L.M. Ball, M.E. Bernardo, H. Roelofs [et al.] // *British journal of haematology*. – 2013. – N. 163. – P. 501 – 509.
33. Diagnosis and management of acute graft – versus – host disease. Guideline / F.L. Dignan, A.Clark, P. Amrolia [et al.] // *British journal of haematology*. – 2012. – N. 158. – P. 30 – 45.
34. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy // *Journal of Clinical Oncology*. – 2000. – N 18. – PP. 307 - 316.
35. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2005. – N. 11 - . PP. 389 – 398.
36. Ball L.M., Bernardo M.E., Locatelli F. et al. Cotransplantation of haploidentical bone marrow derived mesenchymal stem cells overcomes graft dysfunction and improves hematological and lymphocyte recovery in haploidentical stem cell transplantation // *Blood*. – 2006. – N. 108 – P. 3118.
37. Diagnosis and management of acute graft – versus – host disease. Guideline / F.L. Dignan, A.Clark, P. Amrolia [et al.] // *British journal of haematology*. – 2012. – N. 158. – P. 30 – 45.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕЖИМА КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ВЫСОКИМИ ДОЗАМИ МЕЛФАЛАНА С БОРТЕЗОМИБОМ ПРИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Хоробрых М.Н., Минаева Н.В., Зорина Н.А., Лучинин А.С., Лагунова О.Р., Докшина И.А., Исаева Н.В., Утемов С.В., Ветошкин К.А., Парамонов И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия (610027, Киров, ул. Красноармейская, 72)

THE EFFECTIVENESS OF THE CONDITIONING REGIMEN HIGH DOSE MELPHALAN WITH BORTEZOMIB WITH AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Khorobrykh M.N., Minaeva N.V., Zorina N.A., Luchinin A.C., Lagunova O.R., Dokshina I.A., Isaeva N.V., Utemov S.V., Vetoshkin, K.A., Paramonov I.V.

Federal state budgetary science institution «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal medical-biological Agency», Kirov, Russia (610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72)

khmn-nii@mail.ru, minaeva@niigpk.ru, zorina@niigpk.ru, glivec80@gmail.com, lagunova@niigpk.ru, dokshina.irisha@mail.ru, isaeva@niigpk.ru, utemov@niigpk.ru, kostyavetoshkin@yandex.ru, iparamon@gmail.com

Оценена общая эффективность режимов кондиционирования по достижению 5- и 10-летней общей выживаемости, которая составила 77% и 60,6% соответственно, а также безрецидивной выживаемости - 68,9%, медиана наблюдения не достигнута. Выявлены различия по достижению глубины ответа до и после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК). При однофакторном анализе двух режимов кондиционирования выявлено значительное (в 3,78 раза) увеличение безрецидивной выживаемости у пациентов, получавших в качестве режима кондиционирования высокодозный мелфалан в сочетании с бортезомибом. Оценка профиля токсичности, а также сроков восстановления гематологических показателей не установила отличий при использовании сравниваемых режимов. Применение комбинированных режимов кондиционирования может рассматриваться как перспективный метод повышения эффективности аутоТГСК у больных множественной миеломой.

Ключевые слова: *множественная миелома, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, мелфалан, бортезомиб, кондиционирование, безрецидивная выживаемость, токсичность*

Evaluated the overall effectiveness of conditioning regimens to achieve 5 - and 10-year overall survival, which was 77% and 60.6% respectively, and relapse - free survival rate of 68.9 per cent, the median follow-up was not achieved. The differences in achieving the depth of response before and after autologous transplantation of hematopoietic stem cells (autochk). Univariate analysis of the two conditioning regimens revealed significant (3.78 fold) increase in relapse-free survival in patients who received as conditioning regimen high-dose melphalan in combination with bortezomib. Evaluation of toxicity profile, as well as the timing of recovery of hematological parameters have not established differences when using the compare mode. The use of combined

modes of conditioning can be considered as a promising method of increasing the efficiency autochh in patients with multiple myeloma.

