

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и
переливания крови ФМБА России»

Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии

Сборник подготовлен
к печати при участии
ООО Конкордика



CONCORDICA

concordica.ru

Киров, 2020

Сборник включен в библиографическую базу данных eLIBRARY



**Актуальные вопросы
трансфузиологии, онкогематологии и
клеточной терапии
(сборник научных трудов)**

**К 60-летию Кировского научно-
исследовательского института
гематологии и переливания крови**

Материалы Всероссийской юбилейной конференции

Киров –2020

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

A43

Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии: к 60-летию Кировского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови [Текст]: сб. материалов междунар. научн.-практ. конф. / [редкол.: И.В.Парамонов (отв. ред.) и др.] - Киров: ООО «Флат-Принт», 2020. – 308 с.

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: K.A. Vorobiev - Doctor of Biology Sciences, Deputy of Director for Research;
- Executive Secretary: M.E. Kovtunova - Associate Professor, Scientific Secretary of the Institute.

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 «Flat-Print», 2020. - 308 with.

ISBN

Collection of scientific works of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Actual questions of transfusion of oncohematology and cell therapy». 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

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

A43

A43

© FSBSI «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia», 2020

© Design. LLC «Flat-Print», 2020

ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

ВОПРОСЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ

Бабийчук Л.А., Зубов П.М., Макашова Е.Е., Зубова О.Л. Криоконсервирование яросодержащих клеток кордовой крови человека: использование антиоксидантов как способ улучшения качества препаратов	7
Бабийчук Л.В., Коваль С.Н., Бабийчук Г.А., Мамонтов В.В. Клоногенная активность клеток кордовой крови до и после криоконсервирования	17
Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Модификация мембранных белков и образование активных форм кислорода в эритроцитах человека, криоконсервированных в присутствии глицерина	24
Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Шерстнев Ф.С. Иммуногематологические исследования при трансфузиях эритроцитов аллоиммунизированным реципиентам (клинический случай)	37
Никулина Н.С., Кормщикова Е.С., Калинина Е.Н., Исаева Н.В., Кривокорытова Т.В. Метрологическая оценка методик контроля показателей безопасности свежесамороженной плазмы	44
Попцов А.Л., Сухорукова Э.Е., Данилова И.Н., Караваева А.В. Частота выявления маркеров цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барр у доноров крови и ее компонентов	56
Утемов С.В., Ветошкин К.А., Князев М.Г., Бутина Е.В., Безрукова Л.А. Опыт работы криобанка Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»	66

ВОПРОСЫ КЛЕТЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Бутолина М.А., Ветошкин К.А., Стрига Е.Г., Назарова Е.Л., Калинина Е.Н., Трегубова Е.В., Габдулхакова А.Х., Дубровина А.А. Контроль качества концентратов мезенхимальных стромальных клеток костного мозга доноров	76
Ветошкин К.А., Целоусова О.М., Васкина Е.А., Назарова Е.Л., Бутолина М.А. Роль культуральных методов исследования костного мозга в диагностике нейтропении у детей	89
Змеева Ю.С., Исаева Н.В., Минаева Н.В., Зорина Н.А., Шерстнев Ф.С. Результаты оценки жизнеспособности яросодержащих клеток лейкоцитных концентратов при хранении в условиях охлаждения	100
Кудокочева О.В., Ломакин И.И., Бабийчук В.Г. Перспективы применения клеточной терапии в лечении COVID-19	111
Строна В.И., Репин Н.В., Марченко Л.Н., Говоруха Т.П., Чиж Ю.А. Перспективы использования криоэкстракта плаценты при лечении хронической почечной недостаточности (экспериментальное исследование)	119

ВОПРОСЫ ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ

Брызгалов А.Д., Поляков А.С., Один В.И. Особенности гемостаза при тиреотоксикозе	133
Киселева А.Н., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Игнатъев С.В. Полиморфизм генов системы гемостаза и эффективность экстракорпорального оплодотворения	141
Лянгузов А.В., Игнатъев С.В., Ковтунова М.Е., Воробьев К.А. Патологические особенности взаимодействия фактора Виллебранда и тромбоцитов при тромбообразовании (обзор литературы)	149

ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Докшина И.А., Минаева Н.В., Лагунова О.Р., Назарова Е.Л., Исаева Н.В., Росин В.А., Сарпова М.В., Трегубова Е.В., Игнатъев С.В., Парамонов И.В. Минимальная остаточная болезнь - прогностический индикатор эффективности лечения Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза взрослых	161
Дьяконов Д.А., Росин В.А., Фокина Е.С., Габдулхакова А.Х., Сухорукова Э.Е. Анализ ассоциативных связей между показателями гемограмм и мутационным статусом генов Jak2 и Calr при первичном миелофиброзе	171
Исаева Н.В., Минаева Н.В., Докшина И.А., Зорина Н.А., Змеева Ю.С., Росин В.А. Результаты определения аберрантных плазматических клеток в костном мозге больных множественной миеломой	179
Кормщикова Е.С., Никулина Н.С. Оценка стабильности лабораторных исследований по определению серологических маркеров грибковых инфекций у пациентов гематологической клиники с использованием контрольных карт	192
Минаев М.С., Перфилова Е.А., Дьяконов Д.А., Криницына Е.Е. CD163 и CD68 экспрессирующие клетки при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина	205
Никитин Е.Н., Кузьяев М.В., Грязева Е.М., Ходырев К.Л. Инфекционные осложнения этапа индукции ремиссии у больных острым лейкозом	217
Новоселова И.А., Овсепян В.А., Сарпова М.В. Прогностическое значение цитогенетических нарушений при хроническом лимфолейкозе	231
Попонина Е.А., Бутина Е.В., Йовдий А.В., Зайцева Г.А., Максимов О.Д. Роль положительного прямого антиглобулинового теста в диагностике гемолитических осложнений онкогематологических заболеваний	243
Шардаков В.И., Назарова Е.Л., Йовдий А.В., Докшина И.А. Характеристика уровней цитокинов и факторов врожденного иммунитета в зависимости от скорости прогрессии неходжкинских лимфом	252

ВОПРОСЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Зорина Н.А., Минаева Н.А., Фокина Е.С., Хоробрых М.Н., Шерстнев Ф.С., Исаева Н.В., Безрукова Л.А., Бутина Е.В., Ветошкин К.А., Логинова М.А., Парамонов И.В. Опыт гаплоидентичной родственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в Кировском НИИ гематологии и переливания крови	262
Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Кутявина С.С., Махова О.А., Обухов И.П., Кашин К.П., Парамонов И.В. HLA-аллели и гаплотипы потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Северного Кавказа	279
Логинова М.А., Махова О.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Кашин К.П., Парамонов И.В. Особенности распределения HLA-аллелей и гаплотипов в популяции русских, проживающих на территории Иркутской области	292

ВОПРОСЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.02

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЯРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ КАК СПОСОБ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ

Бабийчук Любовь Александровна

*доктор биол. наук, проф., зав. отделом криоцитологии Института проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

BabijchukLA@gmail.com

Зубов Павел Михайлович

*канд.биол.наук, ст.н.с. отдела криоцитологии Института проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

ptzubov@gmail.com

Макашова Елена Евгеньевна

*канд.биол.наук, м.н.с. отдела криоцитологии Института проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

olena.makashova@gmail.com

Зубова Оксана Леонидовна

*канд.биол.наук, ст.н.с. отдела криоцитологии Института проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

oksz1@ukr.net

CRYOPRESERVATION OF HUMAN CORD BLOOD NUCLEATED CELLS: USING OF ANTIOXIDANTS AS A STRATEGY FOR IMPROVEMENT OF SPECIMEN QUALITY

Lyubov Babijchuk

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Cryocytology Department,
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of
Sciences of Ukraine, Kharkov*

Pavel Zubov

Candidate of biological sciences (PhD equivalent), Senior Researcher, Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Elena Makashova

Candidate of biological sciences (PhD equivalent), Junior Researcher, Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Oksana Zubova

Candidate of biological sciences (PhD equivalent), Senior Researcher, Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка эффективности применения аскорбиновой кислоты и глутатиона в сочетании с различными концентрациями ДМСО при криоконсервировании ядродержащих клеток кордовой крови и их переносе в условия, моделирующие физиологические. Показано, что перенос клеток в данные условия приводит к снижению числа AnnexinV⁻/7AAD⁻-клеток по сравнению с данными, полученными сразу после размораживания. Использование антиоксидантов повышает количество живых неповрежденных клеток после моделирования трансфузии. Выявлен более высокий цитопротекторный эффект глутатиона по сравнению с аскорбиновой кислотой.

ABSTRACT

The effectiveness of ascorbic acid and glutathione in combination with various concentrations of DMSO was assessed upon cryopreservation of cord blood nucleated cells and their followed transfer to simulative physiological conditions. The transfer of frozen-thawed cells to these conditions led to decrease in the amount of AnnexinV⁻/7AAD⁻-cells compared to the data obtained immediately after thawing. Using of antioxidants increased the amount of vital intact cells after transfusion

modeling. Glutathione revealed a higher cytoprotective effect compared with ascorbic acid.

Ключевые слова: кордовая кровь человека; ядродержащие клетки; криоконсервирование; ДМСО; аскорбиновая кислота; глутатион; апоптоз; некроз.

Keywords: human cord blood; nucleated cells; cryopreservation; DMSO; ascorbic acid; glutathione; apoptosis; necrosis.

Процессы выделения ядродержащих клеток (ЯСК) из цельной кордовой крови (КК), обработка криопротекторами и процедура замораживания-отогрева могут влиять на структурно-функциональное состояние клеток [1, с. 64], вызывая их разрушение с последующим некрозом. Это является следствием формирования внутриклеточного льда и действия осмотического стресса. Также известно, что гибель клеток при криоконсервировании может проходить и путем апоптоза. Одной из возможных причин апоптоза является физический стресс, которому подвергаются клетки в процессе как получения из пуповины (изменение температурного режима, воздействие антикоагулянта), так и во время проведения многостадийного технологического процесса криоконсервирования (сепарация ЯСК, эквilibрация с криопротекторами, программное замораживание, отогрев) [2]. Другой вероятный путь — это увеличение в клетках свободных радикалов (активных форм кислорода), в результате чего происходит нарушение энергетического состояния и повреждения мембран клеток через перекисное окисление липидов, а также повреждения ДНК [3, с. 12]. Следует отметить, что апоптоз, вызванный факторами криоконсервирования, может развиваться в клетках не сразу после размораживания, а через некоторое время, что значительно затрудняет определение реального количества функционально активных клеток. В связи с этим оценка количества клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза/некроза, после инкубации криоконсервированных клеток в условиях, моделирующих физиологические *in vitro*, даст возможность более объективно

определить состояние ЯСК КК после переноса в кровеносное русло реципиента, а добавление к среде замораживания антиоксидантов может снизить интенсивность образования АФК и развитие негативных процессов в клетках [4, с. 64].

В работе использовали КК человека, сбор которой проводили на консерванте "Глюгицир" после получения информированного согласия у роженицы, с предварительным проведением дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству. Выделение фракции ЯСК из цельной КК проводили методом седиментации с использованием 6% раствора полиглюкина (ОАО «Биохимик», Россия). Время осаждения составляло от 30 до 50 мин, после чего супернатант отбирали и центрифугировали в течение 5-7 мин при 1000 об/мин для получения концентрата ЯСК. В клеточную суспензию вносили 25% раствор ДМСО до конечных концентраций в пробе 5, 7,5 и 10%. Антиоксиданты вносили перед криоконсервированием в следующих концентрациях: аскорбиновая кислота - 0,1 или 0,15 ммоль, глутатион - 1 или 3 мМ («Sigma-Aldrich», США).

Образцы криоконсервировали в программном замораживателе «Cryoson» (Германия) со скоростью 1 град/мин до -80°C с последующим погружением в жидкий азот (-196°C) [1, с. 64]. Отогрев осуществляли при температуре $37-40^{\circ}\text{C}$ на водяной бане при постоянном покачивании до исчезновения твердой фазы.

Моделирование трансфузии *in vitro* проводили путем переноса клеток в раствор Хэнкса и инкубации их при 37°C в течение часа. Разведение составляло 1:10. После часовой инкубации клеточной суспензии проводили центрифугирование при 1000 об/мин в течение 5 мин с последующим удалением супернатанта.

Оценку стадий апоптоза/некроза ЯСК проводили с одновременным внесением в пробы маркеров Annexin V FITC, CD45 PE и 7-AAD (BD, США) [5, с. 57]. Для этого к 50 мкл цельной крови добавляли 5 мкл Annexin V FITC, 10 мкл CD45 PE и 10 мкл 7-AAD, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Затем в течение 10 мин проводили лизис

эритроцитов с использованием хлорида аммония. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США). Результаты измерения оценивали с помощью программного обеспечения фирмы BD - CELLQuest Pro.

Статистическую обработку результатов проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программы «Excel» («Microsoft Office», США) после установки нормальности распределения. Данные представлены в виде $M \pm SE$. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Часовая инкубация криоконсервированных ЯСК КК в растворе Хэнкса (моделирование трансфузии *in vitro*) позволила выявить достоверное увеличение количества некротических клеток (AnnexinV/7AAD⁺) во всех образцах в 2 раза по сравнению с данными, полученными сразу после размораживания (Табл. 1). При этом количество клеток, находящихся на начальной стадии апоптоза и поздней стадии апоптоза/некроза, оставалось незначительным и практически не отличались от контрольных значений после деконсервации.

Таблица 1.

Количество клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза/некроза, после криоконсервирования в растворах с ДМСО различной концентрации и переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*, %

Конц. ДМСО, %		Стадии апоптоза			
		AnnexinV ⁻ /7AAD ⁻ клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁻ клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁺ клетки	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁺ клетки
5	А	70,4±3,8	1,2±0,3	5,9±1,7	23,5±2,9
	Б	44,4±2,5*	2,8±0,9*	3,1±1,1	50,6±2,9*
7,5	А	72,7±2,1	0,8±0,2	7,3±1,3	16,2±2,7
	Б	58,1±3,4*	1,7±0,7	3,9±1,4*	37,1±3,1*
10	А	70,8±3,8	0,8±0,2	7,2±0,7	19,9±2,4
	Б	54,0±4,2*	2,6±1,0*	4,5±1,2*	40,3±3,8*

Примечание: данные представлены в процентах в виде $M \pm SE$. А - данные, полученные сразу после размораживания ЯСК КК; Б - данные, полученные после криоконсервирования в растворах с различной концентрацией ДМСО и переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*; * - разница

статистически значима по отношению к данным, полученным сразу после размораживания; $p < 0,05$.

Следует отдельно отметить, что количество живых клеток (AnnexinV⁻/7AAD⁻) было также достоверно ниже, чем сразу после размораживания. Так, часовая инкубация клеток, криоконсервированных под защитой 5% ДМСО, в условиях, моделирующих физиологические *in vitro*, показала снижение данного показателя на 26%, 7,5% ДМСО - на 15% и 10% ДМСО - на 17%. Таким образом, перенос клеток в условия, моделирующие физиологические *in vitro*, продемонстрировал, что реальное количество живых клеток, которые будут осуществлять терапевтическое действие на организм реципиента, существенно меньше, чем сразу после размораживания. Это снижение коррелирует с повышением уровня AnnexinV⁺/7AAD⁺-клеток, что может свидетельствовать о невозможности клеток репарировать латентные нарушения или об уже запущенном процессе гибели клеток, который сразу после размораживания находился еще на ранней стадии и не мог быть обнаружен.

Существует предположение, что в процессе криоконсервирования клетка получает определенные «сигналы» к гибели, но сам процесс запускается только если отрицательное воздействие продолжается или усиливается. Считается, что одним из подобных «сигналов» являются АФК [6, с. 301]. Исходя из этого, было целесообразным проведение исследований по определению влияния антиоксидантов на развитие апоптических процессов в клетках после их инкубации в условиях, моделирующих физиологические *in vitro*.

Одним из таких соединений является аскорбиновая кислота (АК), которая, согласно данным литературы, способна уменьшать количество апоптических клеток, поскольку помимо прямого антиоксидантного действия АК препятствует передаче сигналов апоптоза за счет того, что подавляет способность фактора некроза опухолей индуцировать выход цитохрома С из

митохондрий и таким образом подавляет процесс активации каспазы 9 (каскада протеаз цистеиновых типа, которые инициируют апоптоз) [7].

Результаты наших исследований показали, что добавление к среде криоконсервирования АК в концентрации 0,1 или 0,15 ммоль приводит к снижению количества некротических клеток в образцах, криоконсервированных с различными концентрациями ДМСО, по сравнению с соответствующими контрольными группами без добавления данного антиоксиданта. Что касается живых клеток с нарушенной асимметрией (AnnexinV⁺/7AAD⁻), то добавление к криозащитной среде раствора АК не оказывало влияния на их количество, за исключением образца, содержащего 0,15 ммоль АК и ДМСО в концентрации 7,5% (табл. 2).

Таблица 2.

Количество клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза/некроза, после криоконсервирования в растворах с ДМСО и аскорбиновой кислоты разной концентрации и переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*, %

Конц. ДМСО, %	Конц. АК, мМ	Стадии апоптоза			
		AnnexinV ⁻ /7AAD ⁻ -клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁻ -клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁺ -клетки	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁺ -клетки
5	Контроль	44,4±2,5	2,8±0,9	3,1±1,1	50,6±2,9
	0,1	47,9±1,5	2,6±0,9	8,5±2,1*	41,2±3,1*
	0,15	49,9±1,2*	3,0±0,8	8,9±3,0*	38,7±4,2*
7,5	Контроль	58,1±3,4	1,7±0,7	3,9±1,4	37,1±3,1
	0,1	59,0±3,2	2,6±0,5	5,9±1,3	33,5±1,1
	0,15	59,6±2,7	3,7±0,7*	6,2±1,1	32,5±1,5
10	Контроль	54,0±4,2	2,6±1,0	4,5±1,2	40,3±3,8
	0,1	54,6±3,1	2,4±0,9	9,1±2,5*	34,3±1,7*
	0,15	50,8±1,9	2,8±0,6	8,4±1,8*	38,6±3,2

Примечание: Данные представлены в процентах в виде $M \pm SE$. * - разница статистически значима по отношению к соответствующим контрольным значениям без добавления антиоксиданта; $p < 0,05$.

Поскольку известно, что криоконсервирование может вызывать дефицит восстановленного глутатиона в митохондриях, который является единственной доступной защитой от метаболизма перекиси водорода и основным тиол

редокс-буфером для поддержания внутриклеточного редокс-гомеостаза, [4, с. 64] мы предполагаем, что внесение в среду криоконсервирования глутатиона способно нормализовать количество восстановленного глутатиона в клетках. Это будет способствовать противостоянию окислительному стрессу и, тем самым, предотвращению развития апоптических/некротических процессов в ЯСК во время криоконсервирования.

Анализ состояния образцов клеточных суспензий, криоконсервированных с добавлением глутатиона показал, что количество некротических клеток (AnnexinV⁺/7AAD⁺) (табл. 2) было значительно ниже по сравнению с группами без добавления антиоксиданта. Наименьшее количество некротических клеток наблюдалась в образцах, криоконсервированных с ДМСО в концентрации 7,5% и добавлением глутатиона в концентрации 1 или 3 мМ. В данных концентрациях глутатион снижал количество таких клеток с 37% до 8,2% и 9,3% соответственно. При этом не было обнаружено влияние на количество клеток, которые находились на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺/7AAD⁻). Однако наблюдался достоверный прирост числа клеток на поздней стадии апоптоза/некроза (AnnexinV⁺/7AAD⁺) во всех группах с добавлением глутатиона по сравнению с контрольными значениями без использования антиоксиданта.

Анализ количества неповрежденных живых клеток (AnnexinV⁻/7AAD⁻) после моделирования физиологических условий *in vitro* (табл. 3) показал, что добавление к криозащитной среде глутатиона способствовало сохранению большего их количества во всех экспериментальных группах. Максимальный эффект наблюдался при комбинации 7,5% ДМСО и 1 и 3 ммоль глутатиона (до 83% неповрежденных ЯСК).

Таблица 3.

Количество клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза/некроза, после криоконсервирования в растворах с ДМСО и глутатионом различной концентрации и переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*, %

Конц. ДМСО	Конц. GSH, мМ	Стадии апоптоза			
		AnnexinV ⁻ /7AAD ⁻ -клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁻ -клетки	AnnexinV ⁺ /7AAD ⁺ -клетки	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁺ -клетки
5	Контроль	44,4±2,5	2,8±0,9	3,1±1,1	50,6±2,9
	1	61,6±3,1*	2,1±0,7	11,6±1,5*	25,6±2,3*
	3	62,0±2,1*	2,5±0,4	12,4±2,1*	24,1±2,9*
7,5	Контроль	58,1±3,4	1,7±0,7	3,9±1,4	37,1±3,1
	1	77,7±5,2*	1,7±0,5	12,8±2,1*	8,2±3,3*
	3	76,5±4,3*	2,0±0,2	12,7±1,9*	9,3±4,8*
10	Контроль	54,0±4,2	2,6±1,0	4,5±1,2	40,3±3,8
	1	73,4±4,2*	2,5±0,9	13,3±2,8*	11,8±4,2*
	3	76,8±5,1*	2,8±0,7	12,4±1,9*	8,9±3,7*

Примечание: Данные представлены в процентах в виде M±SE. * - разница статистически значима по отношению к соответствующим контрольным значениям без добавления антиоксиданта; p<0,05.

Обращает на себя внимание тот факт, что добавление к криозащитной среде с 5% ДМСО 1 или 3 мМ глутатиона позволяет сохранить до 62% живых клеток с неповрежденной мембраной, что превышает показатели после замораживания клеток с 7,5% и 10% ДМСО без использования данного антиоксиданта. То есть добавление глутатиона позволяет получить такое же количество живых и функционально активных клеток, как и замораживание по общепринятым протоколам, но при этом снизить токсический эффект ДМСО за счет его меньшей концентрации.

Таким образом, перенос клеток в условия, моделирующие физиологические *in vitro*, приводит к выраженному снижению количества AnnexinV⁻/7AAD⁻-клеток по сравнению с данными, полученными сразу после размораживания. Данный факт требует дополнительного углубленного анализа для корректного расчета вводимой пациенту эффективной дозы препарата клеток.

Добавление антиоксидантов в криозащитные растворы способно повысить количество живых неповрежденных ЯСК (AnnexinV⁻/7AAD⁺) после криоконсервирования и переноса в условия, моделирующие физиологические in vitro.

Показан более высокий цитопротекторный эффект глутатиона по сравнению с аскорбиновой кислотой (83% живых клеток против 62,2% соответственно).

Список литературы

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Селиванов Е.А. Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Вып. 3, № 1. – С. 63–65.
2. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood / G. Chen, A. Yue, Z. Ruan [et al.] // Stem Cells Int. – 2016. – Vol. 2016 [Internet]. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/1396783/> (cited 2020 April 20).
3. Li R., Jia Z., Trush M.A. Defining ROS in Biology and Medicine // React Oxyg Species (Apex). – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 9–21.
4. Forman H.J. Glutathione – from antioxidant to post-translational modifier // Arch Biochem Biophys.– 2016.– Vol. 595.– P. 64–67.
5. Zimmermann M., Meyer N. Annexin V. 7-AAD staining in keratinocytes // Methods Mol Biol.– 2011.– Vol. 740.– P. 57–63.
6. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide /

J.P. Motta, B.E. Gomes, L.F. Bouzas // Cryobiology.– 2010.– Vol. 60, № 3.– P. 301–307.

7. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells / S.J. Ha, B.G. Kim, Y.A. Lee [et al.] // PLoS One.– 2016.– Vol. 11, № 8 [Internet].– URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161372> (cited 2020 April 20).

УДК 611.018.53.085.23:618.48]:57.086.13

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.02

КЛОНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Бабийчук Людмила Викторовна

канд. мед. наук, научный сотрудник отд. криобиологии систем репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Коваль Сергей Николаевич

доктор. мед. наук, профессор, зав. отделом артериальной гипертензии и профилактики ее осложнений ГУ «Национальный институт терапии им. Л.Т. Малой НАМН Украины», г. Харьков

Бабийчук Георгий Афанасьевич

доктор биол. наук, профессор, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Мамонтов Вячеслав Владимирович

младший. научный сотрудник отд. криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

CLONOGENIC ACTIVITY OF CORD BLOOD CELLS PRIOR TO AND AFTER CRYOPRESERVATION

Lyudmila Babychuk

MD, PhD, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Georgy Babychuk

titute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Sergey Koval

MD, PhD, Professor of Medicine, Head of Department of Arterial Hypertension and Prevention of Its Complications, Government Institution " L.T. Malaya Therapy National Institute of the National Academy of Medical Science of Ukraine", Kharkov

Vyacheslav Mamontov

m.n.s. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

АННОТАЦИЯ

Актуальным направлением в современной медицине является применение препаратов полученных из фетоплацентарного комплекса. Криотехнологии в настоящее время нашли широкое применение для решения ряда важных медико-биологических задач с целью долгосрочного хранения в низкотемпературных банках уникальных биологических объектов полученных из кордовой крови. Изучение функциональной активности клеток кордовой крови путём культивирования как до, так и после криоконсервирования даёт возможность оценить их функциональное состояние, а также пролиферативный и дифференцировочный потенциал.

ABSTRACT

An actual trend in modern medicine is the use of the products obtained from the fetoplacental complex. Cryotechnologies are now widely used to solve a number of important biomedical problems for the long-term storage of unique biological objects obtained from cord blood at low-temperature banks. The study of functional activity of cord blood cells by culturing both prior to and after cryopreservation makes it

possible to assess their functional state, as well as proliferative and differentiation potential.

Ключевые слова: ядродержащие клетки кордовой крови; криоконсервирование; культивирование.

Keywords: cord blood nucleated cells; cryopreservation; culturing.

В связи с достигнутыми в последнее время успехами в области клеточных технологий появилось новое направление в медицине – трансплантация гемопоэтических клеток ГСК с целью коррекции патологических состояний организма [3, 4].

Использование технологий криоконсервирования и низкотемпературного хранения позволило создать запасы препаратов ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК), содержащих гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) для клинического применения. Изучение функциональной активности клеток кордовой крови методом культивирования как до, так и после криоконсервирования даёт возможность оценить их функциональное состояние, а также пролиферативный и дифференцировочный потенциал [5].

Целью нашей работы было провести оценку клоногенной активности гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови до и после криоконсервирования.

В регенеративной медицине для восстановления функций органов и тканей используются клеточные препараты фетоплацентарного происхождения. Благодаря низкой иммуногенности и высокому регенеративному потенциалу, а также наличию в их составе достаточно большого количества стволовых клеток, они являются уникальным материалом для клеточной терапии [2].

Особый интерес представляет кордовая кровь (КК) и ее компоненты. КК является уникальной субстанцией с разнонаправленной биологической активностью. Отличительной особенностью КК является то, что она богата стволовыми гемопоэтическими клетками-предшественниками (ГСК). Применение КК эффективно при лечении ряда заболеваний, в патогенезе

которых ведущую роль играет снижение компенсаторно-защитных механизмов организма. В таких ситуациях ее действие направлено на восстановление специфических функций организма [6]. Установлена плюрипотентность и высокая пластичность гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови ГСК КК, что позволило рассматривать их как потенциальный источник для клеточной терапии широкого спектра заболеваний.

Использование технологий криоконсервирования и низкотемпературного хранения позволяет создавать запасы препаратов ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК), содержащих ГСК для клинического применения. Для изготовления криоконсервированного препарата ЯСК КК, который включает гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), была применена разработанная в ИПК и К НАН Украины технология выделения и криоконсервирования ЯСК КК.

Взятие КК человека осуществляли из вены пуповины после нормальных родов при наличии информационного согласия роженицы, соответственно к требованиям комиссии по биоэтике ИПК и К НАН Украины. При заготовке КК использовали консервант «Глюгицир» («Биофарм», Украина).

Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в растворе декстрана Д-60. В качестве криопротектора использовали ДМСО (диметилсульфоксид) в конечной концентрации 5%. Фенотип клеток $CD45^+$, $CD45^+CD34^+$, а также их жизнеспособность ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$) определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur «Becton Dickinson» (США) с использованием реагентов BD по ISHAGE протоколу фирмы «Becton Dickinson». Определение сохранности ЯСК КК проводили подсчетом клеток в камере Горяева согласно стандартной методике.

Поскольку эффективность применения препаратов КК в клинической практике определяется не только достаточным количеством ЯСК и ГСК, но и их структурно-функциональной полноценностью после размораживания, нами была проведена оценка структурно-функциональной полноценности и жизнеспособности получаемого препарата до и после криоконсервирования. На

основании активности колониобразования и спектра полученных CFU (колониобразующая единица) можно судить о функциональном состоянии данных клеток.

Для определения колониобразующей активности до и после криоконсервирования клетки культивировали в среде с концентрацией $3,2 \cdot 10^4$ /кл. Культивирование проводилось в условиях CO_2 -инкубатора при 95% влажности, температуре $37^\circ C$ и содержании 5% CO_2 в воздухе в течении 18-20 дней. Условия культивирования очень важны, чтобы создать оптимальный рост гемопоэтических колоний. Исследование колониобразующей активности клеток кордовой крови проводили используя инвертированный микроскоп («Carl Zeiss», Германия).

Для изучения колониобразующей активности была использована метилцеллюлозная среда «MethoCult H4434» («StemCell Technologies», Канада), изготовленная с целью поддержки оптимального роста эритроидных, гранулоцитарно-макрофагальных и мультипотентных гранулоцитарных, макрофагальных и мегакариоцитарных предшественников, содержащая набор цитокинов и факторов роста, необходимых для образования колоний из стволовых гемопоэтических клеток и клеток-предшественников разной степени коммитированности. В состав культуральной среды «MethoCult GF H4434» входит: метилцеллюлоза, фетальная бычья сыворотка, бычий сывороточный альбумин, 2-меркаптоэтанол, фактор стволовых клеток, колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF), интерлейкин-3 (ИЛ-3), эритропоэтин, Iscoves MDM [7].

При культивировании клеток КК нами была отмечена достаточно высокая функциональная и клоногенная активность как до, так и после криоконсервирования. Клетки образовывали колонии, имеющие эритроидную (CFU-E и BFU-E), гранулоцитарную (CFU-G), макрофагальную (CFU-M), гранулоцитарно-макрофагальную (CFU-GM) и смешанную морфологию (CFU-GEMM), что характерно для ГСК и клеток-предшественников гемопоэтического ряда.

Начало колониобразования отмечалось на 5-7 сутки культивирования. Первыми в культуре появлялись колонии гранулоцитарного-макрофагального ряда. Показано, что клетки, полученные из КК разных доноров, демонстрировали различную активность колониобразования. Общее количество колоний до и после криоконсервирования изменялось незначительно и составляло $228,6 \pm 31,4$ и $247,6 \pm 36,8$ соответственно.

Колонии в культурах криоконсервированных клеток по своей морфологии не отличались от нативных клеток, не отмечено существенных различий и в сроках начала колониобразования. Эритроидные колонии BFU-E были преобладающими в культурах как до, так и после криоконсервирования. В культурах, полученных из нативных и криоконсервированных клеток кордовой крови, соотношение разных типов достоверно не отличалось и составляло CFU-E - 5 %, BFU-E – 68 %, CFU-GM – 19 %, CFU-GEMM – 8 %.

После криоконсервирования наблюдалось некоторое увеличение колоний, что связано с гибелью части гранулоцитов в процессе замораживания-отогрева, в то время как относительная часть незрелых клеток-предшественников, которые образовывали колонии, увеличивались. При исследовании влияния криопротектора ДМСО на колонеобразующую активность было показано, что присутствие ДМСО в среде не приводит к уменьшению количества колоний и их морфологии.

Выводы

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что использование технологии криоконсервирования ЯСК, в том числе и ГСК, включающей выделение клеток ПГ с последующим их замораживанием с 5% ДМСО по специальной многоэтапной программе, позволяет сохранять не только достаточно высокое количество ЯСК и ГСК КК, но и их структурно-функциональную полноценность.

Список литературы

1. Гемопозитические стволовые клетки кордовой крови: новые методы выделения и криоконсервирования / Л.А.Бабийчук, В.В.Рязанцев, О.Л.Зубова [и др.] // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 13–15.
2. Грищенко В.И. Трансплантация продуктов эмбрио-фетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54–58.
3. Исаев А.А. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике / А.А. Исаев, В.С. Мелихова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 34–43.
4. Методы культивирования гемопозитических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации в онкогематологи и их решение / Вестник Северо-Западного / А.А. Айзейштадт, В.В.Багаева, А.С.Хрупина и [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2012. Т.4, № 4 – С. 12– 18.
5. Оценка функционального состояния стволовых гемопозитических клеток кордовой крови в препарате «криоцелл-гемоклетки» / Л. В. Бабийчук, С. А. Любич, Т. Ф. Петренко, П. М. Зубов, Л. А. Бабийчук. Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів: матеріали 28 всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 03 січня 2011 р, Харків, 2011. С. 8–10.
6. Смолянинов А.Б. Клеточные и генные технологии в кардиологии / А.Б. Смолянинов. – СПб.: СпецЛит, 2009. – 175 с.

7. Eaves C.J. Anatomy and physiology of hematopoiesis. In Childhood leukemias (2nd Edition) (CH Pui, ed.), Cambridge University Press. – Cambridge, 2006. – P. 69–105.

УДК: 576.32/.36: 577.352.3: 57.086.13

Рубрикатор: 76.03.31, 76.03.33

МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ В ПРИСУТСТВИИ ГЛИЦЕРИНА

Землянских Нина Григорьевна

канд. биол. наук, с.н.с. отдела криоцитологии Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии Наук Украины, г. Харьков

nzemliansky@gmail.com

Бабийчук Любовь Александровна

докт. биол. наук, профессор, зав. отделом криоцитологии Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии Наук Украины, г. Харьков

MODIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS AND PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HUMAN ERYTHROCYTES CRYOPRESERVED WITH GLYCEROL

Nina Zemlianskykh

cand. biol. sciences, senior researcher Department of Cryocytology, Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Lyubov Babiychuk

doct. biol. sciences, professor, head. Department of Cryocytology, Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

АННОТАЦИЯ

При криоконсервировании эритроцитов человека в присутствии глицерина не происходит пространственно-конформационных нарушений белков мембрано-цитоскелетного комплекса, определяемых по изменениям доступности –SH-групп и образованию высокомолекулярных полипептидных комплексов при действии «сшивающего» реагента диамида. Также не обнаружено изменений образования активных форм кислорода в таких клетках. Установленные факты указывают на сохранение основных структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов на уровне контроля, что характеризует высокую криопротекторную эффективность глицерина.

ABSTRACT

When erythrocytes were cryopreserved with glycerol there were no spatial-conformational alterations in proteins of the membrane-cytoskeleton complex, determined by changes in –SH-group availability and a formation of high molecular weight polypeptide complexes under the effect of crosslinking reagent diamide. Also, no changes in production of reactive oxygen species in those cells were detected. Revealed facts indicate maintaining of the basic structural and functional properties of erythrocyte membranes at the control level confirming the high cryoprotective effectiveness of glycerol.

Ключевые слова: эритроцит; мембрана; криопротектор; белки; активные формы кислорода

Keywords: erythrocyte; membrane; cryoprotectant; proteins; reactive oxygen species

В настоящее время методы криоконсервирования эритроцитов человека для медицинского применения основаны на использовании глицерина [9], который обеспечивает стабильность клеток в условиях замораживания-отогрева. Кроме того, после его удаления и переноса клеток в физиологические условия эритроциты сохраняют стабильность в русле крови. Такая устойчивость эритроцитов, криоконсервированных с глицерином, определяет

огромный интерес к исследованию модификаций структурно-функциональных свойств мембраны, которые позволяют клеткам пережить экстремальные условия замораживания-отогрева в присутствии данного криопротекторного агента (КПА) и в последующем поддерживать стабильность после трансфузии.

Известно, что доставка кислорода к тканям, обеспечивается не только благодаря гемоглобину, основному цитозольному белку, но и уникальным свойствам мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) эритроцитов, который определяет эластичность, деформируемость и механическую устойчивость клеток при прохождении через капилляры, размеры которых меньше размеров самих эритроцитов. Ранее было установлено, что глицерин повышает устойчивость эритроцитов в условиях механического стресса [12]. Принимая во внимание тот факт, что ключевая роль в ответе клеток на механические воздействия принадлежит плазматической мембране [6] и белкам связанного с ней цитоскелета [6, 10], исследования пространственно-конформационных изменений белков МЦК могут способствовать раскрытию механизмов стабилизации клеток в стрессовых условиях при криоконсервировании в присутствии глицерина. Для исследования модификаций белков может быть использован диамид, который окисляет сульфгидрильные ($-SH$) группы аминокислот с образованием дисульфидных мостиков между отдельными макромолекулами, вследствие чего формируются высокомолекулярные полипептидные комплексы (ВПК) [4]. Индуцированные диамидом ВПК могут состоять из ковалентно-сшитых субъединиц, принадлежащих одному или различным типам белков и, соответственно, отличаться по молекулярной массе. Такие ВПК обнаруживаются при электрофорезе белков МЦК (теней эритроцитов) в SDS-ПААГ (полиакриламидном геле в присутствии детергента SDS).

Вторым важнейшим аспектом модификации структурно-функциональных параметров клеток при замораживании-отогреве в присутствии глицерина может быть образование активных форм кислорода (АФК), в частности перекиси водорода (H_2O_2), вследствие чего возможно окисление различных

субклеточных компонентов и изменение их активности и/или структурного состояния. Предпосылки образования АФК в эритроцитах связаны, прежде всего, с присутствием в структуре гемоглобина металла с переменной валентностью. Даже в условиях, когда образование АФК незначительно превышает контрольные значения, клеточные компоненты могут реагировать на такие изменения, воспринимая их как регуляторный сигнал, что, в частности, связано с присутствием в эритроцитах белка пероксиредоксина 2 [7], который реагирует с H_2O_2 быстрее, чем $-SH$ группы других белков [3]. Поскольку пероксиредоксин участвует в сигнальной трансдукции окисления белков [8] и может выполнять шаперонную функцию [11], образование АФК в эритроцитах в присутствии глицерина может быть важным для модификации белков МЦК и регуляции стабильности клеток при криоконсервировании.

Цель исследования заключалась в оценке пространственно-конформационной модификации белков МЦК эритроцитов человека под влиянием криоконсервирования в присутствии глицерина на основе определения уровня индуцированных диамидом ВПК и анализа изменений белкового профиля теней эритроцитов с помощью SDS-ПААГ-электрофореза, а также оценке образования АФК в клетках в данных условиях.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: диамид, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), азид натрия (NaN_3), Трис, HEPES, EDTA, додецилсульфат натрия (SDS), β -меркаптоэтанол, краситель Coomassie BB G-250, акриламид, бис-акриламид (Sigma, США), бромфеноловый синий (Serva, Германия), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma, США), а также глицерин, ТХУ, NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (х.ч. или ос.ч.) и другие реактивы производства России и Украины.

Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, полученной из Центра службы крови г. Харькова, которые отмывали 3-кратным центрифугированием при 1200 g в течение 10 мин с использованием *раствора А* (150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl pH 7.4).

Криоконсервирование. К эритроцитам добавляли раствор 3.25 М глицерина, дополненного 0.22 М маннитола 0.150 М NaCl, 0.010 М Трис-НСl (рН 7.4) и переносили в контейнеры для замораживания, которые погружали в жидкий азот (-196 °С). Отогрев проводили в водяной бане при 42 – 44 °С. После размораживания эритроциты отмывали от глицерина в 3 этапа с использованием 0.6 М NaCl (первая отмывка) и 0.150 М NaCl (вторая и третья отмывка).

Получение теней эритроцитов. После размораживания эритроциты инкубировали при 37 °С в растворе, содержащем 2.17 М глицерин, 0.150 М NaCl, 0.010 М Трис-НСl (рН 7.4), при гематокрите 10% в течение 1 ч в присутствии 2.5 мМ диамид. Тени получали с помощью гипотонического шока [2], лизируя эритроциты при 2–5°С в растворе, содержащим 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8.0 и 0.1 мМ PMSF (объем клеточной суспензии и раствора ~1 : 30), а затем центрифугировали при 20000 g в течение 10 мин при 4°С. Отмывку теней от гемоглобина повторяли дважды. Тени эритроцитов растворяли в Sample-буфере: 0.05 М Трис-НСl (рН 6.8), 2% SDS, 20% глицерин, 0.7 мг/мл PMSF, 0.4 мг/мл NaN₃, 0.01% бромфеноловый синий.

Электрофорез проводили в плоских вертикальных SDS-ПААГ по системе Лэммли [2]. В качестве разделяющего геля использовали градиентный гель (5–20%). Белки в геле окрашивали Coomassie BB G-250. Молекулярных вес полипептидов определяли с помощью стандартов Fermentas life sciences Rage Ruler SM0661 (Литва). Количественный анализ белкового спектра (относительные изменения содержания полипептидов) выполняли с помощью программного обеспечения Gel (Свідоцтво №23683, Держдепартамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України, 12.02.2008).

Определение образования АФК. К эритроцитам после размораживания добавляли раствор, содержащий 2.17 М глицерина, 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4) (гематокрит 10%) и инкубировали в течение 18 ч при 37°С. Контролем служили эритроциты, инкубированные в Рингер-глюкозном растворе (125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, мМ, 1 мМ CaCl₂, 32 мМ HEPES

(рН 7.4), 5 мМ глюкоза). По окончании инкубации отбирали аликвоты, к которым добавляли раствор флуоресцентного красителя DCFH-DA (конечная концентрация 4×10^{-5} М) и инкубировали 30 мин при 37°С в темноте. Концентрацию клеток снижали до 10^6 клеток/мл для измерений показателей флуоресценции DCF (длина волны возбуждения/эмиссии 495nm/529nm) методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur (“Becton Dickenson”, США). Данные анализировали с помощью программы “WinMDI 2.8”.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программного пакета “Statgraphics plus 2.1 for Windows”. Данные представлены в виде $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение). Объем выборок составлял $n=6$. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью с помощью теста Колмагорова-Смирнова.

Результаты и обсуждение

Добавление 2.5 мМ диамида как в контрольную среду Рингера, так и в глицерин-содержащий раствор, используемый для инкубации криоконсервированных клеток, приводит к образованию ВПК.

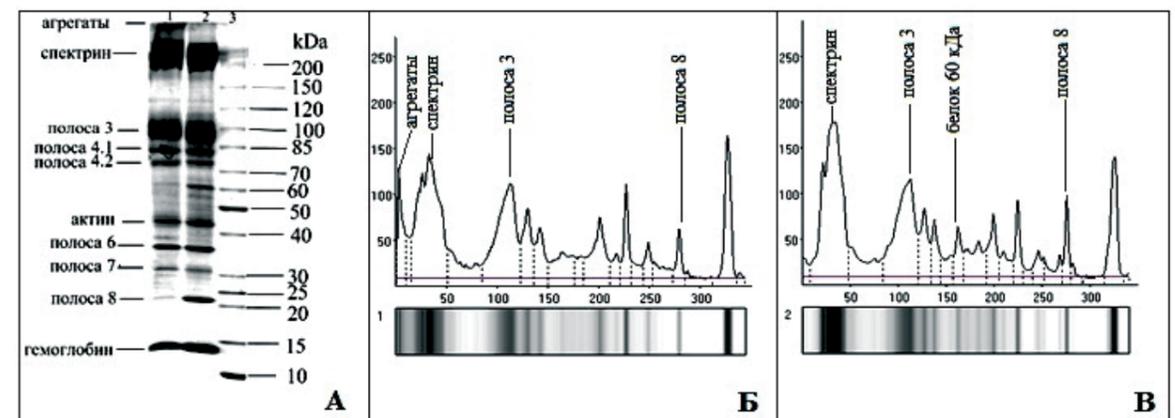


Рисунок 1. SDS-ПААГ электрофорез и денситограммы белков теней эритроцитов. (А): дорожка 1 – эритроциты, обработанные диамидом; дорожка 2 – нативные эритроциты, инкубированные в среде Рингера без диамида; 3 – маркерные белки; Б – денситограмма эритроцитов, обработанных диамидом (дорожка 1); В – денситограмма нативных эритроцитов (дорожка 2). Представлены данные типичного эксперимента

Оценка профилей белков теней контрольных эритроцитов, инкубированных с диамидом, и нативных эритроцитов, инкубированных без диамида, показывает (рис. 1), что лишь небольшая часть компонентов МЦК вовлекается в формирование ВПК, что коррелирует со снижением их относительного содержания. В частности, в сравнении с тенями нативных эритроцитов, которые инкубировали в отсутствие диамида, отмечается небольшое снижение содержания спектрина, белков полос 3, 5 (актина) и 6, а также практически полное исчезновение из электрофоретического профиля белка с м.м. 60 кДа и белка полосы 8 (рис. 1 А). Эти факты подтверждаются денситограммами, полученными при количественном анализе изображений (рис. 1, Б, В).

Аналогичные изменения обнаружены также в профиле белков криоконсервированных эритроцитов (рис. 2, дорожка 3). При этом изменения белковых фракций под влиянием диамида в образцах контрольных и криоконсервированных клеток выражены примерно в равной степени, т.е. статистически не отличаются между собой (табл. 1). Следовательно, глицерин способен достаточно эффективно защищать белки МЦК от стрессовых влияний, сопровождающих действие сверхнизкой температуры.

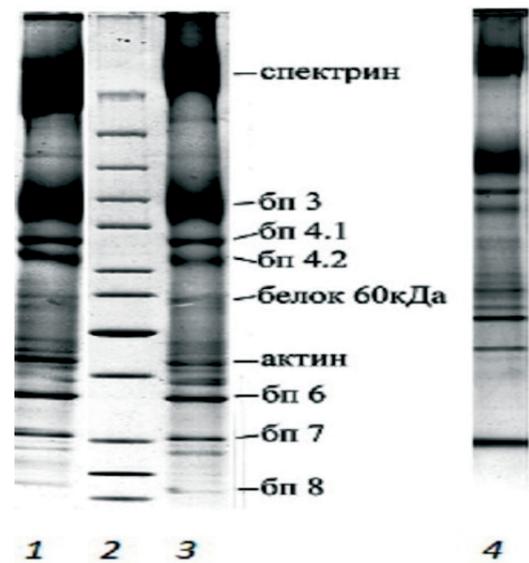


Рисунок 2. Изменения белкового профиля теней эритроцитов при криоконсервировании под влиянием диамида. 1 – контрольные эритроциты;

2 – маркеры; 3 – размороженные эритроциты в присутствии смеси глицерина и маннитола; 4 – размороженные эритроциты, отмытые от КПА

Таблица 1.

Количественная оценка изменений профиля белков в тенях эритроцитов под влиянием замораживания-оттаивания в присутствии глицерина

белок, %	нативные эритроциты (среда Рингера)	эритроциты, обработанные диамидом	
		контроль (среда Рингера)	криоконсервирование с глицерином
ВПК	–	7.4 ± 0.6	8.9 ± 0.9
Спектрин	22.7 ± 0.6	18.5 ± 0.8*	17.8 ± 1.0*
Белок полосы 3	21.1 ± 1.4	17.1 ± 0.9*	17.0 ± 2.1*
Белок полосы 4.1	4.3 ± 0.6	4.2 ± 0.9	4.0 ± 1.0
Белок полосы 5	4.5 ± 1.1	3.2 ± 1.0*	3.0 ± 1.2*
Белок полосы 6	4.2 ± 1.0	2.9 ± 1.1*	3.0 ± 1.3*
Белок полосы 8	3.5 ± 0.6	–	–
Белок 60 кДа	3.8 ± 0.6	–	–

Примечание: Содержание отдельных белковых фракций представлено относительно общего количества белка в пробе (%). * – статистические отличия от нативных эритроцитов ($p < 0.05$), $n = 6$.

Поскольку показателем эффективности действия КПА является обратимость всех изменений, вызванных процессами замораживания-оттаивания, при возвращении клеток в физиологические условия, то важно оценить параметры модификации белков МЦК по доступности –SH-групп к сшивающему действию диамида в эритроцитах, отмытых от глицерина. Анализ электрофоретических профилей белков показал, что после удаления глицерина распределение белковых фракций и содержание ВПК не отличались от контрольных клеток (рис. 2, дорожка 4), благодаря чему эритроциты после возвращения в физиологические условия эффективно выполняют их специфические функции.

Таким образом, в условиях криоконсервирования эффективная защита клеток может быть связана в значительной мере с ограничением пространственно-конформационной модификации белков МЦК, поскольку уровень образования ВПК и белковый профиль МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерина, не отличался от контрольных образцов. В этой связи необходимо отметить, что при замораживании эритроцитов без применения какого-либо криопротектора уровень ВПК значительно превышает контрольные показатели [1].

Для определения интенсивности окислительных процессов в эритроцитах использован флуоресцентный краситель $H_2DCF-DA$, который дезацетируется после прохождения через плазматическую мембрану, но остается нефлуоресцентным соединением (H_2DCF) до момента его взаимодействия с АФК, после чего он трансформируется во флуоресцирующую окисленную форму DCF. Изменения интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах можно описать 2 параметрами: количеством клеток в зоне, соответствующей маркеру контрольных показателей (M1), и значением медианы гистограмм распределения, показывающей величину, относительно которой клетки в выделенной зоне разделены на две равные по численности части. Медиана гистограммы показывает сдвиг интенсивности окислительных процессов в клеточной суспензии, даже если количество клеток в зоне, соответствующей маркеру контрольных показателей, не меняется. Инкубирование эритроцитов в Рингер-глюкозной среде характеризует контрольные параметры интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах, относительно которых фиксируются изменения (рис. 3 а).

Оценка изменений интенсивности образования АФК в размороженных эритроцитах выполнена после гипотермического хранения клеток, чтобы лучше понять отсроченные последствия действия низких температур для функционирования различных субклеточных компонентов. Кроме того, нередко возникает ситуация, при которой трансфузия откладывается на определенный период, что предполагает необходимость хранения крови в

условиях гипотермии. При этом глицерин может оставаться в среде в течение всего периода хранения или предварительно удаляется. Поэтому эритроциты после размораживания хранили как в присутствии КПА, так и в Рингер-глюкозном растворе после удаления КПА.

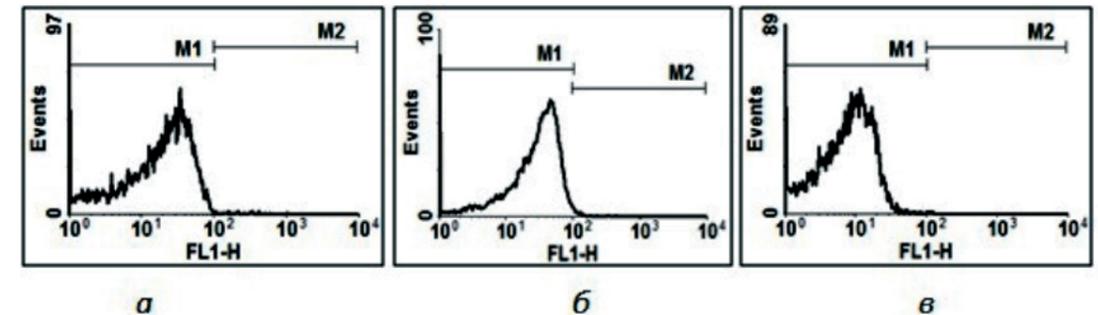


Рисунок 3. Интенсивность образования АФК в криоконсервированных эритроцитах после хранения в течение 16 ч при 4 °С. а – контроль (раствор Рингера); б – размороженные эритроциты в присутствии смеси глицерина и маннитола; в – эритроциты, отмытые от КПА после размораживания и переноса в среду Рингера. Примечание: Ось X – интенсивность флуоресценции DCF, (усл. ед.); ось Y (events) – количество клеток. M1 – маркер, охватывающий зону контрольных клеток; M2 – маркер, характеризующий клетки с интенсивностью флуоресценции DCF выше контрольных показателей

Хранение размороженных эритроцитов в присутствии глицерина (рис. 3 б) не ведет к интенсификации образования АФК в клетках в сравнении с показателями контроля, что подтверждается данными количественной оценки гистограмм (табл. 2).

Гипотермическое хранение криоконсервированных эритроцитов в растворе Рингера после удаления глицерина (рис. 3 в и табл. 2) характеризуется снижением значения медианы гистограмм интенсивности флуоресценции DCF в сравнении с контрольными показателями. Причины снижения интенсивности флуоресценции могут быть связаны с изменениями субпопуляционного состава эритроцитов после размораживания и удаления КПА, что обусловлено лизисом части клеток на каждом из этих этапов. Очевидно, что лизису должны подвергаться субпопуляции старых эритроцитов, чувствительных к различным стрессам [5]. Поэтому преобладание зрелых и юных эритроцитов с высоким

антиоксидантным потенциалом обуславливает снижение значения медианы гистограмм распределения после удаления криопротекторов.

Следует также подчеркнуть, что в исследованных образцах как после размораживания, так и после удаления КПА в процессе гипотермического хранения отсутствуют клетки, которые бы имели показатели флуоресценции, превышающие контрольные значения, т.е. находились бы в зоне маркера M2. Данные факты указывают на стабильность метаболических характеристик клеток, криоконсервированных в присутствии глицерина при гипотермическом хранении.

Таблица. 2

Количественная оценка гистограмм распределения эритроцитов, криоконсервированных в смеси глицерина (3.25 M) и маннитола (0.22 M), по показателям интенсивности флуоресценции DCF

Экспериментальные группы	Количество клеток, %	Медиана, усл. ед.
	M1	M1
Рингер-глюкозный раствор (контроль)	100	25.9 ± 3.1
Размораживание эритроцитов	99.9 ± 0.01	27,5 ± 4,9
удаления КПА после размораживания	99.85 ± 0.01	9,6 ± 1,7*

Примечание: * – данные статистически отличаются от контрольных показателей с уровнем значимости $p < 0,05$.

Таким образом, использование смеси глицерина и маннитола предотвращает развитие окислительных процессов в эритроцитах при криоконсервировании и последующем гипотермическом хранении.

Выводы. Результаты, представленные в данном исследовании, свидетельствуют о способности глицерина в условиях криоконсервирования благоприятно влиять на пространственно-конформационные параметры белков мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов, оцениваемые по изменениям доступности –SH-групп аминокислот и образованию

высокомолекулярных полипептидных комплексов, индуцируемых «сшивающим» реагентом диамидом. Кроме того, при криоконсервировании глицерин позволяет регулировать образование активных форм кислорода, постоянно генерируемых в условиях активного метаболизма, на уровне контрольных показателей. Установленные факты характеризует высокую криопротекторную эффективность глицерина и могут быть использованы в качестве ориентира при совершенствовании и разработке новых методов криоконсервирования клеток.

Список литературы

1. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Пространственно-конформационные модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса криоконсервированных эритроцитов. // Биол. Мембраны. 2019. Т.36, №2. С. 125-136.
2. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. // Biochemistry. 1971. V. 10 №13. P. 2606–2617.
3. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. / Peskin A.V., Dickerhof N., Poynton R.A., Paton L.N., Pace P.E., Hampton M.B., Winterbourn C.C. // J Biol Chem. 2013. V. 288. №20. P. 14170-14177.
4. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents. / Haest C.W., Kamp D., Plasa G., Deuticke B. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 469. №2. P. 226–230.

5. Investigation of oxidative stress parameters in different lifespan erythrocyte fractions in young untrained men after acute exercise. / Gwozdziński K, Pieniżek A, Tabaczar S, Jegier A, Brzeszczynska J. // *Exp Physiol*. 2017 V. 102. №2. P. 190-201
6. Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994. V. 23. P. 787–818.
7. Rhee S. G. Overview on Peroxiredoxin. // *Mol Cells*. 2016. V. 39. №1. P. 1-5.
8. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. // *J Biol Chem*. 2014. V.289. №13. P. 8735-8741.
9. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. // *Transfus. Med. Rev.* 2005. V. 19. №2. P. 127–142.
10. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. / Svetina S., Kuzman D., Waugh R.E., Zihelr P., Zeks B. // *Bioelectrochemistry*. 2004. V. 62. №2. P. 107–113.
11. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. / Jang H.H., Lee K.O., Chi Y.H., Jung B.G., Park S.K., Park J.H., Lee J.R., Lee S.S., Moon J.C., Yun J.W., Choi Y.O., Kim W.Y., Kang J.S., Cheong G.W., Yun D.J., Rhee S.G., Cho M.J., Lee S.Y. // *Cell*. 2004 V. 117. №5. P. 625-635.
12. Zemlianskykh N.G. The effects of cryoprotective substances on the mechanical stability and geometric parameters of human erythrocytes. // *Biophysics*. 2018. V. 63. №1. P. 66–76.

УДК 616.419

Тематический рубрикатор: 76.29.33

**ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ
ТРАНСФУЗИЯХ ЭРИТРОЦИТОВ АЛЛОИММУНИЗИРОВАННЫМ
РЕЦИПИЕНТАМ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)**

Йовдий Анна Васильевна

*кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
annaovdii@bk.ru*

Бутина Елена Владимировна

*кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
butinalena@yandex.ru*

Попонина Елена Александровна

*кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
senkina.elena@rambler.ru*

Шерстнёв Филипп Сергеевич

*кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
sherstnyov_phil@mail.ru*

IMMUNOHEMATOLOGICAL RESEARCHES AT TRANSFUSIONS OF RED BLOOD CELLS BY ALLOIMMUNIZED RECIPIENTS (CLINICAL CASE)

Anna Yovdiy

PhD, MD, Researcher, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Elena Butina

PhD, MD, head of laboratory of Immunohematology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Elena Poponina

PhD, MD, Researcher, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Philipp Sherstnev

PhD, MD, Head of the Department of Transfusiology and Processing of Hematopoietic Blood Stem Cells, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

В статье представлен разбор клинического случая иммуногематологического обеспечения аллоиммунизированной больной, относящейся к группе реципиентов-«респондеров», имеющих высокий риск возникновения посттрансфузионных осложнений и трудности при подборе совместимых доноров.

ABSTRACT

The article presents an analysis of the clinical case of immunohematological support for an alloimmunized patient belonging to the group of “responder” recipients with a high risk of transfusion complications and difficulties in selecting compatible donors.

Ключевые слова: эритроциты; антигены; аллоантитела; индивидуальный подбор доноров.

Key words: red blood cells; antigens; alloantibodies; individual selection of donors.

Более 2% пациентов гематологической клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России иммунизированы к антигенам эритроцитов, что в 10-20 раз превышает популяционные значения (частота встречаемости антиэритроцитарных антител у доноров крови составляет 0,10-0,22%) [1, с.107; 2, с. 60; 6, с. 57;]. Наличие аллоантител влечет за собой риск развития посттрансфузионных реакций и осложнений и может препятствовать своевременному обеспечению реципиентов совместимыми эритроцитсодержащими компонентами крови (ЭСК), жизненно важными для больных с тяжелой анемией [3, с.55; 4, с. 40; 5, с. 52; 7, с. 13; 8, с. 1]. Реципиенты с выявленными антителами требуют индивидуального подбора доноров перед каждой трансфузией эритроцитов независимо от сроков выявления антител.

Описание клинического случая

Пациентка Ж., 59 лет, считает себя больной с ноября 2013 г., когда появились слабость, повышенная утомляемость. Обследовалась по месту жительства с диагнозом «Анемия неясной этиологии». С марта 2014 г. получала заместительную терапию ЭСК. Была направлена на консультацию к гематологу. В анамнезе 3 беременности, 1 роды.

Больная госпитализирована 01.11.2014 г. в клинику института для обследования, в результате которого определен диагноз: «Миелодиспластический синдром. Рефрактерная анемия с избытком бластов-1». При поступлении выполнены иммуногематологические тесты с использованием реактивов фирмы BioRad (США). Определен фенотип эритроцитов больной: В Rh-положительный С+с+Е-е+С^w- К-k+. Результаты скрининга антител с тест-эритроцитами: I-, II+, III-. Установлена

специфичность антител: анти-Е. С момента установления диагноза пациентка нуждалась в постоянной заместительной терапии ЭСК 1-2 раза в месяц.

Перед всеми трансфузиями в непрямом антиглобулиновом тесте (НПАГТ) проводился подбор доноров, идентичных с пациенткой по Резус-фенотипу. Количество совместимых доноров составило 100%. Анти-Е антитела продолжали выявляться на протяжении 5 месяцев с момента их обнаружения (табл. 1). Подбор доноров, фенотипически совместимых с реципиентом, привел к уменьшению титра аллоантител ниже уровня выявляемости. В течение следующих 15 месяцев наблюдался отрицательный результат скрининга антител.

Таблица 1.

Зависимость результатов индивидуального подбора доноров от специфичности антител

Период	Специфичность антител	Взаимодействие антител с собственными эритроцитами	Общее количество подобранных доноров	Количество совместимых доноров в НПАГТ
11.14-03.15	Анти-Е	нет	9	9 (100%)
09.15-11.16	нет	нет	28	28 (100%)
12.16	Неустановленной специфичности	нет	6	5 (83%)
02.17-01.18	нет	нет	27	27 (100%)
02.18-05.18	Полиспецифические аутоантитела	да	29	15 (52%)
06.18-04.19	нет	нет	41	40 (98%)
05.19	Неустановленной специфичности	нет	6	5 (83%)
06.19-03.20	нет	нет	45	41 (91%)

В декабре 2016 года у больной обнаружены аллоантитела неустановленной специфичности, агглютинирующие эритроциты доноров. Только 83% доноров

совместимы с больной в НПАГТ. В 2017 г. результат скрининга антител вновь стал отрицательным, в НПАГТ совместимы 100% доноров.

С февраля по май 2018 г. у пациентки выявлены полиспецифические аутоантитела (прямой антиглобулиновый тест положительный за счет иммуноглобулинов IgG2/4), существенно затруднявшие подбор ЭСК – только 52% доноров были совместимы с больной в НПАГТ.

Проведено типирование фенотипа больной по антигенам систем Kell, Duffy, MNS, Kidd. Двойная популяция эритроцитов, являющаяся следствием интенсивной трансфузионной терапии, не позволила получить однозначный результат тестирования. Поиск в регистре доноров, типированных по 8 антигенным системам эритроцитов, оказался невозможным. Был продолжен подбор ЭСК «слепым» методом только на основании результатов НПАГТ.

Следующие 11 месяцев антиэритроцитарные антитела не выявлялись (98% доноров совместимы в НПАГТ). В мае 2019 года вновь выявлены антитела неустановленной специфичности, циркулировавшие в крови в течение 2 месяцев. С июля 2019 г. результат скрининга антител отрицательный, однако только 91% доноров совместимы в НПАГТ.

На рисунке 1 представлен результат НПАГТ с сывороткой крови больной и эритроцитами 5 доноров. Для трансфузий разрешены ЭСК только доноров 171, 173, 179, 269.

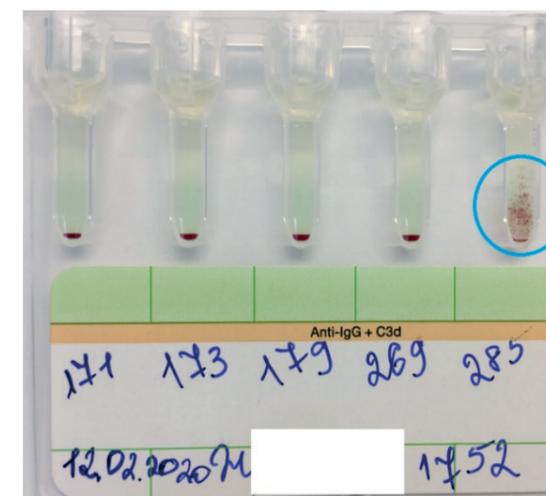


Рисунок 1. Результаты индивидуального подбора доноров больной с отрицательным скринингом антител

Заключение

Представленный клинический пример иллюстрирует основные иммуногематологические правила, обеспечивающие безопасность трансфузий пациентам с выявленными антиэритроцитарными аллоантителами.

1. Реципиенту с идентифицированными аллоантителами ВСЕГДА переливаются эритроциты, не имеющие в фенотипе специфичного антигена.

2. Аллоиммунизированные больные относятся к группе «респондеров», то есть способны активно вырабатывать антитела как к донорским, так и к собственным эритроцитам. Выявляемые у таких пациентов полиспецифические антитела могут экранировать наличие антител к трансфузионно-опасным антигенам.

3. Отрицательный результат скрининга антител не должен дезориентировать врачей. НПАГТ с эритроцитами доноров является обязательным тестом на совместимость перед каждой трансфузией ЭСК.

4. Подбор доноров для аллоиммунизированных реципиентов должен проводиться по максимально доступному спектру антигенов.

5. Пациентам с диагнозом «Миелодиспластический синдром» необходимо проводить типирование антигенов систем Rh, Kidd, Duffy, MNS до начала трансфузионной терапии.

6. Данные иммуногематологического анамнеза играют решающую роль в тактике подбора совместимых доноров. Для обеспечения доступности информации о результатах тестирования антиэритроцитарных антител необходимо создание регистра пациентов, сенсibilизированных к антигенам эритроцитов.

Список литературы

1. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями / Е.В. Бутина,

Н.В. Минеева, Г.А. Зайцева [и др.] // Трансфузиология. – 2019. – Т. 20, № 2. – С. 107-114.

2. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы) / Н.В. Минеева, И.А. Пашкова, И.И. Кробинец [и др.] // Онкогематология. — 2015. — Т. 10, № 4. — С. 60–65.

3. Иммунологическое обеспечение трансфузий эритроцитсодержащих сред в клиниках гематологического научного центра / Л.Л. Головкина, Р.С. Каландаров, А.Г. Стремоухова [и др.] // Трансфузиология. — 2014. — Т. 15, № 2. — С. 55–56.

4. Минеева Н.В. Иммунологические посттрансфузионные осложнения // Трансфузиология. — 2001. — Т. 2, № 2. — С. 40-44.

5. Оптимизация подбора совместимых пар «донор — реципиент»: роль скрининга антител и фенотипирования антигенов эритроцитов реципиентов при гемотрансфузиях / Н.В. Минеева, И.А. Пашкова, И.И. Кробинец [и др.] // Трансфузиология. — 2015. — Т. 16, № 2. — С. 52–59.

6. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники / Е.В. Бутина, Т.А. Коряковцева, О.Д. Максимов [и др.] // Трансфузиология. – 2018. – Т. 19, № 1. – С. 57-66.

7. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями / Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, И.И. Кробинец [и др.] // Онкогематология. — 2013. — Т. 8, № 4. — С. 13–17.

8. Von Zabern I., Wagner F.F, Flegel W.A. Ten years Rhesus Immunization Registry // Vox Sanguinis. — 2010. — № 99. — P. 1–55.

УДК 616.98

Тематический рубрикатор: 76.03.00

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ СВЕЖЕЗАМОРОЖЕННОЙ
ПЛАЗМЫ**

Никулина Наталия Сергеевна

младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

nikulina@niigpk.ru

Кормщикова Елена Сергеевна

и.о. заведующего лабораторией препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kormschikova@niigpk.ru

Калинина Елена Николаевна

начальник отдела обеспечения качества Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kalininaen@niigpk.ru

Исаева Наталья Васильевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский

институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

isaeva@niigpk.ru

Кривокорытова Татьяна Валериевна

заведующий клинической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

krivokorytova@niigpk.ru

**METROLOGICAL ASSESMENT OF CONTROL THE SAFETY OF FRESH
FROZEN PLASMA**

Nataliya Nikulina

junior Researcher of Blood products laboratory, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Elena Kormshchikova

acting head of the Blood products laboratory, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Elena Kalinina

head of Quality Assurance department, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Natalia Isaeva

candidate of Biological Sciences, Senior research scientist of laboratory of cellular and molecular immunology, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Tatyana Krivokorytova

head of clinical laboratory, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

Цель: провести метрологическую оценку методик контроля показателей безопасности свежзамороженной плазмы. **Методы:** одностадийный клоттинговый, лазерная проточная цитофлуориметрия, описательная статистика. **Результат:** приписанная характеристика сходимости методики определения фактора VIII составила 7,8 %, остаточного содержания эритроцитов – 18,8 %, тромбоцитов – 21,2 % лейкоцитов – 29,9 %. **Выводы:** обосновано применение методик на основе одностадийного клоттингового метода и лазерной проточной цитофлуориметрии для определения показателей безопасности свежзамороженной плазмы.

ABSTRACT

The aim: carry out a metrological assesment of control the safety of of fresh frozen plasma. **Methods:** single-stage clotting method, laser flow cytofluorimetry, descriptive statistics. **Result:** the attributed characteristic of the method for determining factor VIII was 7.8 %, the residual content of red blood cells - 18.8 %, platelet count - 21.2 % of leukocytes - 29.9 %. **Conclusions:** the use of methods based on the single-stage clotting method and laser flow cytofluorimetry to determine the safety of fresh frozen plasma is justified.

Ключевые слова: метрологическая характеристика, контроль показателей безопасности, свежзамороженная плазма, фактор VIII, остаточное содержание эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов.

Keywords: metrology characteristics, control the safety, fresh frozen plasma, factor VIII, the residual content of red blood cells, platelets and white blood cells.

Свежзамороженная плазма (СЗП) является важнейшим компонентом донорской крови, который применяется в клинической медицине для

коррекции системы гемостаза, что предполагает необходимость обеспечения ее биологической полноценности [2, с.32-34]. С этой целью в СЗП контролируют активность фактора VIII, которая должна быть более 70 МЕ/100 мл компонента, число клеток-контаминантов, несущих на себе ряд антигенов, не свойственных реципиентам. Количество эритроцитов в единице СЗП должно быть менее 6×10^9 /л, лейкоцитов – менее $0,1 \times 10^9$ /л, тромбоцитов – менее 50×10^9 /л [6, с.27].

Лаборатории, осуществляющие исследование качества СЗП, обязаны использовать метрологически охарактеризованные методики [1, с.32]. Согласно данным международной базы Westgard QC, биологическая вариабельность результатов определения фактора VIII в образцах крови составляет 4,8 %, количества эритроцитов – 3,2 %, тромбоцитов – 9,1 %, лейкоцитов – 11,4 % [10]. Следует отметить, что нормы аналитической точности рассматриваемых показателей в компонентах крови не определены, в результате чего отсутствует нормативная база для внутрилабораторного мониторинга качества исследований.

Метрологическое обеспечение методик контроля показателей безопасности СЗП приобрело особую актуальность после вступления в силу Постановления Правительства Российской Федерации от 22 июня 2019 года № 797 «Об утверждении правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов». В отечественных нормативно-правовых документах в сфере обращения донорской крови и ее компонентов отсутствуют требования к аналитической точности методик контроля безопасности СЗП. В связи с этим возникла необходимость в определении метрологических характеристик и обосновании выбора приемлемых методик их анализа в СЗП.