Keywords: *multiple myeloma, autologous hematopoietic stem cell transplantation, melphalan, bortezomib, conditioning, relapse free survival, toxicity*

Введение

Современные тенденции в лечении больных множественной миеломой (ММ) включают в себя использование многокомпонентных программ терапии, включающих препараты с различным механизмом действия, уже на этапах индукции с последующей высокодозной химиотерапией и аутоТГСК. Больные с вновь диагностированной ММ моложе 65 лет должны рассматриваться как кандидаты на проведение аутоТГСК. Превосходство аутоТГСК над химиотерапией без проведения трансплантации по уровню общего ответа (ОО), беспрогрессивной выживаемости (БПВ) и/или ОВ показали результаты проспективных рандомизированных исследований [2, 4, 7, 9, 12, 13, 29]. Так, применение только химиотерапии, по результатам К.Gale, позволило достичь полной ремиссии (ПР) лишь у 14% больных, в то время как частота ее достижения при выполнении аутоТГСК выросла до 38–40%. Медианы ОВ и БПВ в группах больных, получивших аутоТГСК и без ее проведения составили 54 и 42 месяцев и 32 и 20 месяцев соответственно [13]. По результатам аутоТГСК, представленным В. Sirohi и соавт., ОО был получен у 91% пациентов, среди которых ПР достигнута у 59%, показатели ВБП и ОВ составили 31 и 57% соответственно, а 10-летняя ОВ – 50% [30].

Результаты аутоТГСК зависят от глубины ответа, полученного на этапе индукционной терапии. Достижение ПР или очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР) является одним из основных прогностических факторов, влияющих на показатели БПВ и ОВ после аутоТГСК. Так, по данным Gay F. и соавт., проанализировавших результаты терапии 4990 больных ММ, которым выполнена аутоТГСК, выявлено статистически значимое увеличение ОВ у тех больных, которые достигли ПР перед трансплантацией (медиана 88,6 мес) по сравнению с больными, достигшими только частичной ремиссии (ЧР) (медиана 68 мес; $p < 0,001$) [14]. Время от начала индукционной терапии до трансплантации также имеет немаловажное значение. Отмечено увеличение ОВ при выполнении аутоТГСК в ранние сроки в отличие от результатов отложенной трансплантации [22]. Установлена более высокая летальность, связанная с трансплантацией, в случаях выполнения аутоТГСК в сроки более 12 мес от момента постановки диагноза [23].

Наряду с одиночной аутоТГСК используется двойная аутоТГСК. Однако роль ее в настоящее время остается не до конца определенной. Так, группой итальянских ученых приведены результаты многоцентрового рандомизированного исследования по оценке эффективности одиночной и двойной аутоТГСК, в которое были включены 192 больных ММ [8]. Одиночная аутоТГСК выполнена 98 больным (1 группа), двойная — 94 (2 группа). Показатели достижения ПР после первой аутоТГСК составили 27%, повторной —

25%; ПР + ЧР получены в 79 и 83% соответственно. Токсическая летальность, связанная с проведением высокодозной химиотерапии, составила 4%, после первой аутоТГСК — 1,7%, после повторной - отсутствовала. 2-летняя ОВ в обеих группах была одинаковой (90%). Аналогичные данные получены и J.J. Lahuerta и соавт. в 2003 г. по результатам II фазы клинических исследований [18]. Из 88 пациентов ПР достигнута в 48% случаях, 5-летняя ОВ составила 55%, БПВ — 28%. Многофакторный анализ не выявил улучшения показателей выживаемости больных, получивших двойную аутоТГСК. Другой группой исследователей показано, что выполнение второй аутоТГСК значительно улучшило показатели ОВ по сравнению с пациентами, получившими одиночную аутоТГСК (5-летняя ОВ 70 vs 55%; $p = 0,03$) [31]. Результаты, опубликованные группой IFM94 свидетельствуют о том, что 7-летняя БПВ и ОВ при проведении двойной трансплантации удвоились (20 vs 10% и 42 vs 21% соответственно). Выполнение двойной аутоТГСК может быть рекомендовано в качестве 1 линии терапии для пациентов высокого риска или в случаях, когда после первой аутоТГСК не достигнута ОХЧР или ПР.

«Золотым стандартом» предтрансплантационного режима кондиционирования традиционно считаются высокие дозы мелфалана (200 мг/м^2). Тем не менее, предпринимаются попытки оптимизации протоколов кондиционирования путем комбинации мелфалана с другими препаратами. Так, изучалось влияние сочетания мелфалана с общим облучением тела, бусульфаном и/или рядом других лекарственных средств, но статистически значимых различий в показателях выживаемости не получено за счет усиления гематологической и негематологической токсичности [1, 10, 11, 20, 25].