Цель – провести метрологическую оценку методик контроля показателей безопасности свежзамороженной плазмы.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 14 образцов СЗП. Каждый образец исследовали 10 раз. Остаточное содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов определяли методом лазерной

проточной цитофлуориметрии с помощью анализатора FACS Canto™ II (BD, США) с использованием набора реактивов BD Plasma Count (BD, США). Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы FACS Diva (BD, США). Полученное количество клеток в мкл пересчитывали на литр СЗП.

Специфическую активность фактора VIII выявляли одностадийным клоттинговым методом на автоматическом анализаторе гемостаза STA Compact MAX (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S, Франция) с применением стандартного набора реагентов в составе STA-Deficient VIII (плазма дефицитная по VIII фактору), STA-Cephascreen (реагент для определения активированного парциального тромбопластинового времени с полифенольным активатором, жидкий), STA-Desorb II (депротеинизирующий раствор), STA-CaCl₂ 0,025 M (раствор хлорида кальция 0,025 M), STA-Cleaner Solution (промывающий раствор), STA-Unicalibrator (системная универсальная калибровочная плазма), STA-System Control N+P (системная универсальная контрольная плазма, норма и патология).

Статистическую обработку данных проводили с использованием редактора Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc., США) и пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Проверку количественных признаков на соответствие нормальному (гауссовому) распределению значений осуществляли при помощи критерия согласия Шапиро-Уилка [7, с.79-83]. Для выборок с близким к нормальному распределением рассчитывали значения среднего арифметического, стандартного отклонения и коэффициентов вариации. Проверку статистических гипотез осуществляли при уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. Материально-техническое оснащение лабораторий ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России позволяет проводить исследования по определению остаточного содержания клеток в СЗП методами фазово-контрастной микроскопии, кондуктометрии с гидродинамическим

фокусированием и лазерной проточной цитофлуориметрии; фактора VIII – клоттинговым методом с помощью автоматического анализатора гемостаза.

Наиболее доступным способом установления общего числа клеток является их подсчет в камере Горяева, которая представляет собой специальное предметное стекло с нанесенными на него прорезями, образующими поперечно расположенные плоские площадки. Подсчет клеток проводят под микроскопом, который настраивают таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки, равномерно распределенные на ней. Воспроизводимость метода в значительной степени зависит от количества клеток в исследуемом образце: приемлемые коэффициенты вариации результатов подсчета лейкоцитов в камере Горяева (6,4 – 6,8 %) могут быть получены при содержании клеток в трансфузионной дозе более 40×10^6 или $0,16 \times 10^9$ клеток/л при среднем объеме дозы СЗП 250 мл [5, с.139]. Это ограничивает применение данной методики для оценки остаточного содержания клеток в количестве менее 6×10^9 /л в СЗП. Поскольку для определения концентрации остаточных лейкоцитов и эритроцитов в СЗП указанная методика не может быть рекомендована, а известные автоматические методы (с использованием гематологических анализаторов, проточная цитофлуориметрия) предполагают комплексное (одновременное) определение числа различных клеток крови, применять унифицированный метод подсчета в камере Горяева для определения остаточного содержания эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов при контроле качества СЗП представляется нецелесообразным.

На гематологических анализаторах фирмы Sysmex производится точный и автоматический подсчет клеток на основе кондуктометрического метода с гидродинамическим фокусированием «струя в струе» [4, с.27; 8, с.235-236]. При прохождении измерительного канала клетки крови генерируют электрические импульсы разной амплитуды, пропорциональной их размерам. Согласно технической документации на прибор ХТ-4000i фоновыми являются следующие концентрации лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в биологическом образце – $0,1 \times 10^9$ /л 20×10^9 /л, 5×10^9 /л клеток/л, соответственно.

Указанная чувствительность гематологического анализатора не позволяет достоверно определять остаточное содержание лейкоцитов в количестве менее $0,1 \times 10^9$ /л и эритроцитов в количестве менее 6×10^9 /л в СЗП.

В 2001 г. Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) и Международное сообщество лабораторной гематологии (ISLH) рекомендовали считать референсным методом количественного определения содержания клеток проточную цитофлуориметрию [3, с.70; 9, с.460]. Принцип метода основан на регистрации светорассеяния и флуоресценции от каждой отдельно взятой клетки, предварительно меченной различными флуорохромами или окрашенной ядерным красителем. Клеточная суспензия подается под давлением в проточную ячейку, а высокочувствительные детекторы, расположенные вокруг нее, регистрируют рассеяние света и флуоресценцию каждой клетки. Полученный сигнал передается в компьютер, обрабатывается и данные отображаются в виде графиков и гистограмм. Метод обладает высокой чувствительностью – рассчитанный предел обнаружения для анализатора FACS Canto™ II составляет 0,01 клетки в мкл или $2,5 \times 10^3$ клеток в дозе компонента крови, что существенно ниже максимально допустимых значений [6, с.27]. На сегодняшний день проточная цитофлуориметрия по показателям наиболее соответствует требованиям к аналитической чувствительности методик для определения остаточного содержания клеток в СЗП.

С целью метрологической оценки методик контроля наличия остаточных эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов проведено исследование 5 образцов нативной плазмы методом лазерной проточной цитофлуориметрии на анализаторе FACS Canto™ II. Анализ образцов проводили до замораживания в день заготовки плазмы. Результаты метрологической оценки представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения остаточного содержания клеток в образцах свежемороженой плазмы

№ исследования	Результат определения остаточного содержания клеток в образце				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Содержание лейкоцитов, $\times 10^9$ /л					
1	0,00017	0,0004	0,0002	0,0091	0,00067
2	0,00015	0,0005	0,0004	0,0095	0,00032
3	0,00014	0,0004	0,0002	0,0123	0,00039
4	0,00018	0,0002	0,0003	0,0168	0,00053
5	0,00008	0,0004	0,0005	0,0143	0,00036
6	0,00017	0,0003	0,0005	0,0123	0,00023
7	0,00015	0,0002	0,0004	0,0144	0,00042
8	0,00015	0,0005	0,0004	0,0113	0,00036
9	0,00016	0,0004	0,0005	0,0145	0,00047
10	0,00013	0,0004	0,0004	0,0165	0,00035
Значение p для критерия Шапиро-Уилка	0,06	0,05	0,06	0,55	0,51
Среднее арифметическое \bar{X}	0,00015	0,00037	0,00038	0,01310	0,00041
Стандартное отклонение s	0,00003	0,00011	0,00011	0,00266	0,00012
Коэффициент вариации $CV, \%$	19,1	28,6	29,9	20,3	29,9
Содержание эритроцитов, $\times 10^9$ /л					
1	0,115	0,149	0,149	0,025	0,026
2	0,128	0,152	0,152	0,026	0,024
3	0,125	0,150	0,152	0,028	0,021
4	0,130	0,164	0,145	0,027	0,021
5	0,106	0,156	0,153	0,022	0,024
6	0,086	0,144	0,157	0,023	0,026
7	0,089	0,171	0,147	0,022	0,022
8	0,085	0,158	0,145	0,021	0,024
9	0,079	0,168	0,152	0,022	0,026
10	0,095	0,165	0,151	0,025	0,022
Значение p для критерия Шапиро-Уилка	0,19	0,75	0,44	0,34	0,09
Среднее	0,104	0,158	0,150	0,024	0,024

арифметическое \bar{X}					
Стандартное отклонение s	0,020	0,009	0,004	0,002	0,002
Коэффициент вариации $CV, \%$	18,8	5,7	2,5	10,1	8,5
Содержание тромбоцитов, $\times 10^9 /л$					
1	0,120	0,117	0,054	0,043	0,019
2	0,116	0,124	0,075	0,039	0,025
3	0,104	0,133	0,079	0,033	0,022
4	0,118	0,104	0,058	0,033	0,023
5	0,109	0,097	0,057	0,030	0,017
6	0,101	0,111	0,056	0,030	0,016
7	0,105	0,113	0,062	0,028	0,014
8	0,097	0,105	0,069	0,025	0,014
9	0,104	0,115	0,082	0,031	0,015
10	0,122	0,121	0,081	0,040	0,020
Значение p для критерия Шапиро-Уилка	0,37	1,00	0,11	0,53	0,44
Среднее арифметическое \bar{X}	0,110	0,114	0,067	0,033	0,019
Стандартное отклонение s	0,009	0,011	0,011	0,006	0,004
Коэффициент вариации $CV, \%$	8,0	9,2	16,6	17,3	21,2

Согласно данным таблицы 1, характер распределения результатов определения клеток являлся нормальным: рассчитанные значения p для критерия Шапиро-Уилка были выше принятого уровня значимости 0,05. Значения среднего арифметического содержания лейкоцитов варьировали от $0,00015 \times 10^9$ до $0,0131 \times 10^9 /л$, эритроцитов – от 0,024 до $0,158 \times 10^9 /л$, тромбоцитов – от 0,019 до $0,114 \times 10^9 /л$. Полученные показатели остаточного содержания клеток были существенно ниже предельно допустимых значений, установленных Правилами, что указывало на высокий уровень безопасности заготавливаемого гемоконцентра. Максимальные значения коэффициентов вариации составили 29,9 % при определении концентрации лейкоцитов, 18,8 %

– при определении концентрации эритроцитов и 21,2 % – при определении концентрации тромбоцитов. Несмотря на достаточно высокие значения коэффициентов вариации, обусловленные крайне незначительным количеством идентифицируемых клеток в исследуемых образцах, в настоящее время проточная цитофлуориметрия является самым точным и чувствительным методом исследования количества клеток и может быть рекомендована для контроля данного показателя безопасности СЗП.

В ходе метрологической оценки методики определения активности фактора VIII в 9 образцах СЗП проведен анализ указанного показателя одностадийным клоттинговым методом (таблица 2).

Таблица 2.

**Результаты определения фактора VIII
в образцах свежемороженой плазмы**

№ исследования	Содержание фактора VIII, МЕ/100 мл в образце								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
1	116	98	109	123	116	93	115	82	75
2	98	95	106	106	147	89	112	93	79
3	97	83	104	102	139	96	100	91	85
4	97	86	107	112	129	79	109	98	77
5	96	78	119	117	131	87	113	94	74
6	97	80	115	111	124	91	98	90	75
7	103	94	106	120	143	87	102	92	76
8	107	88	106	120	122	88	103	92	75
9	100	82	97	108	144	83	104	106	75
10	94	87	104	110	135	88	98	98	71
Значение p для критерия Шапиро-Уилка	0,16	0,64	0,32	0,76	0,79	0,86	0,25	0,54	0,06
Среднее арифметическое \bar{X}	100	87	107	113	133	88	105	94	76
Стандартное отклонение s	4	7	6	7	10	5	6	6	4
Коэффициент вариации $CV, \%$	4,4	7,7	5,7	6,1	7,8	5,4	6,0	6,7	4,9

Согласно данным таблицы 2, характер распределения результатов близок к нормальному, так как рассчитанные значения p для критерия Шапиро-Уилка выше принятого уровня значимости 0,05. Содержание фактора VIII в образцах СЗП варьировало от 76 до 133 МЕ/100 мл. Все образцы соответствовали регламентированному значению показателя – более 70 МЕ/100 мл. Максимальное значение коэффициента вариации составило 7,8 %.

Таким образом, впервые определены метрологические характеристики сходимости методик контроля показателей безопасности СЗП. Показано, что остаточное содержание клеток в гемокомпоненте СЗП следует определять с использованием лазерной проточной цитофлуориметрии. Характеристики сходимости методики контроля остаточного содержания эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в СЗП составили 18,8 %, 21,2 % и 29,9 % соответственно. Установлено, что сходимость методики определения фактора VIII в СЗП одностадийным клоттинговым методом составляет 7,8 %. Полученное значение сопоставимо с биологической вариабельностью – 4,8 % [10]. Методика может быть рекомендована для контроля данного показателя. Однако для повышения воспроизводимости результатов определения активности фактора VIII в СЗП следует рассмотреть возможность применения хромогенного и двухстадийного клоттингового методов.

Список литературы

1. ГОСТ Р 8.563 ГСИ. Методики выполнения измерений. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200077909/> (дата обращения: 18.05.2020).
2. К вопросу о качестве свежзамороженной плазмы / А.Л. Берковский, Е.А. Ватагина, Е.В. Сергеева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2012. – № 4 (57). – С. 32-34.

3. Козырева В.С., Шилова А.Н., Шкода О.В. Использование метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови // Гематология и трансфузиология. – 2019. – № 1 (64). – С. 66-72.

4. Минникова А.И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 3. – С. 27-34.

5. Никулина Н.С., Калинина Е.Н. Метрологическая оценка методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – № 1 (39). – С. 136-141.

6. Постановление Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов». – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_328029/ (дата обращения: 18.05.2020).

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с. ISBN 5-89084-013-4.

8. Platelet counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100, and Advia 120: a comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method / L.M. Sandhaus, E.S. Osei, N.N. Agrawal [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. – 2002. – 118 (2). – P. 235-241.

9. Platelet counting by the RBC/Platelet Ratio Method. A Reference Method. International Council for Standardization in Hematology Expert Panel on Cytometry

and International Society of Laboratory Hematology // American Journal of Clinical Pathology. – 2001. – 115 (3). – P. 460-464.

10. Westgard QC. – URL: <https://www.westgard.com/> (дата обращения: 19.05.2020).

УДК 616.15

Тематический рубрикатор: 76.01.00

**ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА И
ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У ДОНОРОВ КРОВИ И ЕЕ
КОМПОНЕНТОВ**

Попцов Александр Леонидович

*канд. мед. наук, помощник директора по лабораторной деятельности
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
poptsov@niigpk.ru*

Сухорукова Эмилия Евгеньевна

*канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
suchorukova@niigpk.ru*

Данилова Ирина Николаевна

*младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
danilova@niigpk.ru*

Каравая Анастасия Вадимовна

*врач клинической лабораторной диагностики клинической лаборатории
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
karavaeva@niigpk.ru*

**FREQUENCY OF DETECTION OF MARKERS OF CYTOMEGALOVIRUS
AND EPSTEIN-BARR VIRUS IN BLOOD DONORS AND ITS
COMPONENTS**

Aleksandr Poptsov

*candidate of medical science, assistant Director for laboratory activities, the Federal
State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and
Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov*

Emilia Suhorukova

*candidate of medical science, researcher, laboratory of cellular and molecular
immunology, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute
of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov*

Irina Danilova

*junior researcher, laboratory of cellular and molecular immunology, the Federal
State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and
Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov*

Anastasia Karavaeva

*clinical laboratory diagnostics doctor, clinical laboratory, the Federal State-
Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood
Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov*

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка частоты выявления маркеров цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) у 471 донора крови и ее компонентов. Уровень

инфицированности ЦМВ составил 93,8%, ВЭБ – 98,9%. Маркеры активной цитомегаловирусной инфекции (CMV-IgM) выявлены у 1,5% доноров, маркеры активной ВЭБ-инфекции (EBV-IgM) – у 0,4% доноров, допущенных к кроводаче.

ABSTRACT

The frequency of detection of markers of cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) in 471 blood donors and its components was assessed. CMV infection rate was 93.8%, and EBV infection rate was 98.9%. Markers of active cytomegalovirus infection (CMV-IgM) were detected in 1.5% of donors, markers of active EBV infection (EBV-IgM)-in 0.4% of donors admitted to blood supply.

Ключевые слова: доноры крови и ее компонентов; цитомегаловирус; вирус Эпштейна-Барр.

Keywords: donors of blood and its components; CMV; EBV.

Одним из основополагающих принципов деятельности службы крови разных стран является обеспечение инфекционной безопасности донорской крови и её компонентов. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) сформулирована комплексная стратегия, основу которой составляет отбор и медицинское обследование доноров, включающее в себя лабораторный скрининг на маркеры гемотрансмиссивных инфекций [7, с.3].

В последние годы актуальным становится вопрос расширения массового скрининга доноров крови и её компонентов относительно герпесвирусов, в частности, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), в связи с их высокой распространенностью, достигающей среди населения 90% [3, с. 32-33; 14, с. 71; 20, с. 240], и опасностью для иммунокомпрометированных реципиентов органов, тканей и клеток, серонегативных в отношении данных возбудителей. Так, инфицирование ЦМВ вышеназванной группы лиц может приводить к развитию тяжелой пневмонии, гепатиту, гастроэнтериту и менингоэнцефалиту [2]. Известна роль ВЭБ в развитии злокачественных новообразований: лимфопролиферативных заболеваний, карциномы

носоглотки и рака желудка [4, с.30]. Установлено, что 5% онкогематологических больных являются серонегативными в отношении ЦМВ и 0,4% - в отношении ВЭБ [1, с. 27].

Применение технологии лейкоредукции с целью обеспечения вирусной безопасности крови и её компонентов не является эффективной альтернативой клинико-лабораторному отбору доноров. Проведенный мета-анализ ранее выполненных исследований показал, что ЦМВ-негативные гемокомпоненты более безопасны, чем фильтрованные [18, с. 196]. Маркеры ВЭБ обнаруживаются в 1 из 100 лейкоредуцированных компонентов крови [13, с.200].

На сегодняшний день в ряде стран (Германия, Австрия, Франция и др.) определение наличия серологических и молекулярно-генетических маркеров ЦМВ включено в алгоритм обследования доноров при заготовке компонентов крови для реципиентов группы риска (новорожденные, беременные, иммунокомпрометированные пациенты) [8, с.53; 10, с. 92-93]. В то же время в нашей стране оценка донорской крови на наличие маркеров ЦМВ и ВЭБ необязательна и целесообразность этого мероприятия является предметом научных дискуссий. Немногочисленные работы, посвященные данной теме, базируются на результатах обследования доноров Москвы и Санкт-Петербурга [1, 4, 6].

В связи с этим актуальным становится вопрос о совершенствовании обеспечения инфекционной безопасности донорской крови и ее компонентов в отношении ЦМВ и ВЭБ. Цель настоящего исследования: определить частоту выявления серологических и молекулярно-генетических маркеров ЦМВ и ВЭБ у доноров крови и её компонентов.

Материалы и методы

В исследование включены образцы сыворотки крови, полученные в период с января по сентябрь 2019 г. от 471 донора крови и её компонентов. Скрининг доноров проводили на основании определения серологических и молекулярно-генетических маркеров ЦМВ и ВЭБ.

Определение иммуноглобулинов классов G и M к ЦМВ (CMV-IgG, CMV-IgM) выполняли методом иммунохемилюминисцентного анализа с использованием наборов реагентов Architect CMV IgG Reagent и Architect CMV IgM Reagent (Abbott Laboratories, Германия). Выявление серологических маркеров ВЭБ (EBV-IgG и EBV-IgM) осуществляли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов реагентов Векто-ВЭБ-VCA-IgG и Векто-ВЭБ-VCA-IgM (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). ДНК ЦМВ и ВЭБ определяли в образцах сыворотки крови доноров методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием наборов реагентов РеалБест ДНК ЦМВ и РеалБест ДНК ВЭБ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STADIA.

Результаты и обсуждение

Исследования маркеров ЦМВ и ВЭБ выполнены у 471 донора крови и её компонентов. Гендерный и возрастной состав доноров представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика обследованных доноров

Пол Донора	Количество доноров, абс.	Возраст (годы)	
		от 18 до 30	от 30 и старше
Мужской	285	73	212
Женский	186	30	156

Среди обследованных преобладали лица от 30 лет и старше. На эту возрастную группу пришлось 78,1% (368/471) доноров. Процентное соотношение доноров-мужчин и доноров-женщин составило 60,5% и 39,5% соответственно. В целом, поло-возрастной состав обследованных отражает современные демографические аспекты портрета российского донора [5, с. 327].

Частота выявления CMV-IgG у доноров крови и её компонентов определена на уровне 93,8% (табл.2).

Таблица 2.

Частота выявления антител к цитомегаловирусу у доноров крови и ее компонентов

Пол донора	Наличие CMV-IgG		Возраст (годы) от 18 до 30		Возраст (годы) от 30 и старше	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужской	273	95,8	68	93,2	205	96,7
Женский	169	90,9	23	76,7	146	93,6
Всего	443	93,8	91	88,3	352	95,4

Установленное значение частоты встречаемости антител к ЦМВ во всех возрастных группах оказалось выше по сравнению с результатами ранее проведенных исследований, в которых показатель варьировал от 68,9% до 89,0% в зависимости от изучаемой группы доноров [1, 4, 6]. Возможно, это обусловлено преобладанием в исследуемой группе лиц в возрасте от 30 лет и старше. У доноров-мужчин CMV-IgG выявлялись в 95,8%, а у доноров-женщин – в 90,9% случаев ($\chi^2=4,73$, $p=0,03$). Показано, что инфицированность доноров ЦМВ с возрастом увеличивалась: с 88,3% (91/103) в группе от 18 до 30 лет до 95,7% (352/368) – от 30 лет и старше ($\chi^2=10,40$, $p=0,002$). У женщин-доноров частота выявления CMV-IgG с возрастом статистически достоверно возрастала: с 76,7% (23/30) в группе от 18 до 30 лет до 93,6% (146/156) – от 30 лет и старше ($\chi^2=8,68$, $p=0,004$). Рост уровня инфицированности ЦМВ у доноров-мужчин в зависимости от возраста статистически незначим ($\chi^2=1,64$, $p=0,194$). Полученные результаты соответствуют данным других исследователей. Установлено, что с возрастом частота выявления CMV-IgG увеличивается: с 30% в возрастной группе от 18 до 30 лет до 80% у доноров старше 65 лет [12]. Аналогичные данные по частоте выявления CMV-IgG среди доноров старших возрастных групп были позднее получены Lancini D. et al. [10, с. 1620].

По итогам анализа, у 6,2% (29/471) доноров CMV-IgG не обнаружены. Отмечен наибольший процент серонегативных доноров в возрасте от 18 до 30 лет - 11,7% (12/103), что свидетельствует о перспективности целенаправленного обследования лиц данной возрастной группы для отбора ЦМВ-негативных доноров.

Маркеры активной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в виде наличия CMV-IgM обнаружены у 1,5% (7/471) доноров, допущенных к кроводаче. При этом во всех случаях они выявлялись у серопозитивных (CMV-IgG) доноров в возрасте от 30 лет и старше. Отсутствие CMV-IgM в группе серонегативных (CMV-IgG) доноров свидетельствует о большей безопасности трансфузий крови и её компонентов, полученных от этой группы для иммунокомпрометированных реципиентов, имеющих серонегативный статус.

ДНК ЦМВ, которая является суррогатным маркером активной ЦМВИ [14], в обследованной группе доноров не выявлена, что объясняется, в первую очередь, малым объемом выборки. По данным других исследователей, ДНК ЦМВ обнаруживается в 0,3% случаев у серопозитивных и в 0,02% случаев у серонегативных доноров [11, 16, 18]. Кроме того, следует учитывать, что при вирусносительстве возбудитель присутствует только в лейкоцитах и в очень малом количестве (1 вирусная частица на несколько тысяч лейкоцитов), а следовательно, может не определяться. Признаки активации герпесвирусов выявляются одновременно двумя методами (ИФА и ПЦР) только у 1-7% больных [8, с. 119].

Результаты исследования доноров крови и её компонентов на наличие EBV-IgG представлены в табл. 3.

Таблица 3.

Частота выявления антител к вирусу Эпштейна-Барр у доноров

Пол донора	Наличие EBV -IgG		Возраст (годы) от 18 до 30		Возраст (годы) от 30 и старше	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужской	285	100	73	100	212	100

Женский	181	97,3	30	100	151	96,8
Всего	466	98,9	103	100	363	98,6

Частота выявления EBV-IgG составила 98,9% (466/471). Полученный показатель несколько превысил ранее установленный диапазон значений (от 74,5 до 97,9%) в общей группе доноров [1, 4, 6, 15]. Изменение частоты выявления EBV-IgG в зависимости от возраста и пола статистически незначимо ($p > 0,05$). Показано, что в 1,1% случаев доноры являлись серонегативными в отношении ВЭБ.

Серологические маркеры активной ВЭБ-инфекции (EBV-IgM) определили у 0,4% (2/471) доноров, допущенных к кроводаче. Во всех случаях они также были серопозитивны по EBV-IgG, что указывает на теоретическую возможность инфицирования этим вирусом реципиентов при гемотрансфузиях. ДНК ВЭБ в образцах сыворотки крови не найдена.

Заключение

Полученные нами результаты демонстрируют высокий уровень инфицированности ЦМВ и ВЭБ доноров крови и её компонентов. С целью обеспечения инфекционной безопасности донорской крови и её компонентов в отношении выше указанных возбудителей может быть рекомендован отбор ЦМВ- и ВЭБ-негативных доноров. Особое значение такой подход приобретает при необходимости проведения гемотрансфузий иммунокомпрометированным пациентам, детям и беременным. В качестве наиболее перспективного способа формирования когорты ЦМВ-негативных доноров может рассматриваться целенаправленное обследование лиц в возрасте от 18 до 30 лет.

Список литературы

1. Алгоритм обеспечения ЦМВ-негативными гемокомпонентами больных группы риска / С.Д. Волкова, В.Н. Чеботкевич, Г.Ю. Кирьянова [и др.] // Трансфузиология. - 2015. – Т.16. - №1. – С.24-34.

2. Герпесвирус – ассоциированные пневмонии у онкогематологических больных. Роль молекулярных методов диагностики [Электронный ресурс] / Т.А. Гаранжа, Д.С. Тихомиров, Т.А. Туполева [и др.] // Сведения доступны на CD - диске «Молекулярная диагностика, 2014».
3. Герпесвирусные инфекции и проблемы инфекционной безопасности гемотрансфузий у иммуносупрессивных больных / В.Н. Чеботкевич, С.Д. Волкова, С.С. Бессмельцев [и др.] // Трансфузиология. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 22-41.
4. Донор и реципиент в 21 веке: необходимость расширения спектра исследуемых вирусных маркеров / Т.А. Гаранжа, Д.С. Тихомирова, Т.А. Туполева [и др.] // Сб. трудов VII Всеросс. конф. – М. – 2010. – Т1. – С. 327-328.
5. Доноры крови: социально-демографические и психологические характеристики (по данным исследования доноров ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России) / Т.В. Гапонова, С.О. Хрущев, Д.Э. Выборных и др. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т.63, № 4. – С. 325-333.
6. Касьянов А.Д., Рыжкова Т.В. Частота выявления герпесвирусной инфекции у кадровых доноров гемокомпонентов // Трансфузиология. – 2007. - №1-2. – С. 22-23.
7. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови / Совет Европы, 17 издание. - 2015. – 150 с.
8. Скрининг донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции. Рекомендации. Женева: ВОЗ. – 2010. – 52 с.
9. Тихомиров Д.С. Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций у гематологических больных // дисс. канд. биол. наук. – Москва, 2009. – 142 с.

10. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors / M. Hecker, D. Qiu, K. Marquardt [et al.] // Vox Sang. – 2004. – Vol. 86. – P. 41-44.
11. Cytomegalovirus in Australian blood donors: seroepidemiology and seronegative red blood cell component inventories / D.V. Lancini, H.M. Faddy, S. Ismay [et al.] // Transfusion. – 2016. – Vol. 56, No.6. - Pt. 2. – P.1616 – 1621.
12. Cytomegalovirus seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors / Y. Furui, M. Satake, Y. Hoshi, [et al.] // Transfusion. – 2013. – Vol. 53. – P. 2190-2197.
13. Detection of Epstein-Barr virus in leucoreduced blood products / H. Trottier, G. Delage, J. Hu, et al. // Vox Sang. – 2015. - Vol.110. – P. 199-201.
14. Houldcroft C.J., Kellam P. Host genetics of Epstein – Barr virus infection, latency and disease // Rev. Med. Virol. – 2015. – Vol. 25. – P. 71-84.
15. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation / C.N. Kotton, D. Kumar, A.M. Caliendo [et al.] // Transplantation. – 2010. – Vol. 89. – P.779-795.
16. Prevalence and molecular profiling of Epstein-Barr virus among healthy blood donors from different nationalities in Qatar [Электронный ресурс] / M.K. Smatti, H.M. Yassine, R. AbuOdeh [et. al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, No. 12. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189033> (дата обращения 13.08.2019).
17. The impact of donor cytomegalovirus DNA on transfusion strategies for at-risk patients / M. Ziemann, D. Juhl, S. Görg, H. Henig // Transfusion. – 2013. - Vol. 53. – P.2183-2189

18. Vamvakas E.C. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis // *Transfusion. Med. Rev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 181-199.

19. Vollmer T., Knabbe C., Dreier J. Systematic evaluation of different nucleic acid amplification assays for cytomegalovirus detection: feasibility of blood donor screening // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2015. – Vol. 53. – P. 3219-3225.

20. Ziemann M., Thiele T. Transfusion-transmitted CMV infection – current knowledge and future perspective // *Transfusion Medicine.* – 2017. - Vol. 27. – P. 238–248.

УДК 615. 387

Тематический рубрикатор: 76.03.02

**ОПЫТ РАБОТЫ КРИБАНКА ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «КИРОВСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО - БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Утемов Сергей Вячеславович

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

utemov@niigpk.ru

Ветошкин Константин Александрович

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

vetoshkin@niigpk.ru

Князев Максим Геннадьевич

врач-трансфузиолог отделения трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

knyazev@niigpk.ru

Бутина Елена Владимировна

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

butina@niigpk.ru

Безрукова Людмила Афанасьевна

врач-трансфузиолог отделения трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

bezrukova@niigpk.ru

EXPERIENCE OF CRYOBANK'S ACTIVITY THE FEDERAL STATE-FINANCED SCIENTIFIC INSTITUTION KIROV RESEARCH INSTITUTE OF HEMATOLOGY AND BLOOD TRANSFUSION UNDER THE FEDERAL MEDICAL BIOLOGICAL AGENCY

Sergei Utemov

Ph.D., leading researcher of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Konstantin Vetoshkin

Ph.D., Head of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Maxim Knyazev

Transfusion medicine specialist department of Transfusiology and Processing of hematopoietic stem cells, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Elena Butina

Ph.D., Head of the Laboratory of Immunohematology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Lyudmila Bezrukova

Transfusion medicine specialist department of Transfusiology and Processing of hematopoietic stem cells, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

В статье представлены данные об организации, пополнении и обновлении банка криоконсервированных эритроцитов с учетом иммуногематологических параметров. Для создания оптимального ресурса, обеспечивающего потребности всех реципиентов независимо от их фенотипа и уровня аллоиммунизации, структура запаса эритроцитов, хранящихся в криобанке, должна соответствовать частоте встречаемости трансфузионно значимых антигенов эритроцитов в популяции и содержать все их сочетания, учитываемые при переливании.

ABSTRACT

The article presents data on the creation, replenishment and updating of the bank of cryopreserved red blood cells due to immunohematological parameters. To create

an optimal resource that meets the needs of all recipients, regardless of their phenotype and level of alloimmunization, the structure of the red blood cell stored in the bank must correspond to the frequency of transfusion-significant red blood cell antigens in the population and contain all combinations of antigens taken into account during transfusion. The aim of the work is to evaluate and analyze the procurement and use of cryopreserved red blood cells of the bank for the period from 2013 to 2020.

Ключевые слова: донорские эритроциты; криоконсервирование; антигены; антитела; доноры; реципиенты.

Keywords: donor red blood cells; cryopreservation; antigens, antibodies, donors, recipients

Обеспечение донорской кровью и её компонентами онкогематологического стационара представляет ряд трудностей ввиду сложности прогнозирования потребности больных в гемокомпонентах, особенно ограниченного срока хранения. С одной стороны, создание больших запасов чревато увеличением объемов утилизации не востребовавшей крови, с другой стороны, для больных гемобластомами характерно внезапное, непредсказуемое увеличение потребности в трансфузиях [3, с. 72–78; 2, с. 35–47; 7, с. 153–154]. Наличие банка замороженных эритроцитов способствует более гибкому управлению запасами компонентов донорской крови. Кроме того, длительный срок хранения предопределяет возможность карантинизации замороженных доз [1, с. 60–65].

Цель работы – проанализировать заготовку и использование криоконсервированных эритроцитов криобанка за период с 2013 по 2020 гг.

Материалы и методы

В криобанке ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России за период с 2013 по 2020 гг. всего получено и заложено на долгосрочное хранение 1364 дозы эритроцитов. За указанный промежуток времени для гемокомпонентной терапии пациентов было декриоконсервировано, отмыто и перелито 703 дозы

эритроцитной массы. Эритроциты получали путем фракционирования донорской крови способом дискретного центрифугирования. Подготовку гемокомпонентов к криоконсервированию (глицеролизацию эритроцитов доноров) осуществляли при помощи автоматической системы обработки клеток АСР 215 (Haemonetics, США). С учетом рекомендаций [3, с. 72–78; 6, с. 108–109] глицеролизовали порции эритроцитного продукта сроком хранения менее 7 сут. с момента заготовки крови и уровнем гематокрита < 80%. Подготовленные к криоконсервированию криопакеты упаковывали в металлические кассеты и маркировали с учетом групповой АВО и резус-принадлежности с параметрами фенотипа. Донорские эритроциты консервировали по стандартной методике. Замороженные эритроциты доноров хранили под защитой криопротектора «Глицерол» (57,1%) при температуре минус 80°C в электроморозильниках либо в жидком азоте при минус 196°C. Размораживание криопакетов со средой производили в водяной бане при температуре 37°C, после чего немедленно приступали к выполнению процедуры деглицеролизации. Автоматическое удаление внеклеточных компонентов и раствора глицерола из декриоконсервированного эритроцитного продукта выполняли при помощи устройства АСР 215. В качестве взвешивающего раствора использовали физиологический раствор хлорида натрия либо раствор «SAGM» (TERUMO CORPORATION, Япония).

Отличительной чертой процессов криоконсервирования и деглицеролизации является то, что из взвеси эритроцитов удаляются другие клеточные элементы крови, вазоактивные вещества, калий и антикоагулянты, входящие в состав гемоконсерванта [7, с. 153–154; 9, с. 2242–2249; 12, с. 103–112]. Помимо этого, в отмытой эритроцитной взвеси остаются наиболее устойчивые эритроциты, так как «старые» и нестойкие клетки полностью удаляются в процессе отмывания.

Типирование антигенов эритроцитов проводили с использованием оборудования и реактивов фирм BioRad (США). Критериями преимущественного отбора эритроцитсодержащих компонентов крови для

долгосрочного хранения являлись фенотипы С+с-D-K-, D-E+e-K-, С+с-D+E-e+C^w-K-; С+с+D+E-e+C^w-K-; С-с+D+E+e-C^w-K-; С-с+D-E-e+C^w-K-; M-N+; S+s-; S-s+; Fy(a+b-); Fy(a-b+); Jk(a+b-); Jk(a-b+) [5].

Результаты и их обсуждение

Комплект оборудования криобанка позволяет хранить более 1000 доз компонентов крови при низких и ультранизких (от минус 80°C до минус 196°C) температурах. На сегодняшний день в криобанке института находится на длительном хранении 631 доза эритроцитной массы различной групповой принадлежности, в том числе в электроморозильниках при температуре минус 80°C - 449 доз и – при минус 196°C - 182 дозы. Распределение гемокомпонентов по групповой принадлежности следующее: 207 доз (32,8%) эритроцитной взвеси O(I) группы крови, 203 дозы (32,2%) – A(II), 127 (20,2%) – B (III) и 94 (14,9%) – AB (IV); группы крови системы АВО. Фенотипы MNS, Duffy, Kidd, P1PK, Lewis, Lutheran известны у 77 доноров эритроцитов. Фенотипическая характеристика запаса криоконсервированных эритроцитов с редкими сочетаниями антигенов следующая: С+с-D-E-e+ (8 доз), С+с-D+E-e+C^w-K- (107), С-с+D+E+e-C^w-K- (22), С-с+D-E-e+C^w-K- (191), K+k- (6), M-N+ (8), S+s- (12), S-s+ (27), Fy(a+b-) (12), Fy(a-b+) (22), Jk(a+b-) (11), Jk(a-b+) (15). Процентное соотношение АВО - принадлежности криоконсервированных эритроцитов сопоставимо с общепопуляционным, что позволяет обеспечить потребности в эритроцитной массе всех нуждающихся пациентов с учетом их групповой принадлежности. Типирование эритроцитов по групповой и резус-принадлежности соответствует требованиям приказа Министерства здравоохранения РФ от 2 апреля 2013 г. N 183н «Правила клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов». Таким образом, сформированный запас криоконсервированных эритроцитов является оптимальным ресурсом, обеспечивающим потребности всех реципиентов, независимо от их фенотипа и уровня аллоиммунизации. За исследуемый период количество забракованной эритроцитной массы составило 99 доз (7,25% от общего количества заложенных на хранение эритроцитов). Чаще всего

причинами выбраковки и утилизации заготовленных компонентов был технический брак: разгерметизация криопакета или системы для деглицеролизации – 44 дозы, или 3,22 %. Следующая причина выбраковки заключалась в выявлении у донора, вне зависимости от давности донации, маркеров гемотрансмиссивных инфекций. Находящиеся на хранении дозы эритроцитов подвергались карантинизации [6, с. 108-109; 8, с. 103-112]. Компонент изымали из криобанка при выявлении в крови донора HBsAg; антител к HBc-антигену вируса гепатита В, ВИЧ и антител к вирусу гепатита С. Выбраковку осуществляли после получения положительных результатов подтверждающих тестов. Уничтожено 43 дозы эритроцитной массы, что составило 3,15%. Также из обращения изъято 12 доз эритроцитов (0,87%) в связи с выявлением у донора превышения допустимого уровня АЛТ. Эффективность переливания размороженных эритроцитсодержащих компонентов определена в многочисленных исследованиях [3, с. 72-78; 2, с. 35-47; 12, с. 1-55]. Неблагоприятных реакций и осложнений при трансфузиях криоконсервированных эритроцитов не зафиксировано. Адекватный прирост уровня гемоглобина наблюдали после 89,0% трансфузий криоконсервированных отмытых эритроцитов, который практически не отличался от аналогичного показателя после переливания нативных гемокомпонентов. Так, концентрация гемоглобина после переливания размороженных эритроцитов составила $81,9 \pm 1,5$, а после эритроцитной взвеси - $83,4 \pm 2,1$ г/л. Статистических различий не обнаружено ($p < 0,05$, критерий Стьюдента).

Выводы

1. Создан резерв криоконсервированных эритроцитов, антигенная структура которых сопоставима с общепопуляционной. Запас замороженных гемокомпонентов позволяет удовлетворять потребности клиники института в трансфузионных средах как в плановом порядке, так и в экстренных ситуациях.

2. В учреждении отлажена система снабжения клиники эритроцитами, позволяющая обеспечить лечебный процесс без накопления избыточных запасов и утилизации трансфузионных сред по истечении срока их хранения.

Список литературы

1. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы)/ Минеева Н.В. Пашкова И.А., Кробинец И.И., Сысоева Е.А. // Онкогематология. – 2015. – Т. 10. – №4. – С. 60-65.
2. Ковтунова М.Е., Шерстнев Ф.С., Утемов С.В. Организация трансфузиологической помощи в чрезвычайных ситуациях // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (4 – 5 октября 2017 г., г. Киров). С. 35-47.
3. Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40° и -80°C / Кирьянова Г.Ю., Волкова С.Д., Касьянов А.Д. [и др.] // Вестник международной академии холода. – 2017. – №1. – С. 72-78.
4. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники / Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Коряковцева Т.А. [и др.] // Трансфузиология. – 2018. – № 1. – С. 56-64.
5. Способ комплектования резерва криоконсервированных эритроцитов на основании иммуногематологических критериев. Патент на изобретение № 2708631. Авторы: Бутина Е.В., Шерстнев Ф.С., Утемов С.В., Князев М.Г. Зайцева Г.А.

6. Хубутя М.Ш., Кобзева Е.Н., Высочин И.В. Карантинизация криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов – основа безопасности гемотрансфузий [Текст] // Трансфузиология. – 2014. – Т. 15, № 2. – С. 108 – 109.
7. Шевченко Ю.Л., Жибурт Е. Б. Безопасное переливание крови. СПб. – 2000. – С.153 – 154.
8. Henkelman S., Noorman F., Badloe J.F. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine // Vox Sanguinis. – 2015. – V. 108 (2). – P. 103–112.
9. Lagerberg J. W., Truijens-de Lange R., de Korte D. Altered processing of thawed red cells to improve the in vitro quality during postthaw storage at 4 degrees C. // Transfusion- 2007. – V. 47 (12). – P. 2242–2249.
10. Organizational aspects of red blood cells cryopreservation in the activities of blood service in Russian Federation / Chechetkin A. V., Danilchenko V. V., Volkova S. D. [et al.] // Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda. – 2015. – N 3. – P. 45–49.
11. Shaz B. H., Hillyer C.D., Reyes G.M. Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects, 3rd ed. – Philadelphia, PA: Elsevier, 2018. – 1048 pp.
12. Von Zabern I., Wagner F.F., Flegel W.A. Ten years Rhesus Immunization Registry // Vox Sanguinis. – 2010. – V. 99. – P. 1-55.

ВОПРОСЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

УДК 576.53

Тематический рубрикатор 76.03.02

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КОНЦЕНТРАТОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДОНОРОВ

Бутолина Мария Александровна

лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

butolina.maria@yandex.ru

Ветошкин Константин Александрович

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

vetoshkin@niigpk.ru

Стрига Елена Геннадьевна

врач-бактериолог, заведующий бактериологической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

baklab@niigpk.ru

Назарова Елена Львовна

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

nazarova.yelena@mail.ru

Калинина Елена Николаевна

начальник отдела обеспечения качества Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kalininaen@niigpk.ru

Трегубова Екатерина Владимировна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

tregubova.e@bk.ru

Габдулхакова Альфия Хасановна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

gabdulhakova@niigpk.ru

Дубровина Анастасия Андреевна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

shubeonkina@yandex.ru

QUALITY CONTROL OF CONCENTRATES OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF BONE MARROW OF DONORS

Maria Butolina

laboratory technician of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Konstantin Vetoshkin

Ph. D, Head of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Striga

bacteriologist, Head of the Bacteriological Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Nazarova

Ph. D, Head of the Cellular and Molecular Immunology Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Kalinina

Head of Quality Assurance, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Ekaterina Tregubova

junior Researcher of the Cellular and Molecular Immunology Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Alfiya Gabdulhakova

junior Researcher of the Cellular and Molecular Immunology Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Anastasiya Dubrovina

junior Researcher of the Cellular and Molecular Immunology Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

АННОТАЦИЯ

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) находят все большее применение для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, в том числе в сфере онкогематологии. Неотъемлемой частью процесса получения БМКП является контроль качества. В данной статье приведены результаты оценки концентратов мезенхимальных стромальных клеток по следующим показателям: стерильность, контаминация микоплазмами, пирогенность и аномальная токсичность. Показано, что используемая технология культивирования позволяет получать клеточный продукт, соответствующий действующим нормативным требованиям.

ABSTRACT

Biomedical cell products are increasingly used for the prevention and treatment of a wide range of diseases, including hematology malignancies. An integral part of the biomedical cell products obtaining process is quality control. This article presents the results of the mesenchymal stromal cell concentrates assessment by the following indicators: sterility, *Mycoplasma* contamination, pyrogenicity and abnormal toxicity. It is shown that the cultivation technology allows to obtain a cellular product that meets the regulatory framework for quality control.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; контроль качества; стерильность; пирогенность; токсичность.

Keywords: mesenchymal stromal cells; quality control; sterility; pyrogenicity; toxicity.

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) – новая группа препаратов, представляющих собой клеточные линии различного происхождения. БМКП используются для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, в том числе гемобластозов [10, с. 27]. Одной из таких клеточных линий являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК). В настоящее время перспективными источниками МСК для их применения в терапевтических целях считаются костный мозг и жировая ткань [7, с. 33]. Содержание

мезенхимальных предшественников в костном мозге составляет до 0,01% от всех миелокариоцитов [6, с. 20]. Для клеточной терапии требуется количество МСК, составляющее не менее 1×10^6 /кг веса реципиента [5, с. 68], поэтому получение нужного их количества возможно только путем культивирования в условиях *in vitro*.

Стандарты качества клеточных препаратов определяются стремлением обеспечить терапевтический эффект и безопасность пациента [9, с. 235]. Получение стерильных, не загрязненных микроорганизмами-контаминантами препаратов является одной из основных задач производства БМКП. Контроль качества клеточных препаратов регулируется приказами Министерства здравоохранения Российской Федерации (РФ) от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт» и от 08.08.2018 N 512 н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». Основными требованиями, предъявляемыми к БМКП для парентерального применения, а также к реактивам, используемым для их получения, являются стерильность, отсутствие инфекционных агентов (*Mycoplasma spp.*), содержание бактериальных эндотоксинов, не превышающее максимально допустимых значений, или апирогенность, и безвредность (отсутствие аномальной токсичности).

Под понятием «стерильный продукт» подразумевают препарат, свободный от жизнеспособных микроорганизмов. Иммуитет больных-реципиентов МСК в большинстве случаев значительно ослаблен. Использование контаминированного микроорганизмами препарата может привести к инфицированию пациента и, как следствие, к тяжелым последствиям для здоровья или даже к летальному исходу. Следующим аспектом опасности микробного загрязнения клеточного продукта является воздействие микроорганизмов на ингредиенты БМКП, что может стать причиной потери терапевтического эффекта, изменения внешнего вида, а в некоторых случаях - образования токсичных веществ [11, с. 62]. В РФ испытания лекарственных

средств на стерильность проводятся в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) 1.2.4.0003.15 Государственной фармакопеи РФ XIV издания [3, с. 1201-1222]. Согласно ОФС контроль микробиологической чистоты препаратов проводят в зависимости от их физико-химических свойств двумя методами: прямого посева и мембранной фильтрации [3, с. 1201-1222]. Преимуществом метода прямого посева является то, что он подходит для проб, не обладающих антимикробным действием. Данный способ является технически простым и экономичным, что позволяет использовать его для оценки стерильности образцов МСК.

Важной проблемой является заражение клеточного продукта микоплазмами. Источниками микроорганизмов рода *Mycoplasma* при культивировании клеток в искусственных условиях могут стать компоненты культуральной среды животного происхождения, например эмбриональная телячья сыворотка и трипсин. Микоплазменная контаминация клеточных культур является потенциальным фактором риска инфицирования реципиента, она существенно изменяет биохимию клеток и скорость их роста. Проверка клеточного продукта на наличие микоплазм минимизирует указанные риски и гарантирует его высокое качество.

Следующим требованием контроля качества БМКП является оценка содержания в них бактериальных эндотоксинов или испытание на пирогенность. Эндотоксины грамотрицательных бактерий являются сильными и широко распространенными пирогенами, способными вызывать лихорадку, изменять метаболизм липидов и углеводов, активировать компоненты системы комплемента, вызывать агрегацию тромбоцитов, внутрисосудистое свертывание крови, шок и, как следствие, летальный исход у реципиента [2, с. 25]. На данный момент существует четыре основных способа определения наличия бактериальных эндотоксинов:

1) биологический – выявление всех пирогенов, включая эндотоксины (испытание на пирогенность на кроликах) [14, с. 269];

2) ЛАЛ тест (Limulus Amebocyte Lysate Test) – лабораторный тест, позволяющий определять количество бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах [12, с. 138-148];

3) ЕАА (Endotoxin activity assay) – позволяет проводить анализ активности эндотоксина в крови пациента [13, с. 18-20];

4) МАЧ-Endotox (метод активированных частиц) – позволяет полуколичественно определять как эндотоксины отдельных видов бактерий, так и их суммарное содержание [1, с. 79-83].

Определение бактериальных эндотоксинов и испытание на пирогенность регламентируется Государственной Фармакопеей, в частности, ОФС.1.2.4.0005.15 [3, с. 1227-1232] и ОФС.1.2.4.0006.15 [3, с. 1233-1250]. Биологический метод является достаточно информативным и простым в исполнении, что стало причиной его использования в данной работе.

Испытание на аномальную токсичность также является обязательным при контроле качества БМКП. Данный показатель определяет наличие/отсутствие нерегламентированных примесей в составе клеточного препарата. Присутствие токсичных компонентов приводит к развитию интоксикации и гибели лабораторных животных в ответ на введение клеточного продукта [8, с. 6]. В БМКП на основе МСК в качестве токсина можно рассматривать следовые количества трипсина, применяющегося на этапах культивирования. Проведение испытаний на аномальную токсичность осуществляется с использованием белых нелинейных мышей в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15 [3, с. 1223-1226].

Таким образом, контроль качества является неотъемлемой частью процесса получения БМКП, а регулярный мониторинг полученных результатов позволяет получать безопасный продукт высокого качества.

Цель – оценить результаты контроля качества концентратов МСК костного мозга доноров.

Материалы и методы. В качестве источника МСК использовали костный мозг доноров (n=17), полученный при стандартной операции миелоэкспузии. Возраст доноров составил от 14 до 38 лет (медиана – 31 год). Выделение

миелокариоцитов осуществляли путем фракционирования центрифугированием на градиенте плотности ($\rho=1,077$, 1800 об/мин, 10-15 мин., температура от 21 до 23°C). МСК культивировали в среде α MEM (StemCells, Канада), содержащей богатую тромбоцитами плазму (4%), гепарин (Sigma, США, 2 Ед/мл), L-глутамин 2 мМ (StemCells, Канада) в CO₂-инкубаторе при содержании 5% углекислого газа и температуре 37°C. Полную замену среды производили через каждые 4-5 сут. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина, определяли их жизнеспособность в камере Горяева, выполняли пересев и дальнейшее культивирование. Все работы с исходным материалом, реактивами и клеточными культурами осуществляли в условиях стерильного бокса (чистые помещения) в ламинарном шкафу (класс безопасности ПА).

Испытание на стерильность осуществлено в 120 образцах (отработанная питательная среда, n=60, концентрат клеток, n=60). Наличие микроорганизмов-контаминантов определяли путем прямого посева. Для этого вносили по 1 мл исследуемого материала в тиогликолевую среду и среду Сабуро, инкубировали при температурах 30-35°C и 20-22°C соответственно в течение 14 сут. Визуальный контроль посевов проводили ежедневно. Образцы считали стерильными, если по окончании срока культивирования не наблюдали помутнения питательных сред. В случае изменения прозрачности микробиологических субстратов готовили из них мазок для микроскопии с окрашиванием по Граму. При обнаружении в мазке микроорганизмов образцы считали нестерильными.

В 31 образце концентратов МСК провели контроль микоплазменной контаминации. ДНК из клеточной взвеси выделяли стандартным методом с фенол-хлороформной экстракцией. Выявление геномной ДНК шести наиболее распространенных видов рода *Mycoplasma* (*M. orale*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae* и *Acholeplasma laidlawii*), а также ряда других родственных видов (*M. salivarium*, *M. bovis*, *M. lipophilum*, *M. canadense*) проводили методом ПЦР по конечной точке с использованием набора реагентов

MicoReport (Евроген, Россия). Результаты оценивали по наличию/отсутствию продукта амплификации в полиакриламидном геле.

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции 1986 г. о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Испытание на аномальную токсичность выполнено в 15 образцах МСК на лабораторных нелинейных мышей обоего пола в возрасте 6 мес., массой 19-21 г. Взвесь МСК вводили в хвостовую вену в объеме 0,5 мл на 1 животное со скоростью 0,1 мл/сек. Для изучения каждой партии полученного препарата использовали по 5 мышей [3, с. 1223]. Наблюдение производили в течение 7 суток. В ходе эксперимента животных содержали в стандартных условиях с обычным рационом. Образцы считали нетоксичными в случае 100% выживаемости испытуемых животных, отсутствии общей и местной реакций в ходе наблюдения. В случае смерти 1 животного в эксперименте опыт повторяли на 5 мышах, если погибали 2 и более особей из 10, образец считали токсичным.

Изучение содержания бактериальных эндотоксинов провели в 13 образцах МСК биологическим методом (оценка пирогенности на кроликах). В опытах использовали кроликов породы советская шиншилла одного пола (самцов) не альбиносов массой 3000-3500 г. Для каждого испытания отбирали трех животных, которые по результатам мониторинга (ежедневное взвешивание и ректальное измерение температуры) не теряли в массе в течение предыдущей недели, с нормальной температурой тела 38,5 – 39,5°C. За 18 ч до введения МСК кроликов лишали корма без ограничения воды. Во время опыта животные не получали ни пищи, ни жидкости. МСК вводили в расчете 2×10^6 /кг массы тела кролика. Температуру тела животных измеряли ректально дважды (с интервалом 30 мин.) перед введением, а также через 30, 60, 90, 120, 150, 180 мин. после введения суспензии клеток. БМКП считали апиrogenными, если после введения ни у одного из трех подопытных животных ни при одном из измерений не наблюдалось индивидуальное повышение температуры более,

чем на 0,5°C по сравнению с исходной, и сумма максимальных отклонений температур не превышала 1,2°C [3, с. 1227-1232].

Результаты и обсуждение

Во всех образцах (отработанные питательные среды, концентраты МСК), испытанных на стерильность, отсутствовал рост микроорганизмов-контаминантов. Как было указано ранее, микробное загрязнение клеточного препарата может привести не только к снижению качества готового продукта, но и к тяжелым последствиям для здоровья и жизни пациента. Поэтому соблюдение требований санитарно-эпидемиологического режима на всех этапах получения клеточного продукта, работа в условиях «чистых помещений», использование валидированных в отношении бактериальной контаминации ламинарных шкафов позволяет свести к минимуму риск получения нестерильного продукта. Включение антибиотиков в состав питательных сред не является альтернативой асептическим условиям работы [11, с. 30].

При определении микоплазменного заражения концентратов МСК показано отсутствие ДНК микроорганизмов *Mycoplasma spp.* во всех исследованных образцах. Несмотря на то, что микоплазменная контаминация при работе с культурами клеток достаточно частое явление [4, с. 62], снизить риск заражения позволяет использование в работе сертифицированных питательных сред, исключение из процесса реагентов животного происхождения и замена их на компоненты донорской крови (лизат тромбоцитов), прошедших входной контроль качества.

При исследовании на токсичность при введении одного образца МСК обнаружили гибель одной мыши. В соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15 эксперимент повторили. При повторном введении препарата в опыте остались живы 5 из 5 животных, исходя из чего сделан вывод, что данный концентрат МСК нетоксичен. Таким образом, все исследованные БМКП (n=15) признаны безопасными для внутривенного введения.

При изучении пирогенности ни один образец не вызвал лихорадки у лабораторных животных (кролики). Индивидуальные отклонения температуры тела кроликов в контрольные временные точки представлены в таблице 1 в виде минимума, максимума и медианы.

Таблица 1.

Индивидуальные отклонения температуры тела кроликов

Контрольные временные точки, мин	Температура, °С
30	-0,5 – 0,3 (0,0)
60	-0,5 – 0,4 (0,05)
90	-0,6 – 0,4 (0,1)
120	-0,6 – 0,4 (0,05)
150	-0,5 – 0,5 (0,1)
180	-0,4 – 0,3 (0,1)

Согласно ОФС.1.2.4.0005.15, изменение температуры тела животного ниже исходной величины считали равным нулю и не учитывали при анализе результатов. Как следует из представленных в таблице данных, индивидуальные отклонения температуры тела кроликов не превышали допустимых границ и максимально достигали 0,5°C. Сумма отклонений температуры составила от 0,1°C до 0,8°C (медиана – 0,5°C). Таким образом, клеточный продукт является апиrogenным и соответствует требованиям действующего законодательства.

Выводы

Качество получаемого клеточного продукта соответствует требованиям действующих нормативных документов (отсутствует бактериальная контаминация, в том числе микоплазменная, БМКП является апиrogenным и не вызывает аномальных реакций при внутривенном введении лабораторным животным).

Список литературы

1. Выявление эндотоксина грамотрицательных бактерий с помощью диагностических наборов «МАЧ-endotox spp.» в компонентах донорской крови и его сравнение с уровнем интерлейкинов / А.А. Ниязатов, Р.Г. Григорянц, Н.Н. Самсонова [и др.] // Бюл. НИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. – 2011. – Т. 12, № 6. – С. 79 - 83.
2. Глазова Н.В. О внедрении современных методов контроля пирогенности фармацевтических объектов // Фарм. производству. – 2001. – № 3. – С. 23 - 26.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1, М.; 2018. 1814 с.
4. Колокольцова Т.Д., Сабурова И.Н., Кубатиев А.А. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль // Патогенез. – 2015. – Т. 13. – №. 2. – С. 50 - 65.
5. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток ex vivo в различных питательных средах (обзор литературы и собственный опыт) / Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, Б.Б. Пурбуева [и др.] // Онкогематология. – 2010. – № 3. – С. 65 – 71.
6. Мезен Н.И. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие. 2-е изд., доп. Минск: БГМУ, 2014. – 62 с.
7. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2011. – Т. 3. – № 4. – С. 32 - 39.

8. Неугодова Н.П., Рябцева М.С., Сапожникова Г.А. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – № 3. – С. 3 - 8.

9. Показатель качества «Аномальная токсичность» - одна из основных составляющих безопасности биологических лекарственных средств / М.С. Рябцева, И.Н. Филимонова, И.Г. Осипова [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. –Т. 9, № 2. – С. 232 - 237.

10. Рачинская О.А., Меркулов В.А. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – № 1. – С. 25 - 32.

11. Рощина М.В., Гунар О.В., Сахно Н.Г. Применимость альтернативного метода для анализа стерильности лекарственных препаратов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, №. 11. – С. 61 - 64.

12. Cooper J.F., Levin J., Wagner H.NJ. Quantitative comparison of in-vitro and in-vivo methods for the detection of endotoxin // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 1971. – Vol. 78, N1. – P. 138 - 148.

13. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin // Clinical Microbiology Newsletter. – 2004. – Vol. 26, N 3. – P. 17 - 21.

14. Williams K.L. Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation. 2nd ed. N.Y.: Marcel Dekker Inc., 2001. 440 p.

УДК 576.54

Тематический рубрикатор: 76.03.02

РОЛЬ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА В ДИАГНОСТИКЕ НЕЙТРОПЕНИИ У ДЕТЕЙ

Ветошкин Константин Александрович

*кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
vetoshkin@niigpk.ru*

Целоусова Ольга Михайловна

*кандидат медицинских наук, заведующий детским отделением гематологии и
химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и
переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
tselousova@niigpk.ru*

Васкина Елена Алексеевна

*кандидат медицинских наук, врач-гематолог детского отделения гематологии
и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и
переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
vaskina_e@inbox.ru*

Назарова Елена Львовна

*кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и
молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт
гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического
агентства», г. Киров
nazarova@niigpk.ru*

Бутолина Мария Александровна

лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

butolina.maria@yandex.ru

**ROLE OF CULTURAL RESEARCH OF BONE MARROW FOR
DIAGNOSTIC OF NEUTROPENIA AT CHILDREN**

Konstantin Vetoshkin

Ph.D., Head of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Olga Tselousova

Ph.D., Head of the Children department of hematology and chemotherapy, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Vaskina

Ph.D., hematologist of the Children department of hematology and chemotherapy, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Nazarova

Ph.D., Head of the Cellular and Molecular Immunology Laboratory, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Maria Butolina

laboratory technician of the Laboratory of Cellular Technologies, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

АННОТАЦИЯ

Приобретенная идиопатическая нейтропения - редкое заболевание, связанное с нарушением пролиферации и дифференцировки гранулоцитарных предшественников. Важную роль в регуляции созревания гранулоцитарных колониеобразующих единиц (КОЕ-Г) играет стромальное микроокружение. Установлена обратная зависимость между количеством КОЕ-Г и продукцией мезенхимальными стромальными клетками (МСК) интерлейкинов (ИЛ) 1 β , 6 и трансформирующего фактора роста β (TGF β). Чем выше продукция стромой ИЛ-2 и TGF β , тем ниже в крови содержание нейтрофилов. Культуральное исследование костного мозга с оценкой функциональной активности МСК является важной составляющей частью диагностического процесса при нейтропении.

ABSTRACT

Acquired idiopathic neutropenia is a rare disease due to the violation of proliferation and differentiation of granulocytic precursors. Bone marrow stroma plays an important role in the regulation of maturation of granulocytic colony-forming units (G-CFU). The correlation between the number of granulocytic colony-forming units and the production of mesenchymal stromal cells (MSC) of interleukins (IL) 1 β , 6 and transforming growth factor β (TGF β) was established. The higher the production of IL 2 and TGF β by stroma cells, the lower the blood count of neutrophils. A culture study of the bone marrow with an assessment of the functional activity of MSC is an important component in the diagnosis of neutropenia.

Ключевые слова: нейтропения; культуральное исследование костного мозга; мезенхимальные стромальные клетки; цитокины

Key words: neutropenia; cultural research of bone marrow; mesenchymal stromal cells; cytokines

Форменные элементы крови имеют ограниченную продолжительность жизни и погибшие клетки постоянно замещаются за счет пролиферации и дифференцировки плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга. ГСК обладают способностью к восполнению своего количества и дифференцировке в клетки-предшественники всех гемопоэтических линий и, соответственно, в зрелые элементы. В настоящее время количество ГСК, их антигенную структуру определяют рутинным методом проточной цитофлуориметрии. С целью изучения функциональных характеристик ГСК, их пролиферативной и дифференцировочной способности предложен культуральный метод [3, с. 164].

Культуральный метод исследования костного мозга основан на внесении суспензии ядродержащих клеток гемопоэтической ткани в специальную питательную среду, инкубацию в течение определенного времени (14 сут.) и подсчет сформировавшихся колоний (колониобразующих единиц, КОЕ) на основании морфологического распознавания составляющих их клеточных элементов. Количество колоний равняется содержанию соответствующих КОЕ во вносимой клеточной суспензии. Колонии, содержащие клетки двух или более ростков (смешанный тип), происходят из плюрипотентных клеток-предшественников. Менее зрелые предшественники образуют более крупные колонии и требуют длительного периода времени для созревания клеток. Определение пролиферативно-дифференцировочного потенциала ГСК костного мозга востребовано при диагностике цитопений.

Помимо ГСК в костном мозге имеется еще один тип стволовых клеток - мезенхимальные, формирующие кроветворную нишу [5, с. 562; 11, с. 655; 12, с. 397; 17, с. 316]. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) образуют специализированное микроокружение, поддерживающее функционирование ГСК. Костномозговая строма регулирует кроветворение (локально, в кроветворных нишах и дистанционно, продуцируя цитокины и ростовые факторы) как в норме, так и при различных заболеваниях системы кроветворения. МСК способны продуцировать интерлейкины-1 β (ИЛ-1 β), -2

(ИЛ-2), -6 (ИЛ-6) [2, с. 17; 16, с. 2028], фактор некроза опухолей α (ФНО α), трансформирующий фактор роста β (TGF β) [13, с. 931; 14, с. 3842]. Таким образом, эффективность кроветворения напрямую зависит от состояния стромальных клеток костного мозга. Исследование механизмов взаимодействия и путей регуляции кроветворных и стромальных клеток необходимо для расширения знаний о функционировании кроветворной системы и разработки путей коррекции или компенсации изменений, происходящих в ней с возрастом, под действием внешних воздействий или же в процессе развития патологических состояний [7, с. 70; 8, с. 12, 9, с. 19], в первую очередь обусловленных угнетением нормального кроветворения. Одним из таких заболеваний является приобретенная нейтропения.

Приобретенная идиопатическая нейтропения - редкое гематологическое заболевание, которое встречается с частотой 1-2 случая на 1 млн населения [4, с. 7; 6, с. 92]. В настоящее время отсутствует единая и общепринятая классификация нейтропенического синдрома [1, с. 182; 6, с. 93; 10, с. 77]. Патогенетически выделяют 3 группы нейтропений [6, с. 93; 10, с. 78].

1. Нарушение продукции нейтрофилов в костном мозге вследствие дефекта клеток-предшественников и/или микроокружения (наследственные нейтропении, синдром нейтропении при апластической анемии).

2. Нарушение соотношения циркулирующих клеток и пристеночного пула, накопление нейтрофилов в очагах воспаления (так называемые перераспределительные нейтропении).

3. Деструкция нейтрофилов в периферическом русле и в различных органах фагоцитами (иммунные нейтропении и гемофагоцитарные синдромы, секвестрация при инфекциях).

Варианты нейтропений у детей весьма многочисленны. Выявление патогенетического механизма развития данного заболевания у пациентов возможно лишь при их глубоком и разностороннем лабораторном обследовании и необходимо для определения тактики ведения больных. С

нашей точки зрения, важным этапом диагностического процесса является выявление нарушений гранулоцитопоза в костном мозге.

Важную роль в регуляции созревания гемопоэтических клеток-предшественников гранулоцитов играет костномозговая строма посредством продукции интерлейкинов и других факторов регуляции гемопоэза [13, с. 930; 14, с. 3841; 15, с. 1315; 16, с. 2030], что делает необходимым оценку количества и функциональных свойств МСК.

Цель работы - оценить значимость культурального метода исследования костного мозга в развитии нейтропении у детей.

Материалы и методы

Проанализированы результаты лабораторного обследования 17 пациентов с нейтропенией. Критерием диагноза считали снижение абсолютного числа нейтрофилов (палочкоядерных и сегментоядерных) у детей в возрасте старше 1 года - менее 1,5 тыс. в 1 мкл периферической крови. Медиана возраста больных на период обследования составила 9,5 (2,5 - 17) лет, среди них 10 мальчиков, девочек - 7. Для исключения системных заболеваний крови проводили стандартные морфологические и цитогенетические исследования костного мозга. Определение пролиферативного потенциала и дифференцировочной способности ГСК осуществляли путем подсчета количества гранулоцитарно-маркофагально-эритроцитарно-мегакариоцитарных (КОЕ-ГЭММ, норма 0-80 на 1×10^6 миелокариоцитов), гранулоцитарных (КОЕ-Г, норма 70-350), макрофагальных (КОЕ-М, норма 10-180), эозинофильных (КОЕ-Эоз, норма 0-220) и эритроидных колоний (КОЕ - Эр, норма 200-740) в 14-дневной культуре [18, с. 95]. С этой целью в питательную среду на основе метилцеллюлозы (MethoCult Human, StemCell Technologies, Канада) вносили миелокарициты в количестве $0,2 - 0,4 \times 10^5$. Число образованных колоний считали равным содержанию соответствующих КОЕ в анализируемом образце.

МСК выделяли из миеловзвеси на основании их способности прикрепляться к поверхности лабораторного пластика. Для этого выделенные миелокарициты вносили в культуральные флаконы «Corning» (Corning Inc.,

США) в рабочем разведении $4-5 \times 10^4$ на кв. см площади флакона (первичный посев). Через 3-4 сут. осуществляли отмывание неприкрепленных клеток и смену среды. МСК культивировали в среде aMEM (StemCell Technologies, Канада) с добавлением 4% донорской плазмы, обогащенной тромбоцитами, 2 mM L-глутамин (StemCell Technologies, Канада) и 2 ед/мл гепарина (Sigma, США) при температуре 37°C в атмосфере 5% углекислого газа. Регистрировали количество фибробластных колониеобразующих единиц (КОЕ-Ф) на 7 сут. культивирования, а также определяли сроки достижения конфлюэнтного монослоя (покрытие 90-95% дна флакона). Уровни ИЛ-1 β , -2, -6, фактора некроза опухоли α (ФНО α), трансформирующего фактора роста β (TGF β) определяли иммуноферментным методом при помощи анализатора «Тесан» (Австрия) в супернатантах культур МСК. С целью выявления линейной зависимости между переменными рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

На момент обследования количество лейкоцитов в периферической крови пациентов составляло 3400 ± 1300 /мкл, среди них нейтрофилов - $969 \pm 871,3$ /мкл. В зависимости от колониеобразующей способности ГСК костного мозга пациенты разделены на 2 группы - со сниженным (группа № 1) и нормальным (группа № 2) содержанием КОЕ-Г.

У 13 из 17 (76,5%) пациентов с первичной нейтропенией выявлено низкое содержание гранулоцитарных клеток-предшественников в костном мозге: количество КОЕ-Г варьировало от 20 до 60 на 1×10^6 миелокариоцитов (в норме - от 70 до 350), число остальных КОЕ было в пределах нормы (КОЕ-ГЭММ: 0-50, КОЕ-М: 110-400, КОЕ-Эр: 30-560, КОЕ-Эоз: 0-150). У пациентов первой группы зарегистрировано самое низкое (по сравнению с пациентами второй группы) абсолютное содержание нейтрофилов в единице объема периферической крови ($170-1325$ /мкл, медиана - 920). При динамическом наблюдении за данными пациентами зарегистрированы инфекционные осложнения различной локализации и степени тяжести, потребовавшие

назначения наряду с антибактериальными препаратами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Применение Г-КСФ сопровождалось клинически выраженным положительным эффектом, что проявлялось в снижении частоты эпизодов инфекций.

В остальных случаях (4 из 17 - 23,5% обследованных пациентов) колониобразующая способность гемопоэтических клеток костного мозга оказалась в пределах нормы (КОЕ-Г: 120-360, КОЕ-М: 180-460, КОЕ-Эр: 100-560, КОЕ-Эоз: 20-50 на 1×10^6 миелокариоцитов). В периферической крови пациентов второй группы абсолютное количество нейтрофилов было умеренно снижено (1000-1840/мкл, медиана - 1650). При наблюдении за указанными пациентами в динамике тяжелые инфекционные заболевания не отмечены.

Между количеством костномозговых КОЕ-Г и уровнем нейтрофилов в периферической крови значимой связи не выявлено (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,07$), т.е. дефицит КОЕ-Г не является определяющим фактором патогенеза нейтропении. Известно, что строма костного мозга принимает непосредственное участие в регуляции пролиферации и созревания миелоидных предшественников [15, с. 1316]. В этой связи оценены количество КОЕ-Ф, скорость роста МСК и их цитокин- и хемокинпродуцирующая способность. Число КОЕ-Ф в костном мозге пациентов со сниженным содержанием гранулоцитарных клеток-предшественников (1 группа) варьировало от 2,9 до 68,8 (медиана - 10,6) на 1×10^6 миелокариоцитов. Время достижения первичным посевом стадии конфлюэнтного монослоя составило 11-24 сут. (медиана - 16). Между количеством КОЕ-Ф и содержанием КОЕ-Г в костном мозге выявлена прямая корреляционная зависимость (коэффициент Пирсона $r=0,6$), т.е. чем выше содержание в кровяной ткани мезенхимальных клеток-предшественников, тем меньше дефицит гранулоцитарных прогениторных клеток.

Продукция цитокинов МСК костного мозга пациентов со сниженным количеством КОЕ-Г составила: ИЛ-1 β : 0,489-0,816 (медиана - 0,699), ИЛ-2: 0,369-1,591 (медиана - 0,589), ИЛ-6: 87,7-127,3 (медиана - 108,0), TGF β : 3,618-

12,235 (медиана - 6,194) пг/мл/сут. Коэффициенты корреляции между количеством КОЕ-Г и продукцией ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TGF β равнялись -0,59, -0,84, и -0,50 соответственно. Следовательно, чем выше уровень продукции указанных цитокинов клетками стромы, тем меньше содержание в костном мозге предшественников гранулоцитов. Чем выше продукция клетками стромы ИЛ-2 и TGF β , тем ниже в периферической крови содержание нейтрофилов ($r=-0,66$ и -0,50 соответственно). Полученные результаты согласуются с данными об участии стромального микроокружения в патогенезе развития нейтропении [15, с. 1315].