Представляется перспективным изучение предтрансплантационного кондиционирования мелфаланом в сочетании с бортезомибом. Их синергизм был отмечен как в *in vitro* [21, 24], так и *in vivo* [6, 28]. Включение бортезомиба в предтрансплантационную подготовку рассматривается как способ преодоления лекарственной резистентности и повышения чувствительности плазматических клеток к мелфалану.

Одним из первых описал опыт применения и оценил эффективность режима Mel200 + бортезомиб (1 мг/м^2 в -6, -3, +1 и +4-й дни) M. Roussel в 2010 г [27]. При использовании указанной комбинации у 70% пациентов была получена более чем ОХЧР, из них в 34% случаев достигнута ПР. Случаев ранней посттрансплантационной летальности и усиления гематологической токсичности не зафиксировано. При сравнении с результатами применения мелфалана 200 мг/м^2 в монорежиме частота достижения ОХЧР и ПР была 35 и 11% соответственно ($p = 0,001$).

T. Nishihori и соавт. в клиническом исследовании I–II фазы использовали бортезомиб в комбинации с мелфаланом у пациентов с первично-резистентной ММ [26]. Мелфалан 100 мг/м^2 вводили на -4 и -3 дни, инфузия бортезомиба в дозах 0,7, 1,0 или $1,3 \text{ мг/м}^2$ осуществлялась после второй дозы мелфалана. Медианы БПВ и ОВ составили 15 и 35 мес соответственно.

В то же время W. Huang и соавт. не удалось выявить улучшения глубины ответа и выживаемости без прогрессирования у пациентов с впервые диагностированной ММ по сравнению со стандартным режимом кондиционирования [17]. Не исключено, что больным ММ *de novo*, достигшим более чем ОХЧР применять многокомпонентные режимы предтрансплантационной подготовки нецелесообразно.

Анализ данных литературы дает основание рассматривать сочетание препаратов с разным механизмом действия в качестве предтрансплантационной подготовки как перспективный метод повышения эффективности аутоТГСК у больных ММ. Таким образом, представляется актуальным изучение влияния на показатели БПВ и ОВ, а также токсичность режимов кондиционирования с использованием бортезомиба.

В работе представлен опыт применения режима кондиционирования высокими дозами мелфалана и бортезомибом у пациентов с ММ, получивших аутоТГСК в клинике ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России».

Цель

Оценить эффективность и токсичность режима кондиционирования высокими дозами мелфалана и бортезомибом при проведении аутоТГСК у пациентов с ММ.

Материалы и методы

За период с 2002 по 2017 год в клинике института выполнена 131 аутоТГСК 91 пациенту с ММ.

Характеристика пациентов представлена в таблице 1. Традиционный режим кондиционирования использовали при проведении 56 аутоТГСК, из них 20 однократных и 18 - двойных (группа HDMe1). Комбинация высокодозного мелфалана с бортезомибом применялась при 75 аутоТГСК, из них 31 однократная и 22 двойных (группа Vor-HDMe1). Группы были сопоставимы между собой по основным характеристикам: полу, возрасту, иммунохимическому варианту и стадии заболевания.

На момент проведения аутоТГСК ПР или ОХЧР достигнута у 25 больных (65,8%), ЧР - у 13 пациентов (34,2%) в группе HDMe1 и у 39 (73,6%) и 14 (26,4%) пациентов в группе Vor-HDMe1 соответственно.

При использовании мелфалана в монорежиме последний инъецировали в дозе 200 мг/м^2 на -3, -2 сутки. Схема режима кондиционирования с бортезомибом представлена на рисунке 1. Концентрат аутологичных гемопоэтических стволовых клеток периферической крови вводили в день 0.