Выводы

1. Комплексное культуральное исследование костного мозга с оценкой функциональной активности стромальных элементов является неотъемлемой частью исследования развития нейтропений и прогнозирования патогенетических вариантов заболевания у детей.

2. Глубина нейтропении зависит от уровней продукции ИЛ-2 и TGF β , а степень снижения числа КОЕ-Г – от секреции ИЛ-1 β и ИЛ-6 МСК пациентов.

Список литературы

1. Алексеев Н.А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов. СПб.: Фолиант, 2002. 416 с.
2. Андреева Е.Р. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки при моделировании тканевой («физиологической») гипоксии *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2016.
3. Гольдберг Е. Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. – 264 с.

4. Динова Е.А., Щербина А.Ю., Румянцев А.Г. Тяжелая врожденная нейтропения (обзор литературы) // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2011. - Т. 10, № 3. - С. 5 - 10.
5. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга / А.Я. Фриденштейн, К.В. Петракова, А.И. Куралесова, Г.П. Фролова // Цитология. – 1968. - № 5. – С. 557 - 567.
6. Ожегов А.М. Нейтропении у детей // Практическая медицина. - 2009. - Т. 7, № 39. - С. 92 - 94.
7. Способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток больных гемобластозами к поддержанию нормальных кроветворных клеток-предшественников изменена / Т.В. Сорокина, И.Н. Шипунова, А.Е. Бигильдеев [и др.] // Гематология и трансфузиология. - 2016. - Т. 61. - № 1. - Приложение 1. - С. 70.
8. Сорокина Т.В. Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами в процессе лечения: Автореферат дисс. ... канд. мед. наук. М., 2016.
9. Шипунова И.Н. Иерархическая структура стромального микроокружения кроветворной ткани в норме и при заболеваниях системы крови: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2018.
10. Юдина Н.Б., Брежнева Н.В. Изолированная нейтропения у детей: от педиатра к гематологу (обзор литературы) // Российский журнал детской гематологии и онкологии. - 2015. - № 1. - С. 75 - 80.
11. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells // Journal of Orthopedic Research. – 1991. – N 9. – PP. 641 - 650.
12. Friedenstein A.J., Chaikakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell tissue kinetics. – 1970. – N. 3 – PP. 393 – 403.
13. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells/ M. Groh, B. Maitra, E. Szekely, O. Koc // Experimental Hematology. - 2005. - Vol. 33, N 8. – P. 928 - 934.
14. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni [et al.] // Blood.– 2002.– V. 99, N 10.– P. 3838-43.
15. Mesenchymal stem cells contribute to the abnormal bone marrow microenvironment in patients with chronic idiopathic neutropenia by overproduction of transforming growth factor- β / E. Stavroulaki, M.C. Kastrinaki, C.G. Pontikoglou [et al.] // Stem cells and development. - 2011. - Vol. 20, N 8. - PP. 1309 - 1318.
16. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism / F. Djouad, L. Charbonnier, C. Bouffi [et al.] // Stem Cells.– 2007.– V. 25, N 8.– P. 2025-32.
17. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – N 8. – PP. 315 - 317.
18. Nissen-Druey C., Tichelli A., Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease // Acta Haematologica. - 2005. - Vol. 113. - PP. 5 - 96.

УДК 576.08: 611.018.5

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.55

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ
ПРИ ХРАНЕНИИ В УСЛОВИЯХ ОХЛАЖДЕНИЯ**

Змеева Юлия Сергеевна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

zmeeva@niigpk.ru

Исаева Наталья Васильевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

isaeva@niigpk.ru

Минаева Наталья Викторовна

кандидат медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

minaeva@niigpk.ru

Зорина Наталья Александровна

кандидат медицинских наук, заведующий отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

zorina@niigpk.ru

Шерстнев Филипп Сергеевич

кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

sherstnev@niigpk.ru

**RESULTS OF EVALUATION OF VIABILITY OF NUCLEATED CELLS OF
LEUKOCYTE CONCENTRATES DURING STORAGE UNDER COOLING
CONDITIONS**

Yuliya Zmeyeva

junior Researcher Laboratory of Cellular and Molecular Immunology Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Natalia Isaeva

candidate of Biological Sciences, Senior Researcher Laboratory of Cellular and Molecular Immunology Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological

Agency», Kirov

Natalia Minaeva

candidate of Medical Sciences, Deputy Director for Medical Work, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Natalya Zorina

candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Filipp Sherstnev

candidate of Medical Sciences, Head of Department of transfusiology and hematopoietic stem cell processing, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты оценки жизнеспособности ядродержащих клеток лейкоцитных концентратов, полученных от доноров аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, при хранении в течение 5 дней при температурном диапазоне от 2 до 6 °С. Жизнеспособность клеток определяли по проникновению ДНК-тропных красителей - трипанового синего и 7-аминоактиномицина D через поврежденную мембрану. Показано значимое снижение жизнеспособности ядродержащих клеток при хранении лейкоцитного концентрата в течение 24 часов и более.

ABSTRACT

The current work presents the results of assessing the viability of nucleated cells in leukocyte concentrates obtained from donors of allogeneic hematopoietic stem cell during storage for 5 days in the temperature from 2 to 6°C. Cell viability was determined by penetration of DNA-tropic dyes-trypan blue and 7-aminoactinomycin D through the damaged cell membrane. A significant decrease in the viability of nucleated cells during storage of leukocyte concentrate for 24 hours or more was shown.

Ключевые слова: ядродержащие клетки; лейкоцитный концентрат; жизнеспособность; 7-аминоактиномицин D; хранение.

Keywords: nucleated cells; white blood cell concentrate; viability; 7-aminoactinomycin D; storage.

Одним из эффективных методов лечения онкогематологических заболеваний является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), обеспечивающая восстановление всех ростков кроветворения после

высокодозной химиотерапии [6]. Использование этой технологии позволяет повысить частоту достижения полных ремиссий и увеличить период безрецидивной выживаемости при ряде заболеваний системы крови [1, 10]. Ежегодно в мире проводится более 40000 аллогенных и аутологичных трансплантаций ГСК для лечения ходжкинских и неходжкинских лимфом, острых лейкозов, иммунодефицитных состояний, врожденных метаболических и гематологических нарушений, миелодиспластического синдрома и хронических миелопролиферативных заболеваний [12, 14, 15].

Благодаря открытию иммунофенотипической характеристики ГСК, а именно - высокой экспрессии на клеточной мембране маркера CD34, стала возможна их идентификация [11, 7]. Использование стандартизированного протокола Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE) позволило сделать подсчет ГСК рутинной процедурой [16, 13]. Достаточная трансплантационная доза ГСК считается одним из ключевых факторов эффективности трансплантации. Минимальное количество CD34+ - клеток на килограмм массы тела реципиента, обеспечивающее восстановление гемопоэза при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), составляет 2×10^6 , рекомендованное число - $4-5 \times 10^6$ [6, 9, 10].

Проблема получения необходимой дозы ГСК и ее сохранения до трансплантации стоит достаточно остро. Одним из важных факторов, которому следует уделять внимание при контроле качества ГСК периферической крови, является жизнеспособность ядродержащих клеток (ЯСК), которая во многом зависит от длительности и температуры хранения материала [5]. Количество нежизнеспособных клеток увеличивается в процессе хранения. При подготовке донорского лейкоконцентрата (ЛК) в ряде случаев проходит несколько суток от момента его получения до трансплантации. Время, затраченное на этапе получения материала методом лейкоцитафереза, значительно варьирует. Центр заготовки ЛК и трансплантирующая клиника могут быть территориально разобщены между

собой, что требует временных затрат на доставку клеточного материала реципиенту. В некоторых случаях он подвергается длительной высокотехнологичной обработке с очисткой от нежелательных клеточных фракций и обогащением целевыми функционально-активными клетками.

В настоящее время нормативная база, регламентирующая температурные и временные условия хранения ЛК, отсутствует. Пуповинную кровь, содержащую ГСК, в соответствии с приказом Минздрава РФ от 27.07.2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» хранят при температуре от 15 до 30°C не более 24 часов [3]. Гранулоциты, полученные методом афереза - клеточный продукт, близкий к ЛК по получению и составу, хранится при температуре 20-24 °С в течение суток (Постановление Правительства РФ от 22.06.2019 г. N 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации») [4]. Периферическую кровь следует хранить в диапазоне температур от 2 до 6°C, что позволяет сдерживать бактериальную вегетацию и сохранять ее лечебные свойства (Руководство Всемирной организации здравоохранения по организации, обслуживанию и использованию оборудования холодильной цепи для крови) [8]. Время хранения при таком температурном диапазоне зависит от используемого консервирующего раствора.

ЛК, как правило, трансплантируют в течение 24 часов с момента заготовки. В некоторых случаях время до трансплантации превышает 24 часа. Температура хранения клеточного продукта в медицинском центре, проводящем заготовку, в процессе транспортировки и в трансплантационном центре определяется внутренними требованиями медицинских учреждений. Следовательно, изучение жизнеспособности ЯСК ЛК в течение нескольких суток при охлаждении и оценка влияния длительности хранения на сохранность клеток ЛК представляет научный и практический интерес.

Цель исследования

Оценить жизнеспособность ЯСК ЛК, хранящихся в течение 5 суток при температуре 2-6°C.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили ЯСК ЛК доноров ГСК периферической крови, полученные методом аппаратного лейкоцитафереза на сепараторах Amicus и Spectra Optia. ЛК были смешаны с консервирующим антикоагулирующим раствором – цитратно-декстрозным буфером. Образцы хранились в фармацевтическом холодильнике при температуре 2-6°C в пробирках типа «Эппендорф».

Метод микроскопии использовали для оценки жизнеспособности лейкоцитов 42 образцов ЛК 23 доноров. Нежизнеспособными считали клетки, пропускающие через свою мембрану суправитальный краситель трипановый синий. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность определяли по формуле: $V = n / N \times 100\%$, где V – относительное содержание жизнеспособных клеток в образце, n - количество окрашенных красителем клеток, N – количество подсчитанных клеток [2].

Метод проточной цитофлуориметрии использовали для анализа жизнеспособности разных популяций ЯСК 50 образцов ЛК 28 доноров. Окраску производили флуоресцентным ДНК-тропным красителем 7-аминоактиномицином D (7-AAD) и моноклональными антителами к антигенам CD34 (PE) и CD45 (FITC). Жизнеспособность ЯСК определяли в шести популяциях в зависимости от экспрессии антигенов CD45, CD34 и гранулярности клеток: ГСК (CD34⁺ - клетки), эритрокарициты (CD45⁻ - клетки), лейкоциты (CD45⁺ - клетки), среди которых выделяли популяции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

Для определения изменения проницаемости клеточных мембран сравнивали значения жизнеспособности в исходных образцах с результатами, полученными через каждые 24 часа на протяжении 5 дней. Оценку результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических

гипотез с помощью программы Stadia. Нормальность распределения количественных показателей определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Поскольку изучаемые количественные признаки имели ненормальное распределение, данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха. Выборки сравнивали с помощью непараметрического W-критерия Вилкоксона. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Результаты изменения жизнеспособности лейкоцитов, полученные методом микроскопии, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты изменения жизнеспособности лейкоцитов, полученные методом микроскопии

Популяция ЯСК	Жизнеспособность лейкоцитов, %					
	0 сутки	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
Лейкоциты	99,6 [99,5; 99,9]	99,3 [99,0; 99,5]	98,5 [98,1; 99,0]	97,6 [96,5; 98,3]	96,0 [95,0; 96,8]	94,0 [92,3; 95,9]

Увеличение проницаемости клеточных мембран лейкоцитов являлось значимым уже на первые сутки хранения ЛК и оставалось таким при его дальнейшем хранении ($p < 0,05$). Жизнеспособность лейкоцитов через сутки хранения снижалась на 0,3%, через 2 суток – на 1,1%, через 3 – на 2%, через 4 – на 3,6%, через 5 – на 5,6%.

Результаты изменения жизнеспособности ЯСК, полученные методом проточной цитофлуориметрии, представлены в таблице 2. Увеличение проницаемости клеточных мембран ЯСК по сравнению с исходным значением данного параметра является значимым для первых и последующих суток хранения ЛК ($p < 0,05$). Жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток через 1 сутки хранения снижается на 0,5%, через 2 суток – на 1,5%, через 3 - на 2,1%, через 4 - 3%, через 5 - на 4,1%.

Таблица 2.

Результаты изменения жизнеспособности ЯСК, полученные методом проточной цитометрии

Популяция ЯСК	Жизнеспособность ЯСК, %					
	0 сутки	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
CD34 ⁺ - клетки	99,3 [98,9; 99,7]	98,8 [97,9; 99,2]	97,8 [96,2; 98,1]	97,2 [95,4; 97,3]	96,3 [94,6; 97,0]	95,2 [87,7; 96,2]
CD45 ⁺ - клетки	99,8 [99,5; 99,8]	99,5 [99,1; 99,6]	99,0 [98,1; 99]	98,0 [97,1; 98,5]	96,7 [96,2; 97,7]	95,4 [92,3; 96,5]
CD45 ⁻ - клетки	99,3 [98,3; 99,8]	97,4 [96,1; 99,3]	93,7 [88,0; 97,5]	88,4 [78,1; 96,0]	79,3 [62,6; 90,7]	71,2 [58,6; 80,0]
моноциты	99,9 [99,7; 99,9]	99,7 [99,5; 99,8]	99,4 [98,9; 99,5]	99,0 [98,1; 99,2]	98,0 [96,6; 98,6]	96,9 [94,9; 97,6]
лимфоциты	99,9 [99,9; 99,9]	99,8 [99,6; 99,9]	99,4 [99,0; 99,6]	98,8 [97,9; 99,0]	97,7 [96,8; 98,1]	96,5 [94,6; 97,5]
гранулоциты	99,8 [99,5; 99,8]	99,5 [98,3; 99,6]	99,0 [96,8; 99,3]	97,2 [95,3; 98,5]	95,5 [92,5; 97,6]	93,3 [90,4; 96,0]

При сравнении жизнеспособности популяций ЯСК определили, что максимальное снижение жизнеспособности на пятые сутки хранения наблюдается у эритрокариоцитов до 71,2% и гранулоцитов до 93,3%. Остальные популяции клеток через 5 суток после заготовки остаются жизнеспособными более чем на 95%. Учитывая невысокое количественное содержание клеток наиболее подверженных разрушению (эритрокариоциты - 1,4%, гранулоциты – 21,9% от всех ЯСК), можно предположить, что снижение

их жизнеспособности не должно оказывать значительного влияния на качество ЛК, в противном случае увеличение длительности хранения чревато накоплением продуктов деградации клеток в трансплантационном продукте.

Согласно результатам исследования наиболее безопасным периодом хранения ГСК-содержащих ЛК в условиях охлаждения следует признать 24 часа с момента заготовки. Полученные данные позволят в последующем разработать способ расчета трансплантационной дозы, необходимый для прогнозирования потерь целевых клеток в процессе хранения от момента получения до трансплантации.

Заключение

В случаях, когда время до трансплантации ГСК превышает 24 часа, важно сохранить количество клеток на уровне, обеспечивающем лечебный эффект. Жизнеспособность всех ЯСК трансплантационного материала, в том числе ГСК, снижается при хранении, поэтому целесообразно учитывать данный параметр при расчете трансплантационной дозы CD34⁺ - клеток в ЛК, в зависимости от сроков хранения или транспортирования, особенно в случаях, когда клеточность трансплантата приближается к минимально допустимой дозе, способной обеспечить восстановление гемопоэза.

Список литературы

1. Егоров В.В., Иванов А.А., Пальцев М.А. Стволовые клетки человека // Молекулярная медицина. – М.: 2003. – № 2. – С. 3-13.
2. Митрошина Е.В., Мищенко Т. А., Ведунова М. В. Определение жизнеспособности клеточных культур: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, 2015. – С. 9 -11.

3. О развитии клеточных технологий в Российской Федерации [Электронный ресурс]: Приказ Минздрава РФ от 27.07.2003 г. № 325 – Режим доступа. - URL: <https://base.garant.ru/4179455/> (дата обращения 12.02.2020).

4. Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации [Электронный ресурс]: Постановление Правительства РФ от 22 июня 2019 г. N 797 – Режим доступа. – URL: <https://base.garant.ru/72284110/> (дата обращения 12.02.2020).

5. Опыт оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконцентратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки / Н. В. Исаева, И. В. Парамонов, Н. В. Минаева [и др.] // Медицинский алфавит. – 2016. – Т. 3, № 19. – С.79-80.

6. Оценка качества трансплантата гемопоэтических стволовых клеток // МедУнивер: [сайт]. – Режим доступа. – URL: https://meduniver.com/Medical/gematologia/ocenka_kachestva_transplantata_stvolovix_kletok.html (дата обращения 12.02.2020).

7. Пат. 2513511 РФ, G01N 33/533, C12N 5/0789. Способ количественного определения клеток-предшественников (CD34+) в кроветворной ткани / Гривцова Л. Ю., Тупицын Н. Н. (Россия). - № 2012154857/15; Заявлено 19.12.2012; Опубл. 20.04.2014; Бюл. №11.

8. Руководство по организации, обслуживанию и использованию оборудования холодной цепи для крови. - ВОЗ, 2009. – С. 6-7.

9. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при лечении лимфом [Электронный ресурс] – Режим доступа. – URL: http://med4share.ru/media/files/clinic_recommend/Transplantation.pdf (дата обращения 12.02.2020).
10. Трансфузиология: Клиническое руководство / под ред. М.Ф. Заривчацкого. – Пермь: ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России, 2014. – С.732.
11. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1 a cell / C. I. Civin, L. S. Strauss, C. Brovall [et al.] // J. Immunol. – 1984. - Vol. 133(1). - P. 158.
12. Hatzimichael E., Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation // Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. – 2010. - Vol. 3(1). – P. 105.
13. ISHAGE Protocol: Are We Doing It Correctly? / A. Whitby, L. Whitby, M. Fletcher [et al.] // Cytometry B Clin Cytom. – 2012. – Vol. 82(1). - P. 10.
14. The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus [Электронный ресурс] / J.R. Passweg, H. Baldomero, C. Chabannon [et al.] // Bone Marrow Transplant, 2020. – Режим доступа. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41409-020-0826-4> (дата обращения 08.04.2020).
15. Sahdev I. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology (Sixth Edition): Chapter 31 - Hematopoietic Stem Cell Transplantation / I. Sahdev, H. Abdel-Azim. – 2016. - P. 577.

16. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34 + hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study / J. W. Gratama, J. Kraan, M. Keeney [et al.] // Cytotherapy. – 2003. – Vol. 5(1). - P. 55.

УДК 576.371:616.98

Тематический рубрикатор: 76.03.43

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ COVID-19

Кудокотцева Ольга Валентиновна

канд. биол. наук, ст.н.с., Институт проблем криобиологии и криомедицины

НАН Украины, г. Харьков

2ilomakin53@gmail.com

Ломакин Иван Иванович

канд. мед. наук, ст.н.с., Институт проблем криобиологии и криомедицины

НАН Украины, г. Харьков

2ilomakin53@gmail.com

Бабийчук Владислав Георгиевич

доктор мед. наук, зав. отделом криофизиологии Института проблем

криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

PROSPECTS OF CELL THERAPY USING IN TREATMENT OF COVID-19

Olga Kudokotseva

Ph.D., senior researcher, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of

the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

Ivan Lomakin

Ph.D., senior researcher, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of

the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

Vladislav Babiichuk

Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Cryophysiology, Institute for

Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of

Ukraine, Kharkiv

АННОТАЦИЯ

В работе дан краткий обзор новых подходов к лечению заболевания COVID-19. Рассмотрены методы клеточной терапии и обоснована целесообразность дальнейшей работы в этом направлении.

ABSTRACT

We provided a brief overview of new approaches to the treatment of COVID-19 disease. The methods of cell therapy are under consideration and the feasibility of further work in this direction is substantiated.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2; COVID-19; клеточная терапия; стволовые клетки; криоконсервированные клетки пуповинной крови

Keywords: virus SARS-CoV-2; COVID-19; cell therapy; stem cells; cryopreserved cord blood cells.

В последнее время основная тема всех сообщений – стремительно быстрое распространение вируса SARS-CoV-2, ответственного за пандемию. ВОЗ назвала заболевание, вызываемое новым вирусом, именуемым novelCoV или nCoV, COVID-19 и призвала ученых и специалистов мира объединить все усилия в борьбе против смертельной угрозы, нависшей над человечеством.

Мир делает только первые шаги в поиске противовирусных вакцин и лекарств против COVID-19. Несколько экспериментальных методов лечения nCoV находится на стадии клинической оценки. Среди таких методов - трансфузия сыворотки (плазмы), полученной от излеченных пациентов, и стволовые клетки (СК).

Мир вспомнил про старую, всем известную методику, так называемую «реконвалесцентная плазма» или «реконвалесцентная сыворотка», которая раньше уже показала свою высокую эффективность и успешно применялась для борьбы с эпидемиями таких вирусных инфекций, как грипп и корь. В настоящее время Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) разрешило использовать плазму крови реконвалесцентов для лечения COVID-19 [11]. Ученые считают, что плазма

крови пациентов, которые справились с инфекцией, содержит антитела, которые могут помочь победить болезнь тем, кто находится в критическом состоянии. Главным преимуществом данного метода лечения является его доступность и относительная простота выполнения, тогда как на разработку лекарств и вакцин может понадобиться много времени.

На сегодняшний день известно, что COVID-19 вызывает в организме «цитокиновую бурю», то есть иммунные клетки, активированные вирусом, выделяют неконтролируемое избыточное количество цитокинов, обладающих повреждающим действием на собственные ткани (в первую очередь страдают органы дыхания), способствуют отеку, фиброзу и функциональной недостаточности органа.

Учитывая доказанные иммуномоделирующие свойства и высокий регенеративный потенциал СК, которые уже успешно используются в лечении более 100 заболеваний, ученые обратили внимание и на возможность применения этих клеток для укрепления или «обуздания» уже спровоцированной вирусом иммунной системы пациентов.

На Clinicaltrials.gov каждый день появляются все новые исследования влияния СК на COVID-19, которые являются частью 80 или более новых клинических испытаний средств, предназначенных для борьбы с новым вирусным заболеванием. Это число, вероятно, скоро превысит 100 [8]. Стволовые клетки для исследований получают из разных источников: пупочного канатика, менструальной и пуповинной крови (ПК), плаценты, жировой ткани.

Новости поступают с chinaXiv.org, китайского открытого хранилища для научных исследователей, поддерживаемого Китайской академией наук: группа экспертов во главе с Бинг Лян из Народной больницы Баошань опубликовала подробности наблюдения за состоянием тяжелобольной 65-летней китайки, инфицированной Sars-CoV-2, после инфузии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из пупочного канатика. На протяжении почти 2 недель пациентка

находилась в отделении интенсивной терапии, но через 4 дня после первого введения СК женщина встала на ноги и смогла снова ходить [4].

По мнению ученых, хотя это только один случай успешного преодоления последствий коронавирусной инфекции с помощью СК, он чрезвычайно важен и обосновывает целесообразность подобных клинических исследований по лечению критических пациентов с Covid-19.

Преимущество использования МСК состоит в том, что они могут быть легко получены (в основном из пуповины и плаценты человека) и культивированы до нужной концентрации, обладают низкой иммуногенностью и высокой пластичностью, способностью к иммуномодуляции и восстановлению тканей, что делает их идеальным кандидатом для клинического применения [9]. Также было высказано предположение, что если эти клетки купируют острое воспаление легких, вызванное инфекцией H5N1, профиль воспалительных цитокинов у которой сходный с таковым у COVID-19, то их можно с успехом применять и в борьбе с nCoV [5].

Дальнейшие исследования показали, что еще 7 пациентов с пневмонией Covid-19 (1 – в критически тяжелом состоянии, 4 – в тяжелом и 2 – средней тяжести) проходили курс терапии МСК в Пекинской больнице. Аллогенные МСК, выделенные из пуповины и культивированные в условиях GMP, вводили внутривенно три раза через каждые 3 дня в дозе (5×10^7) клеток [4, 12]. В результате лечения выявлены значительные улучшения функциональных показателей. Клинические результаты, а также изменение воспалительной и иммунной функции и неблагоприятные эффекты у этих 7 пациентов оценивали в течение 14 дней после введения МСК. Легочная деятельность и симптомы у 100% наблюдаемых были значительно улучшены уже через 2 дня после трансплантации МСК, количество периферических лимфоцитов увеличилось, значение С-реактивного белка уменьшилось, а гиперактивированные цитокин-секретирующие иммунные элементы CXCR3+CD4+ Т-клетки, CXCR3+CD8+ Т-клетки и CXCR3+ NK-клетки исчезли через 3-6 дней. Кроме того, значимо увеличилась численность регуляторной популяции дендритных клеток, при

этом уровень ФНО- α был значимо снижен, а уровень Ил-10 повышен в группе лечения МСК по сравнению с группой контроля, которым вводили плацебо. Кроме того, профиль экспрессии генов показал, что МСК были ACE2 и TMPRSS2-отрицательны, т.е. не имели на своей поверхности соответствующих рецепторов и не могли быть инфицированы вирусом SARS-CoV-2.

Таким образом, внутривенная трансплантация аллогенных МСК была безопасной и эффективной при лечении пациентов с пневмонией COVID-19, особенно у пациентов в критическом состоянии [4, 10, 12].

Эти единичные случаи успешного преодоления последствий коронавирусной инфекции с помощью СК чрезвычайно важны и обосновывают целесообразность подобных клинических исследований по лечению критических пациентов с Covid-19 при помощи СК ПК, плаценты и пупочного канатика. Кроме этого, предварительные результаты исследований клеточной терапии коронавирусной инфекции свидетельствуют, что данный метод лечения безопасен и эффективен [10, 12].

Таким образом, терапия МСК, ингибирующими чрезмерную активацию иммунной системы и способствующими эндогенной репарации легких после инфекции SARS-CoV-2, дает обнадеживающие результаты и определяет целесообразность дальнейшей работы в этом направлении.

В последние недели появились данные о том, что основной мишенью коронавируса являются не легкие человека, а его кровь. Вся легочная механика не повреждена, но вирус вызывает уникальный эффект, влияя на молекулы гемоглобина в крови, развивается тяжелая гипоксемия и полиорганная недостаточность из-за серьезного снижения пропускной способности Hb. При тяжелой форме заболевания вирус атакует гемоглобин в эритроцитах, из-за чего последние становятся неспособными транспортировать кислород к клеткам и органам [6]. Данная теория подтверждена тем, что уровень гемоглобина был значительно снижен у пациентов с тяжелой формой течения

заболевания по сравнению с теми, у кого заболевание протекало легко или бессимптомно (разница составила -7,1 г/л) [7].

Компьютерная модель, созданная китайскими учеными, показывает, что гемоглобин могут атаковать не сами вирусные частицы, а вирусные белки. Некоторые из них связывают порфирин, а другие вытесняют из гема железо, взаимодействуя с белковыми бета-цепями гемоглобина. Клетки легких реагируют на изменение газообмена усилением воспаления, возникает эффект «матового стекла», который заметен на компьютерных томограммах легких больных [7]. Это означает, что в такой ситуации искусственная вентиляция легких оказывается практически бесполезной.

Новые данные могут изменить клинические рекомендации по лечению больных COVID-19. Возможно, вместо искусственной вентиляции целесообразнее применять трансфузии (например, переливание крови или эритроцитов), чтобы предотвратить развитие тяжелого состояния и смерть.

С учетом всех, хоть и немногочисленных клинических наблюдений и инновационных методов терапии, можно предположить высокий терапевтический потенциал трансфузии либо цельной пуповинной крови, либо ее компонентов, содержащих гемопоэтические стволовые клетки.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков, Украина) имеет многолетний успешный опыт работы по созданию и внедрению в практику способов криоконсервирования и долгосрочного хранения биологических объектов разного уровня организации, а также активно проводит работы по изучению терапевтической эффективности криоконсервированных клеточных препаратов фетоплацентарного происхождения. Так, еще в 2003 году были опубликованы данные о возможности клинического применения аллогенных ядродержащих клеток ПК, предварительно криоконсервированных при температуре жидкого азота, в комплексном лечении заболеваний различной этиологии, в том числе и вирусной [1]. В 2013 году были опубликованы интересные данные о противовирусном эффекте при превентивном применении деконсервированных

клеток ПК человека. В ходе эксперимента у мышей повышалась резистентность к вирусу гриппа (штамм А/Виктория (H3N2)), что проявлялось в более быстрой элиминации патогена из легочной ткани без существенных изменений ее структуры [2]. Получены также экспериментальные данные, показывающие улучшение гемомикроциркуляции и ангиогенеза в патологически измененных участках ткани после введения криоконсервированных ядродержащих клеток ПК [3].

Обобщая полученные материалы о клинических испытаниях СК в борьбе против вируса SARS-CoV-2 и экспериментальные исследования в этой области мы прекрасно понимаем, что к моменту публикации статьи многое может измениться и в поведении самого вируса, и в нашем представлении о нем. Тем не менее время настоятельно требует от всей научной общественности объединить усилия и своими разработками предотвратить торжество вирусов над *Homo sapiens*.

Список литературы

1. Гемокорд – препарат комплексної терапії / А. О. Цуцаєва, Т. О. Глушко, Н. П. Лобасенко и др. // Трансплантологія. 2003. Т.4. №1. С.46-48.
2. Кожина О. Ю., Волина В. В., Гольцев А. Н. Морфологическое состояние легочной ткани мышей, инфицированных вирусом гриппа, после введения криоконсервированной кордовой крови // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Вып.11. (154). Вып. 22. С. 138-145.
3. Экспериментальное обоснование применения лечебной гипотермии и клеточной терапии при дисциркуляторной энцефалопатии у крыс линии SHR. Часть 2. Структурные изменения в ткани головного мозга / В. С. Айдарова, В. Г. Бабийчук, О. В. Кудокоцева, О. В. Наумова, И. И. Ломакин // Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019. Т.29. №1. С. 58-72.

4. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells / Liang B. et al. // www.chinaxiv.org > abs. chinaxiv: 202002.00084v1.pdf
5. Darwish I., Mubareka S., Liles W. C. Immunomodulatory therapy for severe influenza // *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011. V.9. N7. P. 807-822.
6. Lippia G., Mattiuzzi C. Hemoglobin value may be decreased in patients with severe coronavirus disease 2019 // *Hematol Transfus Cell Ther.* 2020. Apr 2. pii: S2531-1379(20)30029-8. doi: 10.1016/j.htct.2020.03.001.
7. Liu W. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism // chemrxiv.org > articles > 11938173
8. Maxmen A. More than 80 clinical trials launch to test coronavirus treatments // *Nature.* 2020. 578. P. 347-348. doi: 10.1038/d41586-020-00444-3
9. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy / Fan X. L., Zhang Y., Li X., Fu Q. L. // *Cell Mol Life Sci.* 2020. doi:10.1007/s00018-020-03454-6.
10. Shetty A. K. Mesenchymal Stem Cell Infusion Shows Promise for Combating Coronavirus (COVID-19)-Induced Pneumonia // *Aging and Disease.* 2020. V.11. N2. P. 462
11. Tanne J. Covid-19: FDA approves use of convalescent plasma to treat critically ill patients // *BMJ.* 2020. 368. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.m1256>

12. Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia / Leng Z. et al. // *Aging and Disease.* 2020. V.11. N2. P. 216-228. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2020.0228>

УДК 615.361.013.85.014.41:616.61-008.6-092.4:57.086.3:537.533.33

Тематический рубрикатор: 76.03.02

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

Строна Вера Ивановна

*канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории криоморфологии,
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Репин Николай Васильевич

*докт. биол. наук, зав. лаборатории криоморфологии, Институт проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Invrepin@gmail.com

Марченко Лариса Николаевна

*канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории криоморфологии,
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

marchiklara@gmail.com

Говоруха Татьяна Петровна

*канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории криоморфологии,
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Чиж Юлия Александровна

*аспирант лаборатории криоморфологии, Институт проблем криобиологии и
криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

juliakrio@ukr.net

PROSPECTS FOR USE OF PLACENTAL CRYOEXTRACT IN THERAPY OF CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY (EXPERIMENTAL STUDY)

Vera Strona

PhD in Biology, senior researcher at the Laboratory of Cryomorphology (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov)

Nikolay Repin

D. Sci in Biology, Head of the Laboratory of Cryomorphology (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov)

Larisa Marchenko

PhD in Biology, senior researcher at the Laboratory of Cryomorphology (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov)

Tatyana Govorukha

PhD in Biology, senior researcher at the Laboratory of Cryomorphology (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov)

Yuliia Chyzh

PhD student at the Laboratory of Cryomorphology (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov)

АННОТАЦИЯ

Изучена возможность использования аллогенного криоэкстракта плаценты (КЭП) в лечении хронической почечной недостаточности (ХПН) у крыс. ХПН моделировали введением 50% глицерола. Проводили различные виды терапии: блокаду РААС эналаприлом и спиронолактоном, введение КЭП, пентонсифиллина, комбинирование КЭП и блокады РААС, которые осуществляли на 2-й неделе заболевания, а также двумя курсами – на 2-й и 9-й неделях. Через 16 недель анализировали формулу крови и лейкоцитарные

индексы. Нормализация состояния периферической крови и воспалительного процесса наблюдалась при введении КЭП двумя курсами.

ABSTRACT

The possibility of using allogeneic placental cryoextract (PCE) in the therapy of chronic renal failure (CRF) in rats has been studied. The CRF has been simulated by the administration of 50% glycerol. Various types of therapy were carried out such as: blockade of RAAS with enalapril and spironolactone, administration of PCE, pentonophylline, a combination of PCE and blockade of RAAS which were carried out at the 2nd week of the disease, as well as by two courses – at the 2nd and 9th weeks. After 16 weeks, the blood count and leukocyte indices were analyzed. Normalization of the state of peripheral blood and the inflammatory process was observed with the introduction of PCE in two courses.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность; криоэкстракт плаценты; лейкоцитарная формула крови.

Keywords: chronic renal failure, placental cryoextract, leukocyte blood count.

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) – это нарушение гомеостаза, вызванное необратимым снижением массы действующих нефронов. Возникает она при всех прогрессирующих заболеваниях почек и проявляется многосимптомным комплексом, отражающим участие в этом процессе практически всех органов и систем. Известно, что ренин-ангиотензиновая (РАС) и ренин-ангиотензин-альдостероновая системы (РААС) также глубоко вовлекаются в патофизиологию ХПН. Данные литературы свидетельствуют о том, что иммунитет, гемостаз, калликреин-кининовая система, РАС, неспецифическая резистентность, процессы ПОЛ и антиоксидантной защиты составляют единую клеточно-гуморальную систему защиты организма, взаимосвязь между отдельными составляющими которой осуществляется главным образом с помощью цитокинов, а также гормонов, простагландинов, лейкотриенов, нейропептидов и других биологически активных соединений [6, 14].

Препараты, применяемые при лечении ХПН (как правило, в комбинации) используются в такой последовательности: ингибиторы АПФ (иАПФ), диуретики, селективные блокаторы кальциевых каналов, селективные β -адреноблокаторы. В настоящее время в комплексном лечении различных заболеваний все большее значение придается использованию биологически активных соединений, в том числе и фетоплацентарного происхождения, в качестве стимулирующей терапии, направленной на активацию метаболических процессов организма. Особенно интенсивное развитие тканевой терапии как фактора, влияющего на организменный гомеостаз, наблюдается в последние 15-20 лет [2, 5, 13].

Использование тканей, содержащих биологически активные соединения в высокой концентрации, открывает новые возможности в терапии трудно излечимых состояний, а также в области репаративной медицины, поскольку активизирует природный потенциал восстановительных и регенерационных возможностей целостного организма [1, 9].

Действие препаратов фетоплацентарного комплекса заключается в неспецифическом влиянии на организм реципиента и проявляется в стимуляции репаративных способностей тканей организма. Это поддерживает тканевый, организменный гомеостаз и осуществляется включением нервной, эндокринной и иммунной систем.

Наличие в плаценте широкого спектра метаболически активных соединений, обеспечивающих развитие плода, привлекало внимание исследователей возможностью использования этой ткани как источника природных сбалансированных соединений для коррекции нарушений на клеточном уровне при патологических изменениях в организме.

Имеются экспериментальные и клинические данные об эффективности применения препаратов из ткани плаценты при терапии сахарного диабета, генерализованного пародонтита, атеросклероза и ИБС, климактерического синдрома, фетоплацентарной недостаточности. За счет наличия в высокой концентрации гормонов, ферментов и других биологически активных веществ

они корректируют иммунологические и гормональные показатели организма и повышают его устойчивость к неблагоприятным и аллергенным факторам, стрессам, предотвращают преждевременное старение организма [7].

Пептидные биорегуляторы, которые содержатся в плаценте, являются по своему механизму действия факторами, способными оптимизировать, нормализовать функцию клетки. Поддерживая высокую активность неспецифических защитных и репаративных внутриклеточных систем, они повышают выживаемость клеток и снижают темп их апоптоза в нормальных и патологических условиях. Содержащиеся в препаратах плаценты ростовые факторы и другие биологически активные соединения обеспечивают выживание и стимуляцию регенерации поврежденных тканей реципиента за счет содержания стадиоспецифических белков и пептидов, антиоксидантов, перехватчиков активных форм кислорода, адаптогенов, противовоспалительных бактериостатических соединений, пептидов, стимулирующих иммунокомпетентные клетки [4, 8].

Препараты на основе нативной ткани плаценты, обладая всеми вышеуказанными достоинствами, однако, не имеют достаточной степени безопасности их хранения, транспортировки и применения. Современное состояние развития науки позволяет использовать передовые достижения в области физики, криобиологии и других смежных дисциплин для разработки биотехнологии, которая обеспечивает высокое качество материала после замораживания-отогрева. К такой биотехнологии принадлежит низкотемпературное хранение, которое, как свидетельствуют многочисленные публикации, сохраняет биологически активные соединения в состоянии, максимально приближенном к нативному [7].

Представленные данные литературы явились мотивацией для изучения возможности использования аллогенного криоэкстракта плаценты при комбинированном (совместно с медикаментозными средствами) лечения ХПН у крыс. Хроническую почечную недостаточность у крыс моделировали путем

внутримышечного введения 50% раствора глицерола в дозе 10 мл на 1 кг массы тела.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986) и «Общих этических принципов экспериментов на животных», одобренных I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001). Материалом исследования служили 54 белые беспородные крысы массой 180–200 г, возрастом 4 месяца, разделенные на 9 групп по 6 животных в каждой. Контролем были интактные крысы. Животным 7 групп с ХПН применяли различные варианты лечения: введение криоэкстракта плаценты крысы (КЭП) на 2 неделе развития патологии, введение КЭП на 2 и 9 неделях; применение медикаментозной блокады РААС на 2-3 неделе; применение блокады РААС на 2-3 и 9-10 неделях; комбинирование на 2 неделе медикаментозной блокады РААС и введения КЭП; проведение повторного курса лечения комбинацией блокады РААС и введения КЭП на 9 неделе развития ХПН. Также отдельной группе крыс проводили внутримышечные инъекции пентоксифиллина (20 мг/мл, «Здоровье», Украина) в дозе 3,33 мг ежедневно на 2-3 и 9-10 неделях развития патологии. Одну группу составили крысы с ХПН без лечения.

Криоэкстракт плацентарной ткани крысы вводили внутримышечно по 0,5 мл трижды в неделю. Медикаментозная блокада РААС проводилась с помощью эналаприла (энап таблетки по 2,5 мг фирмы KRKA, Словения) и спиронолактона (верошпирон таблетки по 25 мг фирмы Геден Рихтер), которые вводили per os в дозе 0,5 мл суспензии (10 мг энапа + 200 мг верошпирона в 30 мл физраствора) ежедневно в течение 2 недель.

Расчет доз медикаментов проводили по формуле Рыболовлева [11]. Животных выводили из эксперимента через 16 недель после введения глицерола. Мазки крови окрашивали по Паппенгейму для подсчета формулы крови и расчёта индекса сдвига ядра. Исходя из формулы крови, рассчитывали

модифицированный лейкоцитарный индекс интоксикации Б.А. Рейса (ЛИИр) и ядерный индекс Даштаянца (ЯИ).

Криоэкстракт получали из плаценты беременных самок крыс на 18 сутки гестации. С этой целью ткань плаценты максимально отмывали от крови физиологическим раствором, измельчали в гомогенизаторе. Гомогенат плацентарной ткани заливали физиологическим раствором в соотношении 1 г ткани на 2 мл и замораживали до -20°C для лучшей экстракции гормонов и биологически активных веществ. После размораживания тканевую суспензию центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут, супернатант собирали и хранили в полиэтиленовых пробирках в жидком азоте. В криоэкстракте определяли содержание гормонов методом иммуноферментного анализа [17]. Гель-хроматографию проводили на колонке 27x1 см с сефадексом G-75 фирмы "Sigma".

При измерении содержания тестостерона в криоэкстракте плаценты крыс установлено, что его концентрация достигала порядка 3,4 нг/мл. Содержание эстрадиола равно 770 пг/мл, а кортизола - 530 нмоль/мл. Таким образом, было доказано, что технология изготовления криоэкстракта позволяет сохранить содержание гормонов, присущих плацентарной ткани, полученной во время беременности крыс. При анализе данных хроматограмм установлено, что содержание в экстракте белков с молекулярной массой более 70 кДа составляло порядка 30%. Как правило, такие белки являются составной частью цитоскелета клеток, белковой основой миофиламентов и микротрубочек клетки. Белки с молекулярной массой до 70 кДа составляли около 70%. Белки, имеющие молекулярную массу от 20 до 100 кДа, представлены, в основном, белками-ферментами, участвующими в жизнедеятельности клеток и тканей.

Низкомолекулярные белки и пептиды, которые легче 20 кДа, в основном, можно отнести к регуляторным или биологически активным компонентам клеток.

Как видно на рисунке 1, в 21-23-й фракциях криоэкстракта плаценты крыс отмечалось около 22% низкомолекулярных белков (от 3 до 20 кДа). Есть

основания предположить, что в состав этих фракций входят регуляторные пептиды и биологически активные вещества, которые могут оказывать корректирующее действие на структурно-функциональные показатели почек, спровоцированных острой и хронической почечной недостаточностью.

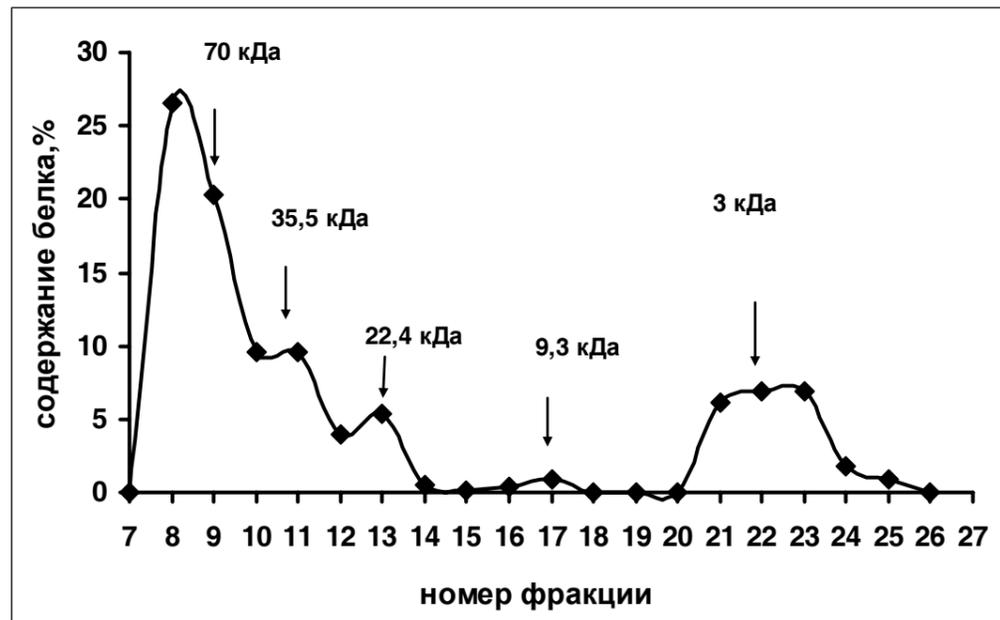


Рисунок 1. Молекулярная масса белков в фракциях криоэкстракта плаценты крыс

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в условиях данной модели у крыс начинает развиваться ХПН спустя 3 недели после введения глицерола и сопровождается стойким нарушением выделительной функции почек, развитием интерстициального нефрита и нефросклероза вплоть до 32 недель наблюдения. Введение криоэкстракта аллогенной плаценты на 2 неделе развития патологии приводило к улучшению функционального и морфологического состояния почек экспериментальных животных и задерживало развитие ХПН до 8-й недели [10, 12, 15]. Целью настоящего исследования было изучить возможность применения криоэкстракта плаценты в комплексе с традиционным медикаментозным лечением ХПН, включающим периферический вазодилататор и блокаду РААС. Мы использовали введение пентоксифиллина, поскольку известно, что он не только улучшает микроциркуляцию, но и подавляет трансформирующий фактор роста- β , тем

самым замедляя фиброзные изменения в почках, а также является эффективным средством для лечения нарушений периферического кровообращения, обусловленных воспалительными процессами [16, 19]. Пентоксифиллин улучшает микроциркуляцию в тканях, прежде всего за счет повышения эластичности и снижения агрегационной активности эритроцитов [18]. Терапия пентоксифиллином снижает уровень провоспалительных цитокинов, например, фактора некроза опухолей (ФНО), некоторых интерлейкинов.

Для медикаментозной блокады РААС мы использовали иАПФ эналаприл, а также К-сберегающий диуретик верошпирон. Важной характеристикой иАПФ является способность снижать внутриклубочковую гипертензию, увеличивать скорость клубочковой фильтрации, натрийуреза и уменьшать калийурез, микроальбуминурию и протеинурию, полиурию, снижать уровень креатинина, мочевины в крови, пролиферации мезангиоцитов и активности провоспалительных цитокинов в почечной ткани, что приводит к удлинению додиализного периода, замедлению развития ХПН. Верошпирон (спиронолактон) является конкурентным антагонистом альдостерона [16, 19].

Анализируя формулу крови и лейкоцитарные индексы экспериментальных животных исследуемых групп, мы сравнили эффект от применения традиционной медикаментозной терапии ХПН с воздействием аллогенного криоэкстракта плаценты, а также от использования комплексного лечения. Интегральные лейкоцитарные индексы позволяют оценить в динамике состояние различных звеньев иммунной системы и неспецифической резистентности организма, не прибегая к специальным методам исследования. Индекс ядерного сдвига (ЯИ) определяет процентное соотношение молодых и зрелых форм нейтрофилов. Лейкоцитарный индекс (Л/НС) отображает соотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИр) – показатель процессов тканевой дегенерации и уровня эндогенной интоксикации, представляет собой соотношение уровня клеток, количество которых возрастает при

воспалительных и гнойных процессах (нейтрофильные лейкоциты – миелоциты, метамиелоциты – юные, палочкоядерные, сегментоядерные), к клеткам, количество которых при этих процессах может уменьшаться (лимфоциты, моноциты, эозинофилы). Возрастание этого показателя свидетельствует о повышении уровня эндогенной интоксикации и активации процессов распада.

Данные эксперимента (таблица 1), в котором использовались различные варианты терапии ХПН (блокада РААС – верошпирон и эналаприл, двойная блокада, введение пентоксифиллина, сочетанное действие блокады и введения криоэкстракта плаценты), свидетельствуют о достаточно хороших результатах (по состоянию периферической крови) при введении криоэкстракта на 2-й неделе развития патологии, а наилучшие показатели выявлены у крыс после двух курсов введения КЭП на фоне развития ХПН. За исключением палочкоядерных нейтрофилов, количество которых снизилось по сравнению с контролем, все другие группы клеток крови находятся в пределах контроля.

Таблица 1.

Показатели лейкоцитарной формулы крови у крыс с ХПН и после различных видов терапии

Группы животных Вид клеток	Норм	КЭП	2 КЭП	Блок. РААС	2Блок РААС	Блок+ КЭП	2Блок+ 2КЭП	Пентоксифиллин	ХПН
Общ. колич., 10⁹/л	3,39 ± 0,23	4,87 ± 0,3*	3,75 ± 0,3	5,95 ± 0,4*	5,36 ± 0,2*	2,71 ± 0,2*	5,07 ± 0,5*	2,52 ± 0,41*	3,44 ± 0,39
Миелоциты	1 ± 0,52	1,67 ± 1,2	0,75 ± 0,48	1,67 ± 1,2	1 ± 0,58	3 ± 1,22*	0,67 ± 0,67	0,33 ± 0,13	1 ± 0,85
Юные	0,17 ± 0,17	1,67 ± 1,04*	1 ± 0,71	0,33 ± 0,33	1,67 ± 0,67*	2,5 ± 1,32*	0,67 ± 0,33*	0 ± 0*	1 ± 0,45*
Палочко-ядерные	2,67 ± 0,61	4,67 ± 2,18	1 ± 0,41*	1 ± 0,58*	2 ± 0,58	1,5 ± 0,87	2 ± 1,15	0,33 ± 0,03*	0,67 ± 0,33*
Сегментоядерные	21,67 ± 1,76	17,33 ± 2,6*	20,5 ± 2,99	24,33 ± 4,25	29,33 ± 2,73*	27,5 ± 6,38	27,67 ± 1,67*	22 ± 2,08	27,83 ± 1,33*
Моноциты	2,5 ± 0,62	7,33 ± 2,6*	2,25 ± 0,63	3 ± 1,15	5,67 ± 1,2*	4,75 ± 1,49*	4 ± 1,15	2 ± 0,58	4,33 ± 1,23
Лимфоциты	69 ± 2,89	62,33 ± 2,96*	72,75 ± 3,47	57,33 ± 4,67*	54 ± 5,13*	54,25 ± 5,85*	54 ± 1*	63,67 ± 4,25	62 ± 3,12*

Эозинофилы	3,67 ± 1,28	5 ± 2,89	1,75 ± 0,75	12,33 ± 4,5*	5,33 ± 0,88	6,5 ± 2,02	11,33 ± 1,2*	11,67 ± 2,96*	3,17 ± 0,87
ЛИИр	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,05	0,31 ± 0,06	0,39 ± 0,11	0,52 ± 0,09*	0,63 ± 0,18*	0,45 ± 0,03*	0,29 ± 0,03	0,44 ± 0,04*
ЯИ	0,28 ± 0,05	1,05 ± 0,6*	0,26 ± 0,1	0,28 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,5 ± 0,23	0,27 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,07
Л/НС	3,34 ± 0,41	3,74 ± 0,5	3,81 ± 0,61	2,54 ± 0,53	1,9 ± 0,35*	2,38 ± 0,6	1,97 ± 0,14*	2,99 ± 0,51	2,26 ± 0,18

Примечание: * - достоверно в сравнении с нормой, p < 0,05.

О снижении интенсивности воспалительного процесса свидетельствуют показатели лейкоцитарного индекса интоксикации (0,34 и 0,31) и ядерного индекса (0,28 и 0,26), которые не отличаются от значений у интактных животных. Можно предположить, что полипептидные комплексы биологически активных веществ, входящие в состав криоэкстракта, могут оказывать нефропротекторное действие при ХПН. Согласно данным литературы, аналогичное действие оказывают полипептидные комплексы почек на функциональное состояние почек у старых крыс [3].

Список литературы

1. Васильев Н.В., Коляда Т.И., Волянский Ю.Л. и др. О возможных механизмах метода терапевтического использования фетальных клеток и тканей: В сб. «Трансплантация фетальных тканей и клеток человека». – М., 1998. – С. 28–30.
2. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54–58.
3. Заморский И.И., Щудрова Т.С., Зеленюк В.Г. и др. Влияние пептидов на морфофункциональное состояние почек у старых крыс. // Успехи геронтологии. – 2018. – Т. 31, № 4. – С. 498-504.

4. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи совр. биол. –1995. – Т.115, Вып. 3. – С .353– 367.
5. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Молнар Е.М. и др. Иммуноцитотерапия. Новое направление в трансплантации фетальных тканей. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – № 4. – С. 412–415.
6. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Малинин В. В. Пептидные тимомиметики. Санкт-Петербург: Наука, 2000.- 156 с.
7. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. / Под. ред. Гольцева А.Н., Юрченко Т.Н.– Харьков: ФОП Бровин А.В., 2013.–318 с.
8. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения Под ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков, 2011. – 268 с.
9. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. – М., 1998.–200 с.
10. Репін М.В., Марченко Л.М., Говоруха Т.П., Строна В.І., Чиж Ю.О. Ультроструктура наднирників щурів з хронічною нирковою недостатністю після терапії кріоекстрактом плаценти на тлі медикаментозної блокади РААС. // Український журн. медицини, біології та спорту. – 2019. – Т.4, №6(22). – 349–355. DOI: 10.26693/jmbs 04.06.349
11. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Докл. АН СССР.– 1979.– №6.– С. 1513–1516.
12. Строна В.І., Репін М.В., Марченко Л.М., Говоруха Т.П., Васькович А.М. Вплив кріоекстракту плаценти різних видів тварин на склад периферійної крові при гострій нирковій недостатності // Експерим. і клінічна медицина. – 2017. – № 3 (76). – С. 21– 25.
13. Сухих Г.Т., Богданова И.М., Малайцев В.В. Иммунологические аспекты клеточной терапии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – № 2. – С. 124 –132.
14. Хавинсон В. Х., Кветной И. М., Южаков В. В. Пептидергическая регуляция гомеостаза. Санкт-Петербург: Наука, 2003.- 196 с.
15. Юрченко Т.Н., Кондаков И.И., Строна В.И. Ренальные эффекты при введении криоэкстракта плаценты на фоне экспериментальной почечной недостаточности // Пробл. криобиол. и криомед. – 2014. – Т. 24, № 1. – С. 75–78.
16. El Nahas AM. Renal scarring: the role of angiotensin II. // Nephrol. Dial Transplant. – 2000. – 10, № 9. – P. 28–32.
17. Harris D.A. Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry.-Washington: IRL Press, 1987 .- P. 49 - 90.
18. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril on cardiovascular events in high-risk patients. // New Engl. J. Med. – 2000. – №342. – P. 145–153.
19. Luno J, Barrio V, Goicoechea MA. et al. Effect of dual blockade of the renin-angiotensin system in primary proteinuric nephropathies. // Kidney Int.- 2002. – 62, № 82. – P. 47–52.

ВОПРОСЫ ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ

УДК 616-008.3/5

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.53

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОСТАЗА ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

Брызгалов Алексей Дмитриевич

курсант, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург

Brutstarfounder@gmail.com

Поляков Алексей Сергеевич

кандидат медицинских наук, профессор, начальник гематологического отделения, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, кафедра факультетской терапии имени С.П. Боткина, гематологическое отделение, г. Санкт-Петербург

doctorpolyakov@gmail.com

Один Виталий Иванович

доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, кафедра факультетской терапии имени С.П. Боткина, г. Санкт-Петербург

OdinVitali@mail.ru

FEATURES OF HEMOSTASIS IN THYROTOXICOSIS

Alexey Bryzgalov

cadet, S.M. Kirov Military medical Academy of the Ministry of defense of the Russian Federation, Saint Petersburg

Alexey Polyakov

candidate of medical Sciences, Professor, head of the Hematology Department, S.M. Kirov Military medical Academy of the Ministry of defense of the Russian Federation, Department of faculty therapy named after S.p. Botkin, HematologyDepartment, Saint Petersburg

Vitaly Odin

doctor of medical Sciences, Professor, S.M. Kirov Military medical Academy of the Ministry of defense of the Russian Federation, Department of faculty therapy named after S. p. Botkin, Saint Petersburg

АННОТАЦИЯ

Патология щитовидной железы клинически проявляется в виде различных нарушений гомеостаза. Внимания заслуживает связь между фундаментальной ролью печени в метаболических процессах и патологией щитовидной железы как органа эндокринной системы. Наряду с явными клиническими проявлениями тиреотоксикоза стоит обратить внимание на лабораторные изменения в коагулограмме, которые обусловлены поражением печени. Несмотря на редкость клинически значимых случаев поражения печени при гипертиреозе, многие ученые из разных стран не могут прийти к единому мнению о механизмах нарушения свертывающей способности крови у таких пациентов. Проблемы свертывания крови у больных с нарушением функции щитовидной железы остаётся актуальной и по сей день.

ABSTRACT

Pathology of the thyroid gland is clinically manifested in the form of various homeostasis disorders. The connection between the fundamental role of the liver in metabolic processes and the pathology of the thyroid gland as an organ of the endocrine system deserves attention. Along with the obvious clinical manifestations of thyrotoxicosis, you should pay attention to laboratory changes in the coagulogram, which are caused by liver damage. Despite the rarity of clinically significant cases of liver damage in hyperthyroidism, many scientists from different countries can not agree on the mechanisms of blood clotting disorders in such patients. Problems of blood clotting in patients with impaired thyroid function remain relevant to this day.

Ключевые слова: гемостаз; тиреотоксикоз; гипертиреоз; свёртывание крови; гиперкоагуляция; гормоны щитовидной железы; факторы свёртывания.

Keywords: hemostasis; thyrotoxicosis; hyperthyroidism; blood clotting; hypercoagulation; thyroid hormones; clotting factors.

Уровень тиреоидных гормонов - фактор, влияющий на свертывающую систему крови. Большое внимание уделяется увеличению клиренса большинства факторов гемостаза и снижению фибринолитической активности у больных тиреотоксикозом и гипертириозом. Щитовидная железа - это контролируемая гипоталамо-гипофизарной системой железа внутренней секреции, синтезирующая гормоны трийодтиронин (Т3) и тетрайодтиранин (Т4). При снижении концентрации тиреоидных гормонов под действием протеазы лизосом происходит высвобождение Т3 и Т4 [8, с. 505]. Гормоны связываются с ядерными рецепторами тиреоидных гормонов и активируют или подавляют транскрипцию гена. Освободившиеся гормоны поступают в кровь и связываются с транспортными белками - глобулином и альбумином [4, с. 325]. Гормоны щитовидной железы влияют на основной уровень метаболизма в результате воздействия на углеводный, белковый и липидный обмен, активность Na⁺/K⁺ - каналов и термогенез. По данным литературы, нарушения коагуляции (свертывания) и фибринолиза при дисфункциях ЩЖ являются следствием прямого воздействия тиреоидных гормонов на синтез различных гемостатических ферментов, а аутоимунные процессы в самой ЩЖ могут влиять на вторичный гемостаз [12, с. 722]. О связи свертываемости крови и заболеваний ЩЖ известно еще в начале прошлого века. В 1913 г. Kaliebe описал случай церебрального венозного тромбоза у пациента с гипертиреозом, впервые связав эти заболевания [7, с. 4471]. Частым осложнением тиреотоксикоза является фибрилляция предсердий и острый ишемический инфаркт головного мозга.

Гемостаз — это совокупность реакций, направленный на остановку кровотечения и/или восстановления кровотока при повреждении сосудистой стенки. Нормальное состояние кровотока обеспечивается динамическим равновесием между свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической системами. Различают сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз [14, с. 2303]. Суть последнего заключается в

образовании прочного фибринового тромба за счет перехода растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин. В процессе принимают участие факторы XII, XV, XIV, XI, VIII, IV, V, X [1, с. 350]. Через 2—3 ч тромб сжимается и стягивает края раны. Одновременно с началом ретракции кровяного сгустка начинается его рассасывания под воздействием фиброплазмина. Большинство плазменных факторов свертывания крови образуется в печени под воздействием витамина К. Установлено, что длительное повышение активности тиреоидных гормонов характеризуется значительным потреблением зависимых от витамина К факторов свертывания крови II, VII, X [11, с. 479]. В результате у пациентов с ТТ развивается коагулопатия потребления. Доказана связь между низким уровнем Т3 с функцией тромбоцитов у пациентов с нефротическим синдромом (НС). Основным механизмом снижения циркулирующего Т3 является снижение активности фермента 5'-монодеиодиназы, который преобразует Т4 в Т3 [13, с. 2804]. Исследования показали, что 24-часовой белок мочи у пациентов со сниженным Т3 был выше, а сывороточный альбумин - ниже. За счет снижения концентрации Т3 снижается катаболизм белка, что приводит к снижению базальной скорости метаболизма. Такие пациенты имели аномальную активацию и повышенную агрегацию тромбоцитов [15, с. 433]. Избыток гормонов щитовидной железы в крови вызывает резкое ускорение обмена веществ и приводит к диспропорции между кровоснабжением и метаболическими затратами во внутренних органах. У пациентов с тиреотоксикозом в участках наиболее выраженной гипоксии в печени возникает некроз и фиброз гепатоцитов, который приводит к прогерссирующему внутриторганному нарушению гемодинамики. Формируется печеночная недостаточность, степень тяжести которой зависит в том числе и от процентного снижения печеночного кровотока. Печень играет немаловажную роль в поддержании гомеостаза в организме, а её поражение характеризуется нарушением белково-синтетической функции с изменениями во всех фазах гемостаза. Снижение синтеза прокоагулянтных белков II, VII, IX, X, а также

фактора V и фактора XI непосредственно влияют главным образом на ПТ, МНО и в меньшей степени на активированное частичное тромбопластиновое время [3, с. 155]. Уровень циркулирующих тромбоцитов в крови снижается в результате их сниженной продукции и коротким периодом полувыведения из-за спленомегалии, но может и находится на нижней границе нормы. Гипопротеинемия и гипоальбуминемия обусловлена недостаточностью функции печени. Удлинение АЧТВ отражает дефицит плазменных факторов (кроме VII и XIII) и наблюдается при их значительном (ниже 25—10 %) снижении и указывает на преобладание гипокоагуляции [5, с. 235]. Нарушение показателей АЧТВ при нормальном протромбиновом и тромбиновом времени наблюдается только при дефиците или ингибции факторов VIII, IX, XI, XII, также прекалликреина и высокомолекулярного кининогена. Из этих форм патологии наиболее часто встречаются и сопровождаются выраженной кровоточивостью дефицит и/или ингибция факторов VIII и IX, также дефицит фактора Виллебранда [10, с. 60]. Активность ГГТП является признаком гепатотоксичности и положительна в 90 % случаев заболеваний печени [9, с. 1279]. Этот фермент более чувствителен к нарушениям в клетках печени, чем АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, СДГ, ГлДГ и т.д. Увеличение содержания билирубина в крови может обуславливаться поражением паренхимы печени с нарушением ее билирубинвыделительной функции, нарушением печеночной секреции конъюгированного (прямого) билирубина в желчь [16, с. 2064]. На основании содержания протромбина можно судить о функциональном состоянии печени. Уровень содержания протромбина или его функциональная полноценность снижается при эндо- и экзогенной недостаточности витамина К, что наблюдается при тяжелых поражениях печени и желудочно-кишечного тракта [2, с. 223]. Отмечаются и врожденные дефекты фактора II. Непрямые антикоагулянты снижают содержание фактора II в крови за счет угнетения его синтеза. Время свертывания крови нарушается лишь при концентрации протромбина ниже 40 % [10, с. 51]. Минимальный уровень активности протромбина в крови для выполнения операций — 20—40 %, при более низком

содержании риск развития послеоперационных кровотечений чрезвычайно велик [18, с. 1133]. На самом деле, есть сильные данные *in vitro*, показывающие, что в присутствии адекватного количества тромбоцитов и тромбомодулина, эндотелиального производного кофактора в антикоагулянтной системе, больные циррозом имеют нормальную способность генерировать тромбин и основные строительные блоки фибриновой сетки [17, с. 156]. Причина этого нормального свертывающего потенциала в значительной степени обусловлена снижением синтеза мощного антикоагулянтного белка С в сочетании с повышенным эндотелиальным фактором VIII. Система коагуляции находится под непосредственным влиянием гормонов ЩЖ. Дисфункция ЩЖ влияет на баланс между коагуляцией и фибринолизом, увеличивая риск развития тромбозов при гипертиреозе и кровотечений при гипотиреозе. Несмотря на наличие тиреотоксикоза и поражением печени, существующие компенсаторные механизмы стабилизируют систему свертывания крови. Синтетическая дисфункция и нарушенное производство белка происходят в прокоагулянтных и в антикоагулянтных белках, тем самым уравновешивая друг друга. Это компенсаторное восстановление равновесия позволяет пациентам даже с прогрессирующим заболеванием печени оставаться в относительно сбалансированном состоянии гемостаза.

Список литературы

1. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with hyperthyroidism/ C.Erem, H.Ö.Ersoz, S.S.Karti [et al.] // Journal Endocrinological Investigation. -2002. - № 25 (4). - С. 350.
2. Effects of the hormones of the thyroid axis on the vitamin K-dependent plasma factors of blood coagulation (II, VII, IX and X)/ N.N.Negrev, R.Z.Radev, M.S.Velikova, A.Anogeianaki // International Journal of Immunopathology and Pharmacology.- 2008.- № 21.- С. 223.

3. Endothelial function in patients with hyperthyroidism before and after treatment with propranolol and thiamazole/ J.Burggraaf, S.Lalezari, J.J.Emeis [et al.] // Thyroid. -2001.- № 11 (2).- С.155.
4. Erem C. Blood coagulation, fibrinolytic activity and lipid profile in subclinical thyroid disease: subclinical hyperthyroidism increases plasma factor X activity // Clinical Endocrinology. - 2006.- № 64.- С. 325.
5. Hemostasis imbalance in liver cirrhosis on the Pugh-scored scale: characteristic changes in plasma levels of protein C in comparison with protein S/ M.de Caterina, G.Tarantino, S.Farina [et al.] // BMJ Journals. - 2013. -23.- С. 235.
6. Increased levels of von Willebrand factor in cirrhosis maintain platelet adhesion, despite a decrease in their functional ability/ T.Lisman, N.Bongers, J. Adelmeijer [et al.] // Journal of Hepatology. - 2006.- № 44. - С. 60.
7. Is thyroid hormone suppression therapy prothrombotic/ M.K.Horne, K.K.Singh, K.G.Rosenfeld [et al.] // Journal Clinical Endocrinology and Metabolism. 2004. № 9. С. 4471.
8. Klein I., Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system // New England Journal of Medicine. - 2001. -№ 344. - С. 505.
9. Positive anti-mitochondrial antibody, but normal alkaline phosphatase:is this primary biliary cirrhosis?/ H.C.Mitchison, M.F.Bassendine, A.Hendrick [et al.] // Hepatology AASLD. -1986. - № November/Dezember 6.- С. 1279.
10. Problems of anticoagulation with warfarin in hyperthyroidism/ H.A.Kellett, J.S.Sawers, F.E. Boulton [et al.] // Journal of Clinical Medicine. -2016. - 58. - С. 51.

11. TGF- β 1 platelet deficiency reduces liver fibrosis in a mouse model of liver damage/ S.Gafoory, R.Varshney, T.Robison [et al.] // Blood ADV. -2018.- 2. -С. 479.
12. Thyroid disease and increased cardiovascular risk/ M.J.Nyirenda, D.N.Clark, A.R.Finlayson [et al.] // Mary Ann Liebert, Inc. Thyroid. -2005. -№ 15 (7).- С. 722.
13. Thyroid hormone receptordependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins/ C.H.Shih, S.L.Chen, C.C.Yen [et al.] // Endocrinology. -2004. - Volume 145, issue 6. -С. 2804.
14. Thyroid diseases and cerebrovascular disease/ A.Squizzato, V.E.A Gerdes, D.P.M. Brandjes [et al.] // Thyroid. -2005.- 36.- С. 2303.
15. Thyrotoxicosis causing arterial and venous thrombosis/ A.Lodha, M.Haran, R.Frankel, J.Shani // The American Journal of the Medical Sciences. -2009.- № 338 (5). -С. 433.
16. Tripodi A. Hemostasis in chronic liver diseases // Journal of Thrombosis and Haemostasis. -2006.- 4.- С. 2064.
17. Tripodi A. and Mannucci,P. M. Coagulopathy in chronic liver diseases // The New England Journal of Medicine. -2011. -365. -С. 156.
18. Von Willebrand factor levels predict clinical outcome in patients with cirrhosis and portal hypertension/ V.La Mura, J.C.Reverter, A.Flores-Arroyo [et al.] // BMJ Journals. - 2011.- № 60. - С. 1133.

УДК: 618.177-089.888.11:575.174.015.3:616.151

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.39

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Киселева Анастасия Николаевна

*младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
kiseleva@niigpk.ru*

Бутина Елена Владимировна

*кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
butinalena@yandex.ru*

Попонина Елена Александровна

*кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
senkina.elena@rambler.ru*

Игнатьев Сергей Викторович

*кандидат медицинских наук, руководитель научно-клинического отдела, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
ignatiev@niigpk.ru*

POLYMORPHISM OF GENES OF THE HEMOSTASIS SYSTEM AND THE EFFECTIVENESS OF IN-VITRO FERTILIZATION

Anastasiya Kiseleva

junior researcher of laboratory of cellular and molecular immunology, the Federal State-Financed scientific institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Elena Butina

candidate of medical sciences, head of laboratory of immunohematology, the Federal State-Financed scientific institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

butinalena@yandex.ru

Elena Poponina

candidate of medical sciences, research scientist of laboratory of immunohematology, the Federal State-Financed scientific institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

senkina.elena@rambler.ru

Sergey Ignatyev

candidate of medical sciences, head of scientific and clinical department, the Federal State-Financed scientific institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

Представлены данные о частоте выявления аллельных вариантов генов системы гемостаза (*F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A, F7: 10976 G>A, F13: 103 G>T, FGB: -455 G>A, ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G*) у женщин с неэффективными циклами экстракорпорального оплодотворения.

ABSTRACT

Data on the prevalence of allelic variants genes of the hemostasis system (*F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A, F7: 10976 G>A, F13: 103 G>T, FGB: -455 G>A,*

ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G) in women with ineffective in-vitro fertilization cycles are presented.

Ключевые слова: аллельные варианты генов; экстракорпоральное оплодотворение; гемостаз; полиморфизм; бесплодие.

Keywords: allelic variants of genes; in vitro fertilization; hemostasis; polymorphism; infertility.

В настоящее время актуальной медицинской проблемой является бесплодие супружеских пар [5, с. 5; 1, с. 307; 9, с. 52; 17, с. 548]. Оно характеризуется отсутствием беременности у женщины детородного возраста в течение одного года регулярной половой жизни без использования контрацептивных средств. По данным литературы, частота инфертильных брачных союзов колеблется от 8,0% до 17,5% и с каждым годом увеличивается [5, с. 5; 1, с. 307; 3, с. 8; 7, с. 73]. Большие надежды при лечении бесплодия возлагаются на вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) [18, с. 554], но эффективность этих методов составляет 38-40% [2, с. 7].