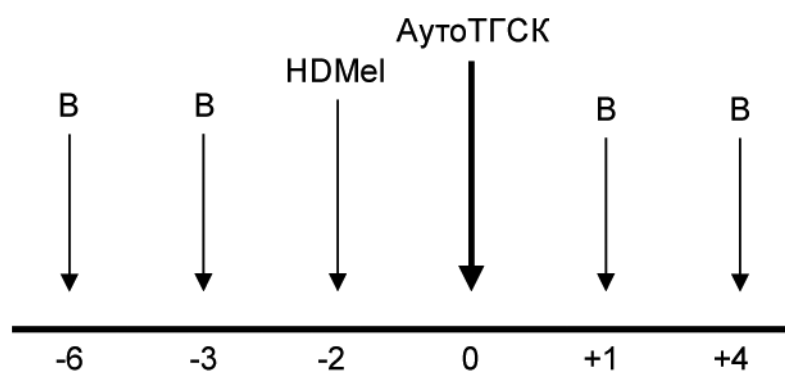
Все пациенты получали сопроводительную терапию, включающую в себя компоненты крови, антибактериальные, противогрибковые, противовирусные препараты. Восстановлением показателей крови считали уровни лейкоцитов $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов $\geq 20 \times 10^9/\text{л}$ в течение 3 последовательных дней. Токсичность режимов кондиционирования оценена в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явле-

ний Национального института рака США.

Таблица 1.

**Характеристика пациентов, получивших аутоТГСК
в клинике института**

Характеристика	HDMel	Bor-HDMel
Соотношение по полу, М/Ж, n	17/21, 38	24/29, 53
Медиана возраста, лет	51 (34-64)	55 (32-68)
Тип заболевания, n (%)		
IgG	30 (78,9%)	33 (62,3%)
IgA	3 (7,9%)	5 (9,4%)
IgD	0	3 (5,7%)
IgM	0	1(1,9%)
Бенс-Джонса несекретирующая	4 (10,6%) 1 (2,6%)	8 (15%) 3(5,7%)
Durie-Salmon стадия, n (%)		
IA	2 (5,3%)	2 (3,8%)
IIA	25 (65,8%)	32 (60,4%)
IIB	2 (5,3%)	4 (7,5%)
IIIA	7 (18,3%)	11 (20,8)
IIIB	2 (5,3%)	4 (7,5%)
Индукционная терапия, n		
без бортезомиба	12	6
с бортезомибом	26	47
Количество ТГСК, n		
однократная	20	31
двойная	18	22



В-Бортезомиб 1 мг/м²

HDMel- мелфалан 200 мг/м²

Рисунок 1. Схема режима кондиционирования высокими дозами мелфалана с бортезомибом

Статистический анализ данных произведен с использованием языка программирования R, версия 3.3 и пакета «survival». Для анализа непараметрических данных применяли критерии Хи-2 и Фишера при уровне статистической значимости $p < 0,05$. БРВ определяли как время от 1 или 2 аутоТГСК до даты рецидива или последнего наблюдения; ОВ - как время от даты диагноза до даты смерти или последнего наблюдения. Графики выживаемости построены по методу Каплан-Мэйера. Сравнение выживаемости в разных группах проводили при помощи log-rank теста. Для оценки влияния независимых предикторов на ОВ и БРВ был использован однофакторный регрессионный анализ Cox с расчетом показателя HR (относительного риска).

Результаты

К моменту проведения аутоТГСК у 64 (70%) пациентов получены ОХЧР и ПР. После проведения аутоТГСК число пациентов с оптимальным ответом на терапию увеличилось до 80 (88%) ($\chi^2=7.4836$, $df = 1$, $p=0.006227$). Общий период наблюдения за больными, включенными в исследование, составил от 8 до 174 мес (медиана – 28 мес). Медиана ОВ во всей группе пациентов не достигнута. Показатели 5-летней и 10-летней ОВ составили 77%, и 61% соответственно; 5-летняя БРВ при недостигнутой медиане - 69%. Частота ОХЧР и ПР при использовании режимов предтрансплантационной подготовки HDMel и Bor-HDMel составила 84% и 90% соответственно, различия не были статистически значимыми ($p=0,5161$). Для оценки влияния различных режимов кондиционирования на показатели ОВ и БРВ провели однофакторный анализ. Использование бортезомиба в составе режима кондиционирования не повлияло на ОВ больных ММ (HR=0,351, 95% ДИ 0,1-1,12, $p=0,078$). Наряду с этим, согласно проведенному однофакторному анализу частота рецидивов у пациентов, получивших предтрансплантационную подготовку Bor-HDMel, была в 3,8 раза ниже, чем у пациентов, получавших монотерапию мелфаланом (HR=0,26, 95% ДИ 0,08-0,84, $p=0,025$) (рисунок 2).