Беременность, начиная с ранних сроков, считается тромбофилическим состоянием, при котором происходит повышение в плазме крови уровня ряда прокоагулянтных белков: факторов свертывания крови XII, X, IX, VIII, V, VII, фактора Виллебранда и фибриногена, угнетение фибринолитической активности и снижение содержания естественных антикоагулянтов [9, с. 53; 10, с. 5; 6, с. 225]. В свою очередь, нарушения в системе гемостаза являются факторами риска многих акушерских осложнений плацентарного происхождения - мертворождение, задержка внутриутробного роста плода, тяжелая преэклампсия и отслойка плаценты [4, с. 25; 8, с. 28; 14, с. 10488]. Развитие этих патологий вероятно связано наличием мутаций в генах - генетическими полиморфизмами, которые могут быть нормальными и мутантными. По данным E. Rey (2003) и F. Larina (2016), мутации в генах F2, F5 и MTHFR ассоциированы с наследственной тромбофилией [19, с. 901; 16, с. 187]. Известно, что врожденные дефекты гемостаза могут являться одной из

причин различных сосудистых осложнений, приводящих к нарушению имплантации или развития зародыша [10, с. 8]. По мнению F. Azem (2004) и H. Qublan (2006), генетически обусловленная тромбофилия увеличивает риск возникновения повторных имплантационных неудач при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [15, с. 368; 11, с. 2694]. Однако E. Vaquero (2006) и B. Ata (2016) не установили корреляции между наличием мутаций в генах системы гемостаза и эффективностью ЭКО [13, с. 79; 12, с. 1309].

Таким образом, актуальность представленной работы обусловлена высокой востребованностью исследований полиморфизма генов гемостаза при определении причин репродуктивных нарушений и отсутствием однозначного мнения относительно влияния мутаций этих генов на результаты ВРТ.

Цель. Охарактеризовать полиморфизм генов системы гемостаза у женщин с различными результатами экстракорпорального оплодотворения.

Материалы и методы. Оценка аллельных вариантов генов системы гемостаза выполнена у 219 женщин, прибегнувших к процедуре ЭКО. На основании данных акушерско-гинекологического анамнеза пациенток распределили на несколько групп:

- 1 – с одним неэффективным циклом ЭКО (n=61);
- 2 – с двумя неэффективными циклами ЭКО (n=58);
- 3 – с тремя и более неэффективными циклами ЭКО (n=80);

В группу сравнения включили женщин с одной и более успешно завершёнными процедурами ЭКО (n=20).

Определение аллельных вариантов генов системы гемостаза (*F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A, F7: 10976 G>A, F13: 103 G>T, FGB: -455 G>A, ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G*) осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с наборами «КардиоГенетика Тромбофилия» на детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Статистическую обработку данных выполняли с помощью критерия χ^2 .

Результаты. Распределение полиморфных генов системы гемостаза у обследованных женщин представлено в таблице.

Статистически значимые различия в частоте встречаемости генов системы гемостаза (*F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A, F7: 10976 G>A, F13: 103 G>T, FGB: -455 G>A, ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G*) у женщин с одной, двумя, тремя и более неэффективными циклами ЭКО и в группе сравнения не выявлены. Зачастую в клинической практике врачи направляют женщин после неудачных попыток ЭКО для обследования на наличие врожденных дефектов гемостаза, но, по нашим данным, роль этого исследования переоценена. В проведенном исследовании отсутствие значимых различий в частоте распределения мутантных генов наследственной тромбофилии – F2 и F5, вероятно связано с низкой частотой их встречаемости. Кроме того, мутантный аллель А гена F2 во всех рассматриваемых группах был обнаружен у 4 женщин, F5 – у 2. Поэтому считаем, что ввиду недостаточной встречаемости указанных мутаций среди обследованных, оценить их влияние на результативность ЭКО не представляется возможным. Тем не менее, женщинам-носителям мутаций в генах тромбофилии следует уделять повышенное внимание.

Таблица.

Частота встречаемости генов системы гемостаза (%) у женщин с различной эффективностью экстракорпорального оплодотворения

Полиморфизмы	Генотипы	Исследованные группы			
		Группа сравнения (n=20)	1 группа (n=61)	2 группа (n=58)	3 группа (n=80)
F2:20210 G>A	G/G	90,0	93,4	95,0	96,6
	G/A+ A/A	10,0	6,6	5,0	3,4
F5:1691 G>A	G/G	90,0	96,7	94,7	96,6

	G/A+ A/A	10,0	3,3	5,3	3,4
F7:10976 G>A	G/G	70,0	78,3	73,7	77,8
	G/A+ A/A	30,0	21,7	26,3	22,2
F13:G>T	G/G	45,0	50,8	48,6	50,0
	G/T+ T/T	55,0	49,2	51,4	50,0
FGB:-455 G>A	G/G	45,0	54,1	50,0	58,3
	G/A+ A/A	55,0	45,9	50,0	41,7
ITGA2:807 C>T	C/C	36,8	38,3	33,3	31,4
	C/T+T/T	63,2	61,7	66,7	68,6
ITGB3:1565 T>C	T/T	65,0	67,2	68,4	59,7
	T/C+C/C	35,0	32,8	31,6	40,3
PAI-1:-675	5G/5G	20,0	16,4	15,8	13,9
5G>4G	5G/4G+4G/4G	80,0	83,6	84,2	86,1

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния мутаций генов системы гемостаза (*F7: 10976 G>A, F13: 103 G>T, FGB: -455 G>A, ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G*) на результативность процедуры ЭКО. Ввиду низкой встречаемости мутантных аллелей генов *F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A* достоверность их возможного участия в неэффективных попытках ЭКО оценить не удалось.

Список литературы

1. Абашидзе А.А. Социальные проблемы бесплодия // Материалы VI Регионального научного форума «Мать и дитя», 26-28 июня 2012 г. – Москва: МЕДИ Экспо, 2012. – С. 307-308.
2. Амирова А.А. Прогнозирование исходов ЭКО и ЭКО/ИКСИ у бесплодных супружеских пар при некоторых формах бесплодия: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.01 / Амирова Айтен Агашириновна. – Москва, 2011. – 25 с.

3. Апресян С.В., Абашидзе А.А., Аракелян В.Ф. Медико-психологические аспекты бесплодия // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2013. – Т. 7, №1. – С. 8-10.

4. Ассоциация полиморфизма генов *F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR, MTR, MTRR* с нарушениями репродуктивной функции у женщин / А.Н. Киселева, Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева [и др.] // Вятский медицинский вестник. – 2017. – №2 (54). – С. 24-29.

5. Воробьева Е.В. Дифференциальный алгоритм обследования бесплодных супружеских пар // Проблемы женского здоровья. – 2011. – Т. 6, №3. – С. 5-13.

6. Генетические полиморфизмы, ассоциированные с риском развития тромбофилии, у женщин с привычным невынашиванием беременности / Д.Н. Ярыгин, С.В. Игнатъев, Е.В. Бутина [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 55-летию института «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины», 6-7 октября 2015 г. – Киров: Аверс, 2015. – С. 225-227.

7. Минайчева Л.И., Брагина Е.Ю., Жалсанова И.Ж. Ассоциация генетических маркеров целиакии с репродуктивными нарушениями // Альманах клинической медицины. – 2019. – Т. 47(1). – С. 72-82.

8. Подзолкова Н.М., Колода Ю.А., Даньшина В.А. Роль тромбофилии у пациенток с неудачами ВРТ в анамнезе // Проблемы репродукции. – 2014. – №6. – С. 28-34.

9. Роль генетических полиморфизмов, ассоциированных с тромбофилией, протромботическими состояниями и нарушениями фолатного цикла, у женщин

с репродуктивными расстройствами / А.Н. Киселева, Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева, [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – №2(70). – С. 52-57.

10. Шостак Д.П. Исследование генов системы гемостаза у беременных европейской популяции // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – 2. – С. 5-12.

11. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure / H.S. Qublan, S.S. Eid, H.A. Ababneh [et al.] // Hum Reprod – 2006. – Vol. 21 (10). – P. 2694-2698.

12. Ata B., Urman B. Thrombophilia and assisted reproduction technology—any detrimental impact or unnecessary overuse? // J Assist Reprod Genet. – 2016. – Vol. 33 (10). – P. 1305-1310.

13. Diagnostic evaluation of women experiencing repeated in vitro fertilization failure / E. Vaquero, N. Lazzarin, D. Caserta [et al.] // European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Technology. – 2006. – Vol. 125(1). – P. 79-84.

14. Genetic and biochemical thrombosis risk markers in pregnancy. II. Homocystein metabolism / A. Filipescu, C. Ionescu, A. Cosmin [et al.] // Romanian Biotechnological Letters. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 10486-10495.

15. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures / F. Azem, A. Many, I. Ben Ami [et al.] // Hum Reprod. – 2004. – Vol. 19. – P. 368–370.

16. Inflammation and trombophilia in pregnancy complications: implications for risk assessment and clinical management / F. Larina, V. Raparelli, I. Napoleone [et al.] // Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets. – 2016. – Vol. 15, №3. – P. 187-203.

17. Kuperman A., Micco P., Brenner B. Fertility, infertility and thrombophilia // Women's Health (long Engl). – 2011. – Vol. 7, N5. – P.545-553

18. Malina A., Pooley J.A. Psychological consequences of IVF fertilization (Review of research) // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2017. – Vol. 24, N4. – P. 554-558.

19. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis / E. Rey, S.R Kahn, M. David [et al.] // Lancet. – 2003. – Vol. 361 (9361). – P. 901–908.

УДК 616-092.19

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.53, 76.29.33

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА И ТРОМБОЦИТОВ
ПРИ ТРОМБООБРАЗОВАНИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Лянгузов Алексей Владимирович

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

dedalex@bk.ru

Игнатьев Сергей Викторович

кандидат медицинских наук, руководитель научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ignatyev@niigpk.ru

Ковтунова Марина Евгеньевна

кандидат медицинских наук, доцент, ученый секретарь ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kovtunova@niigpk.ru

Воробьев Константин Анатольевич

доктор биологических наук, заместитель директора по науке ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

vorobiev@niigpk.ru

PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF INTERACTION OF WILLEBRAND FACTOR AND PLATELETS IN THROMBOSIS

Aleksey Lyanguzov

candidate of medical Sciences, senior researcher of the scientific and clinical Department, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Sergey Ignatyev

candidate of medical sciences, head of scientific and clinical department, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Marina Kovtunova

candidate of medical Sciences, associate Professor, scientific Secretary, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Konstantin Vorobyov

doctor of biology, Deputy Director for research, the Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

АННОТАЦИЯ

Способность тромбоцитов обеспечивать защиту сосудов при травматическом повреждении является важнейшим физиологическим феноменом. Для формирования тромбов, в особенности в сосудах с высокой скоростью кровотока, необходимо присутствие фактора фон Виллебранда (vWF). Взаимодействие тромбоцитов с vWF должно происходить

своевременно. Понимание роли vWF в тромбообразовании позволяет искать пути коррекции связанных с ним геморрагических и тромботических состояний. Ингибирование активности vWF может быть новым инструментом профилактики тромбозов при атеросклеротических поражениях сосудов.

ABSTRACT

The platelet's ability to provide vascular protection in traumatic injury is an essential physiological phenomenon. The formation of platelet thrombi, especially in arteries, requires the presence of von Willebrand factor (vWF). It is important that vWF-platelet interactions occur timely. Understanding the role of vWF in thrombus formation allows to correct hemorrhagic and thrombotic conditions, associated with vWF. Inhibition of vWF activity may be a new tool for the prevention of thrombosis in atherosclerotic vascular lesions.

Ключевые слова: фактор Виллебранда, тромбоциты, ADAMTS 13, регуляция тромбообразования.

Keywords: von Willebrand factor, platelets, ADAMTS 13, regulation of thrombosis.

Способность циркулирующих в крови тромбоцитов осуществлять защиту целостности сосудов является важнейшим механизмом выживания организма. Фиксируясь к поврежденной сосудистой поверхности, а также к обнаженным субэндотелиальным структурам, тромбоциты вносят значительный вклад в процессы, приводящие к остановке кровотечения при травматическом повреждении тканей [4,2]. После прикрепления в месте повреждения сосудистой стенки кровяные пластинки активируются и начинают взаимодействовать с другими клеткам крови. Прикрепление тромбоцитов к структурам сосудистой стенки (адгезия), друг к другу (агрегация) или к иным клеткам крови – это различные аспекты одного и того же фундаментального биологического процесса – тромбообразования [18]. Важнейшую роль при этом играет фактор фон Виллебранда (vWF), который представляет собой адгезионный мультимерный белок, действующий как молекулярный мостик

между субэндотелиальной матрицей и комплексом рецептора гликопротеина Ib/IX/V тромбоцитов. Особенно важна роль vWF в процессе адгезии тромбоцитов в условиях высоких скоростей сдвига, которые свойственны току крови в артериальных сосудах [19]. Кроме этого, vWF способствует увеличению тромбоцитарной пробки путем сшивания пластинок между собой посредством связывания с GPIb/IIIa. Адгезия тромбоцитов в сосудах с высокой скоростью кровотока ограничивается большей силой, вызывающей разрыв образовавшихся связей. В физиологических условиях самые высокие значения скорости сдвига регистрируются в артериолах. Функция vWF состоит в том, чтобы противостоять этим неблагоприятным факторам и инициировать адгезию тромбоцитов в местах повреждения с быстро текущей кровью [16,20].

Опосредованное vWF привлечение тромбоцитов в место повреждения инициируется взаимодействием между vWF и компонентами субэндотелиального матрикса, такими как коллаген, которые обнажаются в поврежденной стенке сосуда [17]. После контакта vWF с коллагеном в нем происходит открытие сайта связывания с тромбоцитами (домен A1).

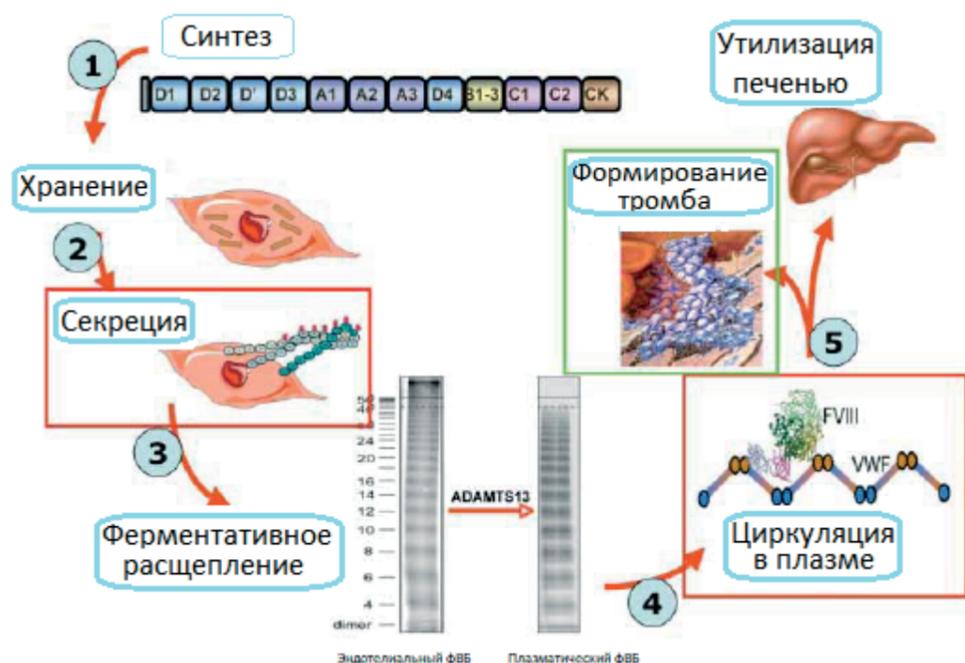


Рисунок 1. Жизненный цикл vWF и его взаимодействие с тромбоцитами
 В рамках обозначены этапы жизненного цикла vWF, на которых возможно развитие патологических состояний

Большая часть циркулирующего vWF синтезируется в эндотелиальных клетках в виде мультимеров, которые могут содержать до 50 ковалентно связанных субъединиц. Хранится синтезированный фактор в эндотелиальных гранулах (тельца Вейбеля-Палада), откуда он поступает в кровоток. В обычных условиях vWF секретируется в незначительных количествах. При стимуляции эндотелиальных клеток в кровоток поступает значительно большее количество данного фактора. Стимулированная секреция приводит к быстрому образованию «струн», длина которых может достигать нескольких сотен микрометров [10,25]. С помощью электронной микроскопии высокого разрешения выявлено, что «струны» состоят из нескольких мультимеров vWF, собранных в витые пучки и сети [10]. Одним из свойств таких пучков vWF является то, что они представляют собой эффективную адгезивную платформу для тромбоцитов [3,14,8].

Кровь, движущаяся в сосуде, подвергается воздействию так называемого напряжения сдвига, которое зависит от ее вязкости и скорости. Под действием напряжения сдвига молекула vWF, будучи прикрепленной к поверхности эндотелия после секреции, частично разворачивается. Это приводит к раскрытию доменов A1 vWF и возможности фиксации к ним кровяных пластинок. Одновременно vWF становится чувствительным к расщеплению металлопротеазой ADAMTS 13 [28]. Следует отметить, что такой протеолиз облегчается, когда молекула фактора покрыта тромбоцитами [22].

У здоровых людей значительная часть циркулирующих высокомолекулярных мультимеров vWF утилизируется в печени. У пациентов со сниженной активностью ADAMTS 13 часто наблюдается увеличение размеров циркулирующих мультимеров [24,9]. Присутствие таких сверхбольших молекул vWF в кровотоке потенциально опасно возможностью образования тромбоцитарных тромбов, которые способны окклюзировать микроциркуляторное русло – патологическим состоянием, известным как тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) [11].

Помимо протеолиза ADAMTS 13 ограничивает возможность образования спонтанных связей тромбоцитов и vWF. Механизм, посредством которого осуществляется такое ограничение, до конца не ясен. Предполагается, что после высвобождения фактора с поверхности эндотелия уменьшается действующее на него напряжение сдвига. Молекула vWF претерпевает конформационные изменения и приобретает глобулярную форму, экранируя домены A1 и ограничивая доступ к ним тромбоцитов [26]. Обнаружено, что эта молекула имеет закрытую глобулярную конфигурацию при низких скоростях сдвига и открытую растянутую – при высоких.

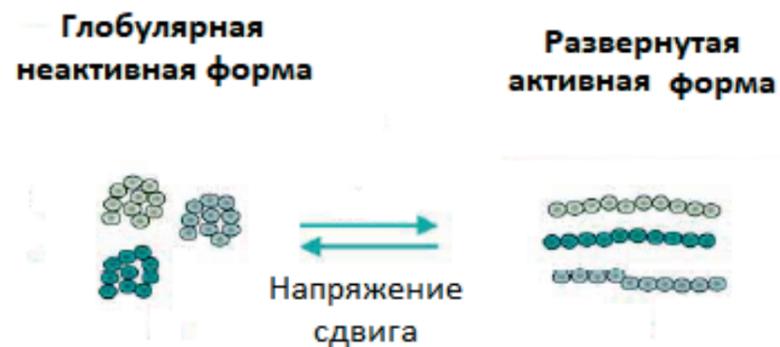


Рисунок 2. Конформационные изменения структуры vWF в кровотоке под действием напряжения сдвига

Важно, что зависящие от напряжения сдвига конформационные изменения являются полностью обратимыми [21].

Представленные механизмы, необходимые для обеспечения нормального гемостаза, могут стать причиной заболевания, связанного с нарушением кровоснабжения жизненно важных органов, таких как сердце и мозг, приводя к фатальным последствиями. В процессе роста атеросклеротических бляшек происходит ограничение просвета артерии и, как следствие, локальное увеличение скорости кровотока, а также напряжения сдвига и нарушение ламинарности потока. В области стеноза скорость сдвига может достигать

20000–40000 c^{-1} [12,23,27]. При нарушении целостности бляшки растянутая конформация vWF, образовавшаяся вследствие увеличения скорости потока крови, фиксируется на обнажившихся субэндотелиальных структурах, являясь «якорем» для других клеточных и плазменных компонентов системы гемостаза, что способствует развитию тромбоза. Определенную роль в этом процессе играет увеличение количества тромбоцитарных микровезикул, обладающих выраженной прокоагулянтной активностью. Их образование также обусловлено взаимодействием vWF с рецептором GPIb в условиях напряжения сдвига [13,1].

В физиологическом состоянии тромбоциты и vWF находятся в циркуляции, не взаимодействуя друг с другом до определенного момента, что препятствует самопроизвольной окклюзии сосудов. Исследования последних десятилетий свидетельствуют о том, что для предотвращения избыточного сродства vWF и кровяных пластинок существуют различные регуляторные механизмы. Регуляция может осуществляться на уровне рецепторного комплекса GPIb-IX-V посредством модуляции взаимодействия с цитоскелетными белками, такими как филамин А и 14–3–3(zeta) [8,5]. На уровне телец Вейбеля-Палада коррекция активности vWF осуществляется при помощи белков-шаперонов, в роли которых выступают Р-селектин, интерлейкин-8 и остеопротегерин [15]. Эти белки, присутствующие в эндотелиальном цитозоле, способны связываться с доменом A1, уменьшая взаимодействие vWF и тромбоцитов.

Выявлено ингибирование взаимодействия vWF с тромбоцитами в присутствии ионов Mg^{2+} , зависящее от концентрации последних. Кроме того, в эксперименте показано, что количество сверхбольших «струн» vWF снижалось в два раза в присутствии незначительных концентраций MgSO_4 . Эти данные показывают, что локальные изменения концентрации Mg^{2+} могут влиять на адгезию тромбоцитов к недавно секретированному vWF [6].

Таким образом, прогресс, достигнутый в изучении роли vWF в гемостазиологии, позволяет искать пути коррекции патологических отклонений тромбообразования. Связь риска развития тромбозов с уровнями ADAMTS13 и

vWF позволяет предположить, что их определение поможет прогнозировать тромботические события. Ингибирование активности vWF может быть новым инструментом профилактики тромбозов и ишемических заболеваний.

Список литературы

1. Игнатъев С.В., Лянгузов А.В. Функциональная роль микровезикул в норме и при патологии // Клиническая физиология кровообращения. – 2019. – №4. – С. 261-266.
2. Применение криоконсервированного концентрата тромбоцитов при глубокой тромбоцитопении/ А.В.Лянгузов, С.В.Игнатъев, Ф.С.Шерстнев [и др.] // Трансфузиология. – 2020. – № 1. – С. 20-30.
3. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins/ P.Andre, C.V.Denis, J.Ware [et al.] // Blood. – 2000. – № 96. – P. 3322–3328.
4. Clemetson K.J. Platelets and primary haemostasis // Thromb. Res. – 2012. – № 129. – P. 220–224.
5. A critical role for 14–3–3zeta protein in regulating the vWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications/ K.Dai, R.Bodnar, M.C.Berndt [et al.] // Blood – 2005. – № 106. – P. 1975–1981.
6. Magnesium maintains endothelial integrity, up-regulates proteolysis of ultra-large von Willebrand factor, and reduces platelet aggregation under flow conditions/ J.F.Dong, M.A.Cruz, K.Aboulfatova [et al.] // Thromb. Haemost. – 2008. – № 99. – P. 586–593.

7. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions/ J.F.Dong, J.L.Moake, L.Nolasco [et al.] // Blood. – 2002. – № 100. – P. 4033–4039.

8. Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha regulates von Willebrand factor-induced platelet activation/ S.Feng, J.C.Resendiz, X.Lu [et al.] // Blood. – 2003. – № 102. – P. 2122–2129.

9. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura / M.Furlan, R.Robles, M.Solenthaler [et al.] // Blood. – 1998. – № 91. – P. 2839–2846.

10. Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress / J.Huang, R.Roth, J.E.Heuser [et al.] // Blood. – 2009. – № 113. – P. 1589–1597.

11. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura/ G.G.Levy, W.C.Nichols, Lian [et al.] // Nature. – 2001. – № 413. – P. 488–494.

12. Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis/ A.Mailhac, J.J.Badimon, J.T.Fallon [et al.] // Circulation. – 1994. – № 90. – P. 988–996.

13. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles/ Y.Miyazaki, S.Nomura, T.Miyake [et al.] // Blood. – 1996. – 88. – P. 3456-3464.

14. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice/ D.G.Motto, A.K.Chauhan, G.Zhu [et al.] // *J. Clin. Invest.* 2005. – 115. – P. 2752–2761.
15. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells/ M.G.Rondaj, R.Bierings, A.Kragt [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2006. – 26. – P. 1002–1007.
16. Ruggeri Z.M. Platelet adhesion under flow // *Microcirculation.* – 2009. – 16. – P. 58–83.
17. Ruggeri Z.M. Von Willebrand factor: looking back and looking forward // *Thromb. Haemost.* – 2007. – 98. – P. 55–62.
18. Ruggeri Z.M, Mendolicchio G.L. Adhesion mechanisms in platelet function // *Circ. Res.* - 2007. – 12. – P. 1673-1685.
19. Ruggeri Z.M., Mendolicchio G.L. Interaction of von Willebrand factor with platelets and the vessel wall // *Hamostaseologie.* -2015. – 3. – P. 211-224.
20. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress/ Z.M.Ruggeri, J.N.Orje, R.Habermann [et al.] // *Blood.* – 2006. – 108. – P. 1903–1910.
21. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers/ S.W.Schneider, S.Nuschele, A.Wixforth [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – 104. – P. 7899–7903.

22. Platelet-vWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress/ K.Shim, P.J.Anderson, E.A. Tuley [et al.] // *Blood.* – 2008. – 111. – P. 651–657.
23. A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis/ J.M.Siegel, C.P.Markou, D.N.Ku, S.R.Hanson // *J. Biomech. Eng.* – 1994. – 116. – P. 446–451.
24. Tsai H.M., Lian E.C. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – № 339. – P. 1585–1594.
25. Turner N.A., Nolasco L., Ruggeri Z.M. [et al.] Endothelial cell ADAMTS-13 and vWF: production, release and vWF string cleavage. // *Blood.* – 2009. – № 114. – P. 5102–5111.
26. Vergauwe R.M., Uji-i H., De Ceunynck K., [et al.] Shear-stress-induced conformational changes of von Willebrand factor in a water-glycerol mixture observed with single molecule microscopy. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. – № 21. – P. 5660-5669.
27. A mechanistic model of acute platelet accumulation in thrombogenic stenoses/ D.M.Wootton, C.P.Markou, S.R.Hanson, D.N.Ku // *Ann. Biomed. Eng.* – 2001. – № 29. – P. 321–329.
28. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor/ X.Zhang, K.Halvorsen, C.Z.Zhang [et al.] // *Science.* – 2009. – № 324. – P. 1330–1334.

ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УДК 616 - 006.446

Тематический рубрикатор: 76.29.33

МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ - ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ИНДИКАТОР ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ РН-ПОЗИТИВНОГО ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ

Докшина Ирина Анатольевна

*кандидат медицинских наук, врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
dokshina@niigrp.ru*

Минаева Наталья Викторовна

*кандидат медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
minaeva@niigrp.ru*

Лагунова Ольга Рудольфовна

*заведующий взрослым отделением гематологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
lagunova@niigrp.ru*

Назарова Елена Львовна

*кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
nazarova@niigrp.ru*

Исаева Наталья Васильевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
isaeva@niigpk.ru

Росин Виталий Анатольевич

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
rosin@niigpk.ru

Сарпова Мария Вадимовна

научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
sarpovai@niigpk.ru

Трегубова Екатерина Владимировна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
tregubova@niigpk.ru

Игнатъев Сергей Викторович

кандидат медицинских наук, и.о. заведующего научно-клиническим отделом гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-

исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
ignatyev@niigpk.ru

Парамонов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
paramonov@niigpk.ru

MINIMAL RESIDUAL DISEASE - PROGNOSTIC INDICATION OF THE TREATMENT EFFICIENCY PH-POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN ADULT

Irina Dokshina

candidate of Medical Sciences, Hematologist, Adult Department of Hematology and Chemotherapy, Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency", Kirov

Natalya Minaeva

candidate of Medical Sciences, Deputy Director for Clinical Work, Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency", Kirov

Olga Lagunova

heads of the adults Department of Hematology and Chemotherapy of the Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency", Kirov

Elena Nazarova

candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology of the Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency", Kirov

Natalya Isaeva

candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency", Kirov

Vitaliy Rosin

candidate of Medical Sciences, Senior Researcher Laboratory of Pathomorphology of the Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Biomedical Agency", Kirov

Maria Sarpova

researcher Laboratory of Pathomorphology of the Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Biomedical Agency", Kirov

Ekaterina Tregubova

junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal State Budgetary Institution of Science, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Biomedical Agency", Kirov

Sergey Ignatiev

candidate of Medical Sciences, acting head of the scientific and clinical Department of Hematology, Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation

Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Biomedical Agency", Kirov

Igor Paramonov

MD, Director Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency", Kirov

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты лечения 26 больных Ph-положительным острым лимфобластным лейкозом (Ph+ОЛЛ) с применением ингибиторов тирозинкиназы (ИТК). Эффективность индукционной терапии с

использованием ИТК составила 96%. Проводился мониторинг минимальной остаточной болезни, включающий в себя определение химерного онкогена *BCL/ABL*, с целью оценки эффективности терапии, контроля за сохранением ремиссии и раннего обнаружения рецидива. У пациентов с Ph+ALL в состоянии полной ремиссии выявлена персистенция транскрипта гена *BCL/ABL*, в том числе у 12 (45%) - в период консолидации, у 9 (41%) - в период поддерживающей терапии. Рецидивы заболевания диагностированы у 15 (68%) больных в диапазоне от 6 мес. до 5 лет.

ABSTRACT

The results of treatment of 26 patients with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) using tyrosine kinase inhibitors (ITC). The effectiveness of induction therapy with using ITC was 96%. Monitoring of the minimum residual disease, including the determination of a chimeric oncogene *BCL / ABL*, with the aim of evaluating the effectiveness of therapy, control over conservation remission and early detection of relapse. In patients with Ph + ALL a state of complete remission revealed the persistence of a gene transcript *BCL / ABL*, including 12 (45%) - during the consolidation period, 9 (41%) - in period of maintenance therapy. Relapses diagnosed in 15 (68%) patients ranging from 6 months. up to 5 years.

Ключевые слова: Ph-положительный острый лимфобластный лейкоз, химерный онкоген *BCL/ABL*, мониторинг минимальной остаточной болезни.

Keywords: Ph-positive acute lymphoblastic leukemia, chimeric oncogene *BCL/ABL*, monitoring of minimal residual disease.

Внедрение в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) и трансплантационных технологий радикально изменило результаты лечения Ph-положительного острого лимфобластного лейкоза (Ph+ ОЛЛ). Сегодня очевидно, что общепринятое определение, такое как полная ремиссия (ПР), имеет относительную ценность, если оно не сопровождается информацией о результатах молекулярно-генетических исследований, направленных на

выявление минимальной остаточной болезни (МОБ). МОБ - это популяция остаточного пула лейкемических клеток, которая обнаруживается во время и после лечения лейкоза. Величину МОБ оценивают чувствительными молекулярными и проточными цитометрическими методами и выражают в количестве нормализованных копий химерного транскрипта (NCN) в исследуемом образце костного мозга. Статус МОБ - независимый индикатор риска развития рецидива. Алгоритмы лечения на основе уровня МОБ могут привести к деэскалации или интенсификации лечения, с акцентом на терапевтическое решение о необходимости проведения трансплантации. Наличие МОБ после трансплантации стволовых клеток коррелирует с наихудшими результатами [5,с.681]. Информация о МОБ необходима для оценки эффективности новых лекарственных препаратов. Оценка МОБ является мощным прогностическим инструментом для определения стратификации пациентов при назначении лечения.

Ph-позитивный острый лимфобластный лейкоз встречается, по данным разных авторов, у 25-30% взрослых больных ОЛЛ. Транслокация (9;22)(q34;q11), в результате которой образуется Ph-хромосома, является самой частой хромосомной aberrацией 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 месте, а гена *BCR* могут быть в разных точках. В зависимости от места разрыва образуется три варианта, кодируемые слитным геном *BCR-ABL* белка p190, иначе обозначаемые как e1a2, p210 и p230;b2a2 и b3a2. При ОЛЛ встречаются как варианты с наличием транскрипта p190, так и с p210 в различной пропорции: у взрослых p190 обнаруживается в 50-70% случаев Ph+ ОЛЛ, p210 - в 30-50% [2,с.63, 8]. Описание варианта p230 при ОЛЛ в доступной литературе нам не встретилось. При Ph+ ОЛЛ очень часто обнаруживаются добавочные хромосомные aberrации: 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 интенсивной химиотерапии Ph+ ОЛЛ, по данным большинства публикаций, составляет до 65% у больных не старше 40 лет и до 40% - старше 60 лет. У большинства пациентов продолжительность ремиссии составляла 9-16 месяцев [6, с.3996, 7].

Внедрение в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) в первую линию химиотерапии Ph+ ОЛЛ улучшило клинический исход у пациентов: достижение полных ремиссий стало возможным в 70-90%, общая выживаемость возросла до 60% [3].

Цель: определить прогностическое значение МОБ на всех этапах лечения взрослых больных Ph+ ОЛЛ.

Материалы и методы. В гематологической клинике ФГБУН КНИИГПК ФМБА России с 2005 по 2019 гг. применялись протоколы лечения «Ph+ОЛЛ+ИТК» для взрослых больных с Ph+ОЛЛ. В исследование включены 26 пациентов в возрасте от 26 до 70 лет (медиана - 52 года). Мужчин – 12 (46,2%), женщин – 14 (5,8%). Методом проточной цитометрии у всех больных установлен В-линейный ОЛЛ: у 5 (19,2%) - ранний, у 8 (30,8%) - пре-В, у 13 (50,0%) - common-В - варианты. Экспрессия миелоидных антигенов CD13, CD33 выявлена в 23% случаев. Транслокация (9;22) методом стандартной цитогенетики диагностирована у 21 (81%) пациента, только химерный онкоген *BCR-ABL* (FISH-методом) - у 5 (19%). У трех больных обнаружены множественные комплексные нарушения кариотипа. Транскрипт p190 (метод ОТ-ПЦР) установлен у 24 (92%) пациентов, p210 - у 2 (8%) обследуемых. Определение МОБ 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. Всем больным на этапе индукции с химиотерапией применялся ИТК 1 поколения - иматиниб. Пяти пациентам, учитывая возраст старше 60 лет, проводилась редукция доз химиопрепаратов. При анализе эффективности индукционного лечения клинико-гематологическая ремиссия достигнута у 25 (96%) пролеченных. Ранняя летальность

констатирована у 1 (3,9%) пациента 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 больных установлена критическая нейтропения (менее 500 мкл/л), сохранявшаяся в течение от 7 до 18 дней, что явилось причиной прерывания протокола. Среди других осложнений наблюдались стероидный диабет у – 8 (30,8%) больных, токсический гепатит - у 8 (30,8%), острый панкреатит - у 2 (7,7%), мукозит - у 22 (84,6%).