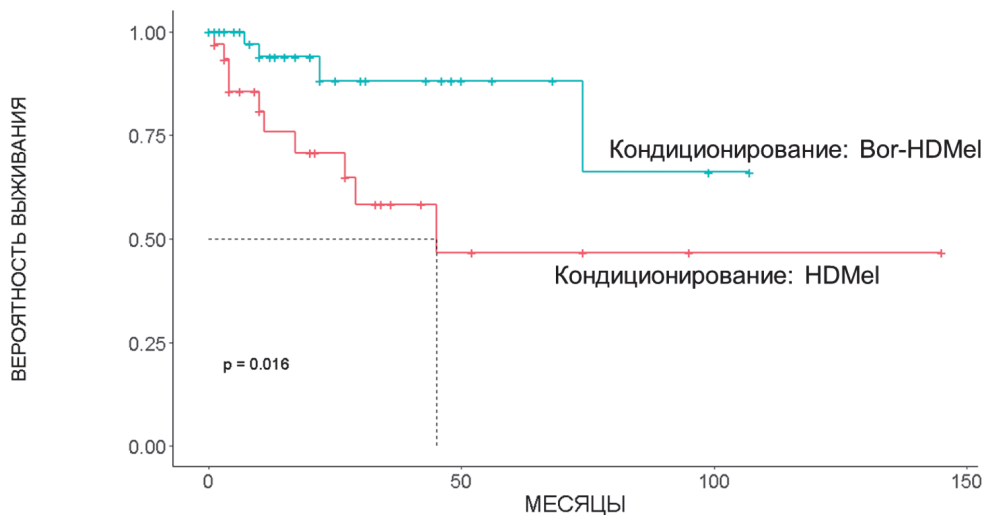


Рисунок 2. Сравнение показателей безрецидивной выживаемости при HDMel и Bor-HDMel

Проведена комплексная оценка профиля токсичности режимов кондиционирования HDMe1 и Vor-HDMe1.

Таблица 2.

Профиль токсичности режимов кондиционирования HDMe1 и Vor-HDMe1

Осложнения	HDMe1 n=56	Vor-HDMe1 n=75
Стоматит	48 (85,7%)	58 (77,3%)
Эзофагит	11 (19,6%)	13 (17%)
Энтеропатия	18 (32,1%)	29 (38,6%)
Фебрильная нейтропения	7(12,5%)	7(9,3%)
Бактериемия	3 (5,3%)	7(9,3%)
Аспергиллез легких	8 (14,2%)	9 (12%)
Недостаточность трансплантата	2 (3,6%)	2 (2,6%)
Токсическая нефропатия	3 (5,4%)	1 (7,5%)
Токсический гепатит	10 (17,6%)	9 (12%)
Токсический панкреатит	3 (5,3%)	3 (4%)
Периферическая полинейропатия	7 (12,5%)	4 (5,3%)
ЖКТ-кровотечение	1(1,7%)	2 (2,6%)

В период миелотоксической аплазии кроветворения наиболее частыми осложнениями явились мукозиты 1 -2 ст., энтеропатия 1-2 ст., эзофагит. Несмотря на включение в кондиционирование бортезомиба, не наблюдалось увеличения доли пациентов с периферической полинейропатией. Частота развития недостаточности трансплантата была сравнима в обеих группах. Летальность, связанная с проведением аутоТГСК, отсутствовала.

Сроки восстановления гематологических показателей были сопоставимы в обеих группах. Восстановление количества лейкоцитов до уровня $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$ в группе HDMe1 в среднем происходило на $+15,8 \pm 4,0$ дня. Восстановление тромбоцитов до уровня $\geq 20 \times 10^9/\text{л}$ отмечалось на $+16,8 \pm 4,9$ дня. В группе Vor-HDMe1 сроки восстановления не увеличивались и составили $+14,9 \pm 4,0$ и $+15,9 \pm 3,0$ дня соответственно. Количество проведенных аутоТГСК также не приводило к значимым различиям в приживлении трансплантата. При однократной ТГСК восстановление лейкоцитов происходило на $+15,8 \pm 4,4$ дня, тромбоцитов $+16,8 \pm 5,8$ дня. После выполнения второй ТГСК сроки восстановления составили $+14,9 \pm 2,5$ и $+15,9 \pm 4,5$ дня соответственно. Таким образом, добавление бортезомиба к стандартному режиму кондиционирования не привело к усилению гематологической и негематологической токсичности.

Заключение

АутоТГСК является эффективным методом лечения ММ. Режим предтрансплантационной подготовки высокими дозами мелфалана в сочетании с бортезомибом показал синергический эффект, что привело к увеличению показателей БРВ без достоверного увеличения токсичности. Комбинация

мелфалана с бортезомибом может рассматриваться как перспективный метод повышения эффективности аутоТГСК у больных ММ.

Список литературы

1. Comparison of high-dose melphalan with a more intensive regimen of thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide for patients with multiple myeloma/ A.Anagnostopoulos, A.Aleman, G.Ayers [et al.] // *Cancer*.-2004/-100(12).- P.2607-2612.
2. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma/ M.Attal, J.L.Harousseau, A.M.Stoppa [et al.]// *Intergroupe Francais du Myelome. N. Engl. J. Med.*- 1996.-335(2).- P.91-97.
3. M.Attal, J.L.Harousseau, T.Facon [et al.] *InterGroupe Francophone du myeloma. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. N. Engl. J. Med.* 2003; 249(26): 2495-502.
4. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321/ B.Barlogie, R.A.Kyle, K.C.Anders on [et al.] // *J. Clin. Oncol.*- 2006.-24(6).- P.929-936.
5. Long-term follow-up of autotransplantation trials for multiple myeloma: update of protocols conducted by the Intergroupe Francophone du Myelome, Southwest Oncology Group, and University of Arkansas for Medical Sciences/ B.Barlogie, M.Attal, J.Crowley [et al.]// *J. Clin. Oncol.*- 2010.- 28(7): 1209-14.
6. Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma/Berenson J.R., Yang H.H., Sandler K. [et al.]// *J. Clin. Oncol.*- 2006.-24(6).- P.937-944.
7. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA/ J.Blade, L. Rosinol, A.Sureda [et al.]// *Blood.*- 2005.-106(12).- P.3755-3759.
8. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study/ M.Cavo, P.Tosi, E.Zamagni [et al.]// *J. Clin. Oncol.*- 2007.-25(17).- P.2434-2441.
9. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma/ J. A.Child, G.J.Morgan, F.E.Davies [et al.]// *N. Engl. J. Med.*- 2003.-348(19).- P.1875-1883.
10. Melphalan plus total body irradiation (MEL-TBI) or cyclophosphamide (MEL-CY) as a conditioning regimen with second autotransplant in responding patients with myeloma is inferior compared to historical controls receiving tandem transplants with melphalan alone/ K.R.Desikan, G.Tricot, M.Dhodapkar [et al.]//*Bone Marrow Transplant.*-2000.-25(5).- P.483-487.
11. A new conditioning regimen involving total marrow irradiation, busulfan and cyclophosphamide followed by autologous PBSCT in patients with advanced multiple myeloma/ H.Einsele, M.Bamberg, W.Budach [et al.]// *Bone Marrow Transplant.*-2003.- 32(6).- P.593-599.
12. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe/ J.P.Ferland, S. Katsahian, M.Divine [et al.]// *J. Clin. Oncol.*-2005.-23(36).- P.227-9233.
13. Gale, K. Intensive Therapy Improves Survival in Patients With Multiple Myeloma/K. Gale //*N. Engl. J. Med.* – 2003.- 348: 1875-83.
14. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients/F.Gay, A.Larocca, P.Wijermans [et al.]// *Blood.*- 2011.- 117(11): 3025-31.
15. The prognostic impact of complete remission (CR) plus very good partial remission

(VGPR) in a double-transplantation program for newly diagnosed multiple myeloma (MM) [abstract]. Combined results of the IFM 99 trials/J.-L.Harousseau, M.Attal, P.Moreau [et al.]// *Blood*. (ASH Annual Meeting Abstracts).- 2006.-108(11). Abstract 3077.

16. Harousseau, J.L. The role of complete response in multiple myeloma/ J.L.Harousseau, M. Attal, H. Avet-Loiseau // *Blood*.- 2009.-114(15).- P.3139-3146.

17. High-dose melphalan with bortezomib as conditioning regimen for autologous stem cell transplant in patients with newly diagnosed multiple myeloma who exhibited at least very good partial response to bortezomib-based induction therapy/ W.Huang, J.Li, H.Li [et al.]// *Leuk. Lymphoma*.- 2012.- 53(12):2507-10. doi: 10.3109/10428194.2012.685735.

18. Tandem transplants with different high-dose regimens improve the complete remission rates in multiple myeloma. Results of a Grupo Espanol de Sindromes Linfoproliferativos/ Trasplante Autologo de Medula Osea phase II trial/ J.J.Lahuerta, C.Grande, J. Martinez-Lopez [et al.]// *Br. J. Haematol*. 2003.- 120.- P. 296-303.

19. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival/J.J.Lahuerta, M.V.Mateos, J.Martinez-Lopez [et al.]// *J.Clin. Oncol*.- 2008.-26(35).- P.5775-5782.

20. Conditioning regimens in autologous stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparative study of efficacy and toxicity from the Spanish Registry for Transplantation in Multiple Myeloma/ J.J.Lahuerta, J. Martinez-Lopez, C.Grande [et al.]// *Br. J. Haematol*.- 2000.- 109(1).- P.138-147.

21. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents/M.H.Ma, H.H.Yang, K.Parker [et al.]// *Clin. Cancer. Res*.- 2003.- 9(3).- P.1136-1144.

22. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation/J.Martinez-Lopez, J.Blade, M.V. Mateos [et al.]// *Blood*.- 2011.- 118(3): 529-34.

23. Autologous stem cell transplantation in the treatment of patients with multiple myeloma: our experience/S.Marjanovic, D.Stamatovic, M.Elez [et al.]// *Bone Marrow Transplant*.- 2013.- 48(Suppl. 2): S212 (abstr. P730).

24. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications/Mitsiades N., Mitsiades C.S., Richardson P.G. [et al.]// *Blood*.-2003.-101(6).- P.2377-2380.

25. Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myelome 9502 randomized trial/ P.Moreau, T.Facon, M.Attal [et al.]// *Blood*.- 2002.- 99(3).- P.731-735.

26. Bortezomib salvage followed by a phase I/II study of bortezomib plus high-dose melphalan and tandem autologous transplantation for patients with primary resistant myeloma/ T.Nishihori, T.J.Alekshun, K.Shain [et al.]// *Br. J. Haematol*.- 2012.-157(5):553-63. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09099.x.

27. Roussel, M. Bortezomib and high dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation for de novo multiple myeloma: final results of the IFM Phase II Study VEL/MEL /M. Roussel, A.Huynh, P.Moreau // *Blood*.- 2008.- 112: 160 (abstr.).

28. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma/ J.F.San Miguel, R.Schlag, N.K.Khuageva [et al.]// *N. Engl. J. Med*.-2008.-359(9).- P. 906-917.

29. Overall and event-free survival are not improved by the use of myeloablative therapy following intensified chemotherapy in previously untreated patients with multiple myeloma: a prospective randomized phase 3 study C.M./Se.geren, P.Sonneveld, B.van der Holt [et al.]// *Blood*.- 2003.- 101(6).- P. 2144-2151.

30. Single-center results of 200 mg/ m² melphalan and autograft in 451 myeloma patients: identifying patients with prolonged survival based upon albumin and B2-microglobulin at transplant/ B.Sirohi, R.Powles, J.Mehta [et al.]// Program and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 38th Annual Meeting.- 2002.- Orlando, Florida, Abstract 1072.

31. HOVON-65/ GMMG-HD4 randomized phase III trial comparing bortezomib, doxorubicin, dexamethasone (PAD) vs VAD followed by high-dose melphalan (HDM) and maintenance with bortezomib or thalidomide in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) / P.Sonneveld, I.G.H.Schmidt-Wolf, B.van der Holt [et al.]// Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).- 2010.- 116(21): Abstract 40.

32. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma/ H.J.Van de Velde , X.Liu , G.Chen [et al.]// Haematologica.- 2007.- 92(10):1399-1406.

Подписано в печать 14.09.2017.
Формат 62х94/8. Усл. печ. л. 33,75.
Заказ № 352. Тираж 200 экз.

ООО «Форекс Принт»
610033, г. Киров, ул. Московская, 122, оф. 601.
Тел./факс (8332) 526-027
forex_print@mail.ru

ООО «Кировская областная типография».
610004, г. Киров, ул. Ленина, 2.