Наибольшее значение имеет оценка МОБ по завершении этапа индукционной терапии [1, с.13, 4, с.855]. Мониторинг МОБ может служить интегральным показателем биологических особенностей опухоли, ее чувствительности к проводимой терапии, а также индивидуальных вариаций метаболизма химиопрепаратов [2, с.63]. Из 25 больных, у которых констатирована морфологическая ПР, у 13 (52,0%) – определена молекулярная ремиссия (МР). Экспрессия химерного онкогена *BCL/ABL* в диапазоне от 0,45% до 7,5% (по шкале IS) определялась у 12 (48,0%) пациентов, т. е. отсутствовала молекулярная ремиссия.

На этапе консолидации у 3 (12,0%) больных (старше 55 лет) констатирован летальный исход вследствие развития инфекционных осложнений. Достижение полного молекулярного ответа после курсов консолидации (МОБ - негативность) установлена у 5 пациентов.

Статус 22 пациентов перед поддерживающим лечением был следующим: ПР сохранялась у всех 22 (100%), МР - у 18 (81,8%). Учитывая МОБ-позитивность, 8 (36,4%) больным проведена смена ИТК 1 поколения на ИТК 2 поколения (дазатиниб).

При мониторинге МОБ на этапе поддерживающего лечения у 10 (55,6%) пациентов констатирована потеря МР, отмечалась персистенция транскрипта химерного онкогена *BCL/ABL* в костном мозге вплоть до его исчезновения и

вновь наблюдалось его повышение в сроки от 5 до 18 мес. при сохранении морфологической ПР.

Установлено, что на любом этапе гематологической ремиссии есть риск развития молекулярного рецидива, а вслед за этим обязательно следует гематологический рецидив [5]. Отслеживание кинетики МОБ в ремиссии особенно важно для раннего обнаружения и предотвращения рецидива. У 15 (68%) МОБ-позитивных больных через 6-18 мес., у 1 - через 5 лет диагностирован морфологический рецидив. Семь (28%) больных без признаков прогрессии живы в течение 6, 8, 10, 14, 51, 52 мес. и 10 лет. Трём пациентам во второй ремиссии выполнена родственная HLA-идентичная аллогенная трансплантация стволовых клеток (аллоТГСК), двум - планируется проведение неродственной аллоТГСК. Молекулярная ремиссия сохраняется у 4 (16%) пациентов.

Таблица 1.

Динамика статуса пациентов на разных этапах лечения

Ответ на терапию	Этапы оценки эффективности лечения			
	После индукционной терапии, n (%)	После консолидации, n (%)	В процессе поддерживающей терапии, n (%)	Статус на момент окончательного анализа данных, n (%)
Костномозговая ремиссия	25 (96%)	22 (88%)	18 (82%)	7 (28%)
Молекулярная ремиссия	13 (52%)	8 (82%)	8 (44%)	4 (16%)

Таким образом, использование ИТК в протоколах лечения Ph+ ОЛЛ значительно улучшило показатели клинико-гематологической ремиссии в 96% случаев. Учитывая, что полный молекулярный ответ является независимым фактором долгосрочной выживаемости пациентов, мониторинг МОБ на основании исследования гена *BCL/ABL* проводится на всех этапах терапии и после завершения протокола лечения. Неудачный исход лечения по

молекулярным критериям идентифицирует подгруппу Ph+ ОЛЛ с худшим прогнозом. Результаты определения МОБ являются обязательной диагностической опцией на всех этапах лечения для стратификации групп риска с целью разработки новых риск-адаптированных программ лечения больных Ph+ОЛЛ с применением ИТК нового поколения, трансплантационных технологий.

Список литературы

1. Bruggtmann M., Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation// Blood Adv . (2017) 1 : 2456–66. 10.1182 / asheducation-2017.- № 1.- P.13.
2. Chen X., Wood B.L. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities//Blood Rev.2017,31,P.63-75.
3. Czech leukemia Study Group- for Life. Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia/ C.Shalek, F.Folber, E. Frankova [et al.]// Eur J Haematol .- (2016) 96 : 276–84. 10.1111 / ejh.12587.
4. Hoelzer D. Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia// Haematologica.- 2015;100(7):P.855-858.
5. Methods and role of minimal residual disease after stem cell transplantation/ M.Ladetto, S.Buttcher, N. Kreger [et al.] //Bone Marrow Transplant.- 2019.- 54.- P. 681-690.
6. Minimal residual disease diagnostics in Acute Lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast and standardized technologies /J.J.Van Dongen, V.H.van der Velden, M.Brüggemann, A.Orfao //Blood. – 2015.- 125 (26): P.3996-4009.

7. Short N.J., Jabbour E. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic leukemia: How to recognize and treat it// Curr.Oncol. Rep.-2017.- 19:6.

8. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1/ H.Pfeifer, G.Cazzaniga, B.N.Savani [et al.] //Leukemia. - (2019). 10,1038 / s41375-019-0413-0.

УДК: 616.155.392.8

Тематический рубрикатор: 73.03.33; 73.03.39

АНАЛИЗ АССОЦИАТИВНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ГЕМОГРАММ И МУТАЦИОННЫМ СТАТУСОМ ГЕНОВ *JAK2* И *CALR* ПРИ ПЕРВИЧНОМ МИЕЛОФИБРОЗЕ

Дьяконов Дмитрий Андреевич

*канд. мед. наук, зав. лабораторией патоморфологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
dyakonov@niigpk.ru*

Росин Виталий Анатольевич

*канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
rosin@niigpk.ru*

Фокина Елена Сергеевна

*канд. мед. наук, врач-гематолог, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
yelena-med@mail.ru*

Габдулхакова Альфия Хасановна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

gabdulhakova@niigpk

Сухорукова Эмилия Евгеньевна

научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

sukhorukova@niigpk.ru

***RELATIONSHIP BETWEEN HEMOGRAM INDICATORS AND MUTATIONS
IN JAK2 AND CALR GENES IN PRIMARY MYELOFIBROSIS***

Dmitriy Diakonov

candidate of medical science, head of laboratory pathomorphology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Vitaliy Rosin

candidate of medical science, senior researcher of laboratory pathomorphology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Fokina

candidate of medical science, doctor-hematologist, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Alfia Gabdulhakova

junior researcher of laboratory cells and molecular immunology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Emilia Sukhorukova

researcher of laboratory cells and molecular immunology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты, отражающие особенности изменений показателей гемограммы в зависимости от генетических мутаций *JAK2* и *CALR* при ПМФ. У пациентов с мутацией *JAK2V617F* выявлено повышение количества лейкоцитов и гранулоцитов. Для *CALR*-позитивных больных характерны снижение уровня гемоглобина, концентрации гематокрита, содержания эритроцитов, а также высокий уровень тромбоцитов.

ABSTRACTS

The results reflecting the relationship between changes in hemogram parameters and genetic mutations in the *JAK2* and *CALR* genes for PMF are presented. In patients with a *JAK2V617F* mutation increase the number of leukocytes and granulocytes. The *CALR*-positive patients decrease hemoglobin level, hematocrit concentration, erythrocyte content, as well as a high platelet level.

Ключевые слова: первичный миелофиброз; гемограмма; *JAK2*; *CALR*.

Keywords: primary myelofibrosis; hemograms; *JAK2*; *CALR*.

Первичный миелофиброз (ПМФ) относится к группе клональных Ph-негативных хронических миелопролиферативных новообразований. Ежегодная первичная заболеваемость в мире варьирует от 0,72 до 1,63 случаев, в среднем – около 1,1 случая на 100 000 населения. Медиана выживаемости приближена к 6 годам, но может колебаться от нескольких месяцев до нескольких лет [2, с. 171; 3, с.317], [11, с.560]. Патогенез заболевания включает в себя развитие гиперплазии гранулоцитов и мегакариоцитов в костном мозге с одновременной активацией *JAK-STAT* сигнального пути. Продолжительное повышение уровня ростовых факторов, стимулирующих активность костномозговых фибробластов, приводит к формированию коллагенового фиброза с

последующей редукцией кроветворения [1, с.26].

Согласно классификации ВОЗ (2017), диагноз ПМФ устанавливают при наличии больших и малых критериев [4, с.47-48]. К большим критериям относят пролиферацию в костном мозге атипичных мегакариоцитов в сочетании с ретикулиновым/коллагеновым фиброзом и, чаще всего, сужением эритропоза; отсутствие диагностических критериев других хронических миелопролиферативных новообразований и миелодиспластического синдрома; наличие генетических мутаций в генах *JAK2*, *CALR* или *MPL* и/или других генетических аномалий, связанных с миелоидными неоплазиями (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*); отсутствие реактивного миелофиброза (инфекционные и аутоиммунные процессы, токсические миелопатии, онкологические заболевания, остеопатии).

Малые критерии включают в себя лейкоцитоз в периферической крови $\geq 11 \times 10^9/l$, анемию, не связанную с сопутствующими заболеваниями, сдвиг лейкоформулы влево и/или нормоцитоз, повышение концентрации лактатдегидрогеназы, спленомегалию. Для постановки диагноза ПМФ необходимо сочетание трех больших критериев и хотя бы одного малого.

При верификации диагноза ПМФ и дифференциальной диагностики заболевания с другими патологическими состояниями, имеющими схожие клинико-лабораторные проявления, важное значение имеет оценка общего анализа крови [10, с.34]. Показатели гемограмм в дебюте заболевания характеризуются большим разнообразием, а именно: от повышения до значительного снижения количества лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и уровня гемоглобина [2, с.173], [7, с.287]. Эти нарушения могут быть обусловлены множеством факторов, таких как: продолжительность болезни до момента диагностики, степень выраженности фиброза в костном мозге, сопутствующая патология.

Продуктом гена *JAK2* является цитоплазматическая тирозинкиназа – важный компонент регуляции клеточного цикла, который задействован в передаче пролиферативного сигнала с цитокиновых рецепторов к ядру клетки.

В норме этот процесс временный и строго контролируемый. Возникновение мутации *JAK2V617F* приводит к избыточной цитокин-независимой активации *JAK-STAT*, *PI3K*, *AKT*, *MAPK*, *m-TOR* сигнальных путей и нерегулируемой стимуляции клеточного деления. Указанную генетическую аномалию удается обнаружить в 60% случаев ПМФ [4, с.52].

Ген *CALR* кодирует многофункциональный регуляторный Ca^{2+} -связывающий белок. Показано, что его мутантные формы усиливают пролиферативный потенциал опухолевых клеток и приводят к неконтролируемому росту отдельных клеточных линий в костном мозге [6, 13, с.2381]. Мутация в 9 экзоне гена определяется у 20% больных [8, с.1476].

При анализе литературных источников нами найдены работы иностранных авторов, свидетельствующие о формировании в последние годы нового направления научного поиска в онкогематологии – выявление на различных стадиях заболевания ассоциативных связей между показателями периферической крови и молекулярно-генетическими маркерами [5, с.220], [9, с.1067]. Результаты этих исследований немногочисленны и требуют дальнейшего изучения.

Цель работы – выявление ассоциативных связей между показателями гемограмм и мутационным статусом генов *JAK2* и *CALR* у больных ПМФ.

Обследовано 223 пациента с ПМФ, находившихся на лечении в гематологической клинике Кировского НИИ гематологии и переливания крови с 2010 по 2018 гг. (мужчин – 94, женщин – 129). Медиана возраста – 60 лет (от 52 до 71). Всех больных разделили на три группы. В первую включили 163 (73,1%) пациента с мутацией *V617F* в гене *JAK2*, во вторую – 34 (15,2%) с перестройкой 9 экзона гена *CALR*, в третью – 26 (11,7%) с отсутствием обеих аномалий.

Основные показатели общего анализа крови и статус исследуемых генов оценивали при первичном обращении больных в клинику института. Содержание гемоглобина и подсчет клеток крови осуществляли с помощью гематологического анализатора ХТ-4000i (Sysmex Corporation, Япония). Определение мутаций в генах *JAK2* и *CALR* проводили методом полимеразной

цепной реакции с использованием аллель-специфичных праймеров компании «Синтол» (Россия) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в полиакриламидном геле. В качестве материала для генотипирования использовали ДНК, полученную из гранулоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции.

Сравнение количественных показателей осуществляли с применением непараметрических критериев Крускала-Уоллиса, Манна-Уитни. Результаты представляли с указанием среднего, а также стандартного отклонения для каждого признака. Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение SPSS for Windows Version 19. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

При сравнении показателей общего анализа крови с учетом статуса генов *JAK2* и *CALR* установлен ряд межгрупповых различий (таблица). Так, у больных ПМФ с мутацией *JAK2V617F* зарегистрировано достоверное увеличение абсолютного содержания лейкоцитов ($p = 0,003$) и гранулоцитов ($p = 0,011$) по сравнению с обследуемыми 2 и 3 групп. У пациентов 1 группы отмечена тенденция к высоким значениям показателей гемограммы, отражающих состояние эритроидного ростка кроветворения.

Таблица.

Основные показатели гемограмм при ПМФ в зависимости от наличия мутаций в генах *JAK2* и *CALR*

Показатель гемограммы	Группы		
	<i>JAK2+</i>	<i>CALR+</i>	<i>JAK2/CALR-</i>
Нб, г/л	152,5± 2,1	119,4± 3,9*	135,9±6,7
Нт, %	45,8± 0,6	35,8± 1,1*	40,9±1,9
RBC, $10^{12}/л$	6,2± 0,1	4,2±0,1*	5,1±0,4
WBC, $10^9/л$	14,3± 0,5	8,4±0,6*	11,2±1,6*
Гранулоциты, абс.	11,7±0,7	5,9±0,5*	7,9±1,3*
Лимфоциты, абс.	2,1±0,1	1,9±0,1	2,1±0,2

Тромбоциты, $10^9/л$	801,7±39,4	924,1±120,4**	683,6±139*/**
----------------------	------------	---------------	---------------

Примечание: * – статистическая значимость различий по отношению к 1 группе больных ПМФ. ** – достоверность различий между пациентами 2 и 3 группы.

У носителей мутации в 9 экзоне гена *CALR* выявлены наиболее низкие значения гемоглобина, гематокрита, количества эритроцитов, а также абсолютного содержания лейкоцитов и гранулоцитов. Данные параметры были достоверно ниже по сравнению с аналогичными параметрами крови пациентов 1 группы ($p = 0,036$). У обследуемых 2 группы установлено наиболее высокое количество тромбоцитов по сравнению с другими группами.

У больных ПМФ, не имевших мутаций в генах *JAK2* и *CALR*, отмечено более низкое содержание лейкоцитов и абсолютного количества гранулоцитов по отношению к группе пациентов с наличием мутации в гене *JAK2* ($p = 0,023$). При двойном негативном статусе генов выявлены самые низкие показатели тромбоцитоза по сравнению с пациентами других групп ($p = 0,031$).

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии ассоциативных связей между показателями гемограммы и мутациями генов *JAK2* и *CALR* при ПМФ. Повышение абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов установлено при возникновении мутации *JAK2V617F*. Снижение уровня гемоглобина, концентрации гематокрита, содержания эритроцитов в сочетании с повышением числа тромбоцитов выявлено у *CALR*-позитивных больных. Полученные данные согласуются с результатами опубликованных исследований иностранных авторов, посвященных поиску закономерностей в динамике лабораторных показателей, расширяя представление о патогенезе ПМФ [5, с.220], [13, с.2380].

Список литературы

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении // Онкогематология. – 2015. – № 2. – С. 25-35.
2. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелопролиферативные новообразования – М.: Изд-во Littera, 2016. - 304 с.
3. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелопролиферативных заболеваний // Клиническая онкогематология. – 2016. – Т. 9, № 3. С. 314-325.
4. Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition, 2017.
5. Ferreira C.S., Polo B., Lacerda J.F. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms // Semin. Hematol. – 2018. – Vol. 55, N 4. – P. 215-222.
6. Giannopoulos A. Detection of CALR Mutations Using High Resolution Melting Curve Analysis (HRM-A); Application on a Large Cohort of Greek ET and MF Patients / A. Giannopoulos, N. Rougkala, T. Loupis [et al.] // Mediterr J. Hematol. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 11, N 1. – P. 2019009.
7. 20+ years and alive with primary myelofibrosis: phenotypic signature of very long-lived patients / D. Penna, T.L. Lasho, C.M. Finke [et al.] // Am. J. Hematol. – 2019. – Vol. 94, N 3. – P. 286-290.
8. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons / A. Tefferi, T.L. Lasho, C.M. Finke [et al.] // Leukemia. – 2014. - No 28. – P. 1472-1477.

9. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis / E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 124, N 7. – P. 1062-1069.
10. Clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative diseases (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) / A.L. Melikyan, A.G. Turkina, K.M. Abdulkadyrov [et al.] // Hematology and Transfusiology. – 2014. – N 4. – P. 31-56.
11. Skoda R.C., Duek A., Grissouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms // Exp. Hematol. – 2015. – Vol. 43, N 8. – P. 599-608.
12. Somatic CALR mutations om myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2013. – Vol. 369, No 25. – P. 2391-2405.
13. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A.S. Harutyunyan [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2013. – N 369. – P. 2379-2390.

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

Тематический рубрикатор: 76.29.33, 76.35.33

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАНТНЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Исаева Наталья Васильевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский

институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

isaeva@niigpk.ru

Докшина Ирина Анатольевна

кандидат медицинских наук, врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

dokshina@niigpk.ru

Зорина Наталья Александровна

кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

zorina@niigpk.ru

Змеева Юлия Сергеевна

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

zmeeva@niigpk.ru

Росин Виталий Анатольевич

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров,

rosin@niigpk.ru

RESULTS OF ABERRANT PLASMA CELLS DETERMINATION IN BONE MARROW OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Natalia Isaeva

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Cellular and Molecular Immunology laboratory, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Irina Dokshina

Candidate of Medical Sciences, Hematologist of Adult Hematology and Chemotherapy department, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Natalya Zorina

Candidate of Medical Sciences, Head of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation department, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Yuliya Zmeyeva

Junior Researcher of Cellular and Molecular Immunology laboratory, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Vitalij Rosin

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of Pathomorphology laboratory, Federal State-Financed Scientific Institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты шестицветного цитометрического исследования плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом в

костном мозге 49 больных множественной миеломой на различных этапах лечения, включая трансплантацию аутологичных ГСК. При оценке минимальной остаточной болезни у обследованных больных в полной ремиссии (n=15) показано, что ее негативность при множественной миеломе потенциально достижима и отмечалась у 26,6 % больных. Показано, что число плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом коррелировало со глубиной ответа на лечение.

ABSTRACT

The work reflects the results of a six-color cytometric study of plasma cells with aberrant immunophenotype in the bone marrow of 49 patients with multiple myeloma at various stages of treatment, including autologous HSCs transplantation. When assessing the minimal residual disease in the examined patients in complete remission (n=15), it was shown that its negativity in multiple myeloma is potentially achievable and was observed in 26.6% of patients. It was shown that the number of plasma cells with an aberrant immunophenotype correlated with the depth of response to treatment.

Ключевые слова: плазматическая клетка, минимальная остаточная болезнь, множественная миелома.

Keywords: plasma cell, minimal residual disease, multiple myeloma.

Множественная миелома (ММ) - злокачественное заболевание, характеризующееся клональной пролиферацией в костном мозге aberrантных плазматических клеток (ПК), которые в подавляющем большинстве случаев секретируют моноклональный иммуноглобулин или его свободные легкие цепи (белок Бенс-Джонса) [3, с. 3]. Улучшение результатов лечения больных ММ в последние годы связано с внедрением в клиническую практику высокодозной химиотерапии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), таргетных препаратов, (ингибиторов протеасом, иммуномодуляторов, моноклональных антител) [16, с. 2516]. Однако развитие рецидива у большинства пациентов остается неизбежным, что связано с сохранением

остаточного количества опухолевых клеток. Такое состояние принято называть минимальной остаточной болезнью (МОБ) [13, с. 379, 6, с. 84]. Существует необходимость более глубокой оценки полноты ответа на терапию с использованием высокочувствительных методов лабораторной диагностики.

В аналитических работах последних лет для определения МОБ при ММ [8, с. 141] рекомендуется использовать проточную цитометрию с многоцветным окрашиванием клеток [21, с. 4022, 25, с. 4369, 14, с. 3096, 11, с. 29, 20, с. 599] и секвенирование нового поколения с применением консенсусного набора праймеров [12, с. 5173, 19, с. 2105, 24 с. 3079]. Определение остаточных очагов поражения вне костного мозга, проводимое с помощью позитронно-эмиссионной компьютерной томографии, также является надежным подходом к комплексной оценке МОБ-статуса [26, с. 629, 17, с.1545, 9, с.1757, 23, с. 1823]. При МОБ-негативном статусе пациента, выявляемом путем оценки aberrантных ПК или последовательностей ДНК искомого клонотипа, рекомендуется учитывать возможность достижения чувствительности применяемого метода менее 10^{-5} .

Многоцветная проточная цитометрия - метод, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции отдельных клеток. Флуоресцентный сигнал появляется в случае устойчивого связывания клетки с флуорохром-конъюгированным моноклональным антителом, которое специфично для белковой структуры клетки [7, с. 11]. Диагностика МОБ при гемобластозах методом проточной цитометрии является динамично развивающимся направлением. В настоящее время для цитофлуориметрического МОБ-тестирования при ММ представлены согласованные рекомендации, содержащие руководящие принципы надлежащей клинической практики [11, с. 29].

Определение МОБ-статуса при ММ крайне важно для прогнозирования выживаемости больных без прогрессии заболевания и общей выживаемости [22 с. 125, 10, с. 83, 15, с. 300, 2, с. 38, 4, с. 36]. Изучение МОБ-статуса может

способствовать определению рациональных подходов к выбору поддерживающей терапии после высокодозной химиотерапии.

Цель исследования - оценить содержание плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом в костном мозге больных множественной миеломой в зависимости от глубины противоопухолевого ответа.

Методы

В исследование включены 49 пациентов в возрасте от 44 до 69 лет (медиана - 59 лет), находившихся на лечении в гематологической клинике Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» в 2016-2019 годах. В дебюте заболевания стадия I по DS (Durie-Salmon) установлена у 2 человек (4,1%), II стадия – у 27 (55,1%), III стадия – у 20 (40,8%). Среди пациентов наблюдалось 19 мужчин и 30 женщин (соотношение составило 1:1,6). Диагностику ММ и оценку ответа на противоопухолевую терапию проводили на основании критериев Международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG-2014), модифицированных в 2016 г. [18, с. 328-346, 3, 17-18].

Индукционная терапия I линии у всех пациентов включала в себя бортезомиб с числом курсов от 2 до 11 (медиана – 6,0). Иммуномодулирующие препараты применялись во II-IV линиях терапии. У 33 (67,3%) пациентов после проведения 1-4 линий терапии при достижении как минимум частичного ответа (ЧО) выполнена процедура мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в кровь и заготовка аутологичных ГСК-содержащих лейкоконцентратов для последующей трансплантации.

Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных ГСК (аутоТГСК) выполнена у 9 (18,4%) больных ММ. Перед аутоТГСК полная ремиссия (ПР) констатирована у 1 (11,1%) больного, очень хороший ответ (ОХЧО) отмечен у 5 (55,6%) человек и ЧО - у 3 (33,3%). Трансплантация проведена после 1-2 линий терапии с общим числом курсов в индукции от 4 до

18 (медиана – 8,0), время от момента установления диагноза до аутоТГСК варьировало от 6,5 до 40 мес. (медиана 16 мес.).

Образцы аспиратов костного мозга обрабатывали моноклональными антителами, конъюгированными с шестью различными флуорохромами [11, с. 29, 6, с. 39, 5, с. 6] (таблица 1), при расчете объема образцов ориентировались на содержание моноклеарных элементов на уровне 3 млн.

Таблица 1.

Панель антител для идентификации ПК с aberrантным фенотипом

Номер пробирки	Флуорохромы и клеточные маркеры					
	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD56	CD81	CD19	CD38	CD138	CD45
2	CD27	CD117	CD19	CD38	CD138	CD45

Количество аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге больных определяли на лазерном проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) с программным обеспечением (FACSDiva Dickinson, США). Прибор калибровали с помощью частиц (Cytometer Setup and Tracking from BD Biosciences). Гейтирование клеточных элементов выполняли, используя известные данные о различиях в экспрессии клеточных маркеров на поверхности опухолевых ПК и нетрансформированных плазмоцитов [6, с. 85, 5, с. 6]. Суммарно в образце исследовали не менее 1 млн моноклеарных элементов, при их ультранизком содержании ПК анализ продолжали до обнаружения не менее 20 этих клеток. Рассчитывали относительное содержание опухолевых ПК среди всех моноклеаров исследуемого образца костного мозга. Указанная в таблице 1 панель флуорохром-конъюгированных моноклональных антител позволяла провести анализ с минимальной чувствительностью 0,01% (10^{-4}), а в ряде случаев удавалось выявлять содержание остаточной опухолевой популяции в образцах в количестве менее 0,001% (10^{-5}).

Выявление корреляционных связей между параметрами проводили с помощью коэффициента Спирмена, используя программу статистической обработки результатов STADIA (Россия) [4, с. 154-156]. В таблицах и тексте данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала Ме [I кв.; III кв.].

Результаты

Общий ответ на лечение зарегистрирован у 42 (85,7%) пациентов, среди которых у 15 (30,6%) клинико-лабораторные данные соответствовали ПР заболевания, у 16 (32,7 %) – ОХЧО, у 11 (26,5 %) – ЧО. У 7 больных (14,3 %) диагностировано прогрессирование заболевания.

Идентификацию и подсчет aberrantных ПК в исследованных образцах костного мозга проводили согласно типичной экспрессии маркеров на этих клеточных элементах - CD138+CD38+dimCD45-CD19-CD56+highCD117+CD27low/-CD81low/-. Учитывали также индивидуальные особенности экспрессии маркеров, если такие были выявлены на этапе диагностики заболевания. Так, у 8 (16,3 %) больных наблюдалась слабая выраженность маркера CD19 на ПК, у 5 (10,2 %) - слабая выраженность по CD45, у 6 (12,2 %) – сниженная интенсивность экспрессии CD56.

Число ПК с aberrantным иммунофенотипом в костном мозге больных с ПР составило 0,0633 [0,0119; 0,2181] %, при ОХЧО - 0,2510 [0,0586; 0,7097] %. У 11 (73,4 %) пациентов, достигших ПР, зарегистрирован МОБ-позитивный статус, у 4 (26,6%) – выявлен МОБ-негативный статус на уровне менее 10^{-4} , среди которых у 2 (13,3%) МОБ-негативный статус подтвердили на уровне менее 10^{-5} . Таким образом, при одновременной детекции шести клеточных маркеров у 50 % больных с установленной МОБ-негативностью на уровне менее 10^{-4} оказалось невозможным объективное подтверждение иммунофенотипической aberrantности плазматических элементов в количестве менее 10^{-5} .

Выявление МОБ-негативности с помощью иммунофенотипирования у больных ММ с клинико-лабораторным заключением о достижении ПР дает основание констатировать получение строгой ПР.

У больных ММ с диагностированным ЧО и прогрессированием заболевания проанализированы результаты микроскопической и цитометрической оценки аспиратов костного мозга. Показана высокая корреляционная связь между двумя полученными показателями: суммарным содержанием плазматочных элементов по результатам оценки миелограмм и числа aberrantных ПК по данным лазерной проточной цитофлуориметрии ($r = 0,65$). Полного совпадения данных не получено (табл. 2), что объясняется возможным присутствием в костном мозге больных ММ нетрансформированных плазматических элементов, которые при цитометрическом исследовании исключаются из поля анализа.

Таблица 2.

Результаты оценки аспиратов костного мозга больных ММ с ЧО и прогрессированием

Глубина ответа	Суммарное число плазматических элементов (миелограмма), %	Число aberrantных ПК (проточная цитофлуориметрия), %
ЧО	5,2 [3,4; 8,8]	0,2 [0,03; 1,2]
Прогрессирование	13,3 [5,2; 15,2]	8,2 [5,8; 12,2]

Выводы

В работе представлены результаты, суммирующие опыт нашего учреждения по иммунофенотипической оценке числа aberrantных ПК в аспиратах костного мозга методом цитометрии у 49 больных ММ с различным ответом на терапию, а также при прогрессировании заболевания. При установлении МОБ-негативного статуса у больных менее 10^{-4} подтверждение на уровне менее 10^{-5} оказывается невозможным в 50% наблюдений. Для

повышения чувствительности метода необходимо проводить анализ большего числа специфических маркеров, экспрессированных одновременно на одной клетке.

Данные, полученные при идентификации и подсчете aberrantных ПК больных ММ, согласуются с клинико-лабораторной оценкой результатов лечения. Иммунофенотипический метод определения МОБ позволит в дальнейшем проводить сравнение эффективности различных лечебных подходов, в том числе с применением трансплантационных технологий. Оценка эффективности лечения в режиме непрерывного мониторинга поможет в формировании персонализированного подхода к терапии.

Список литературы

1. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного статистического анализа данных. М.: ФОРУМ, 2006. 512 с.
2. Мониторинг минимальной резидуальной болезни у больных множественной миеломой до и после трансплантации аутологичных стволовых клеток / И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, О.С. Покровская [и др.] // Гематология и трансфузиология 2014; 59 (1): 37-38.
3. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы / Л.П. Менделеева, О.М. Вотякова, О.С. Покровская [и др.] // Гематология и трансфузиология 2016; 61 (1): С. 1-24.
4. Определение величины опухолевого клона у больных множественной миеломой на различных этапах лечения / А.Д. Гарифуллин, С.В. Волошин, А.Ю. Кувшинов [и др.] // Гематология и трансфузиология 2014; 59 (1): С. 36.

5. Пронкина Н.В., Шишкова И.В., Труфакина Е.В. Метод многопараметрической проточной цитометрии в диагностике и мониторинге множественной миеломы // Справочник заведующего КДЛ 2017; 12: С. 35-48.
6. Роль и место проточной цитометрии в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе / И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов [и др.] // Онкогематология 2017; 2: С. 80–94.
7. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с.
8. Berger N., Kim-Schulze S., Parekh S. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Impact on Response Assessment, Prognosis and Tumor Heterogeneity // Biological Mechanisms of Minimal Residual Disease and Systemic Cancer. - 2018. - P. 141-159. – [электронный ресурс] - Режим доступа. - URL: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-97746-1> (дата обращения 24.04.2020).
9. Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma / J. Hillengass, S. Ayyaz, K. Kilk, A.-M. Weber // Haematologica 2012; 97 (11):1757 - 1760.
10. Clonal bone marrow plasma cells monitoring in multiple myeloma patients by flow cytometry: the first results / S. A. Sizikova, N. V. Pronkina, E. V. Batorov [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation 2017; 6 (3): 81-82.
11. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition / M. Stetler-Stevenson, B. Paiva, L. Stoolman, P. Lin [et al.] // Cytometry B Clin Cytom 2016; 90 (1): 26–30.

12. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia / M. Faham, J. Zheng, M. Moorhead, V.E.H. Carlton // *Blood* 2012; 26: 5173 – 5180.

13. Ely S., Biran N., Chari A. What we mean when we talk about MRD in myeloma. A review of current methods. Part 1 of a two-part series // *Curr Hematol Malig Rep* 2014; 9 (4): 379-388.

14. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation / A. Rawstron, F.E. Davies, R. DasGupta, A.J. Ashcroft // *Blood* 2002; 100 (9): 3095–3100.

15. Impact of Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma Patients with Sustained Complete Remission after Frontline Therapy / E. Terpos, I. Kostopoulos, E. Kastiritis, J. Ntanasis-Stathopoulos // *HemaSphere* [электронный ресурс] 2019; 3 (6): 300. Режим доступа. – URL: doi: 10.1097/HS9.0000000000000300 (дата обращения 01.05.2020).

16. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies / S. Kumar, S. Rajkumar, A. Dispenzieri [et al.] // *Blood* 2008; 111 (5): 2516 - 2520.

17. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma / M. Dimopoulos, E. Terpos, R.L. Comenzo, P. Tosi // *Leukemia* 2009; 23 (9): 1545–56.

18. Kumar S., Paiva B., Anderson K. C. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma // *Lancet Oncology* 2016; 17 (8): e328-e346.

19. Minimal residual disease (MRD) testing in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients: a prospective head-to-head assessment of cell-based, molecular, and molecular-imaging modalities / N. Kord, S. Mailankody, M. Roschewski, F. Fahem // *Blood* 2014; 124 (21): 2105.

20. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry / M.B. Vidriales, J.F. San-Miguel, A. Orfao [et al.] // *Best. Pract. Res. Clin. Haematol* 2003; 16 (4): P. 599–612.

21. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation / B. Paiva, M.B. Vidriales, J. Cervero, G. Mateo // *Blood* 2008; 112 (10): 4017–4023

22. Owen R.G. Minimal residual disease (MRD) in multiple myeloma: prognostic and therapeutic implications (including imaging) // *Educational updates in hematology book of 24th Congress of the European Hematology Association Amsterdam* [электронный ресурс] 2019:123 - 130. Режим доступа. - URL: <https://journals.lww.com/hemasphere/Documents/EHA24> doi: 10.1097/HS9.0000000000000243 (дата обращения 01.05.2020).

23. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3 / S. Usmani, A. Mitchell, S. Waheed, J. Growley // *Blood* 2013; 121 (10): 1819 - 1823.

24. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma / J. Martinez-Lopez, J. Lahuerta, F. Pepin, M. Gonzalez // *Blood* 2014; 123 (20): 3073 - 3079.

25. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple

myeloma patients / B. Paiva, M.B. Vidriales, G. Mateo, J.J. Perez // Blood 2009; 114 (20): 4369–4372.

26. The role of positron emission tomography/computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma / J. Caers, N. Withofs, J. Hillengass [et al.] // Haematologica 2014; 99 (4): 629 - 637.

УДК 616.98

Тематический рубрикатор: 76.03.00, 76.03.45

**ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО
ОПРЕДЕЛЕНИЮ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГРИБКОВЫХ
ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНТРОЛЬНЫХ КАРТ**

Кормщикова Елена Сергеевна

и.о.заведующего лабораторией препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kormschikova@niigpk.ru

Никулина Наталья Сергеевна

младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

nikulina@niigpk.ru

**ESTIMATION OF STABILITY OF LABORATORY RESEARCH ON
DETECTION OF SEROLOGICAL FUNGAL INFECTIOUS MARKERS IN
PATIENTS OF HEMATOLOGICAL CLINIC BY CHECK CARDS**

Elena Kormshchikova

acting head of the Blood products laboratory, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Nataliya Nikulina

Junior Researcher of Blood products laboratory, the Federal State-Financed scientific institution Kirov research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

Цель: оценить стабильность лабораторных исследований по выявлению серологических маркеров микозов у пациентов гематологической клиники.

Метод: построение и анализ контрольных карт результатов определений маннанового антигена, антител к нему и галактоманнанового антигена.

Результат: лабораторный процесс определения серологических маркеров микозов поддерживается в статистически управляемом состоянии.

Выводы: непрерывный мониторинг выявления маркеров микозов позволяет управлять качеством исследований и своевременно предпринимать меры по недопущению выхода процесса анализа из стабильного состояния.

ABSTRACT

The aim: to assess the stability of laboratory tests to determine the serological markers of mycoses in patients of a hematological clinic. **Method:** construction and analysis of control charts of the results of determinations of mannan antigen, antibodies to it and galactomannan antigen. **Result:** The laboratory process for the determination of serological markers of mycoses is maintained in a statistically controlled state. **Conclusions:** continuous monitoring of the detection of mycosis

markers allows to control the quality of research and take timely measures to prevent the analysis process from coming out of a stable state.

Ключевые слова: маннанановый антиген; антитела к маннановому антигену, галактоманнановый антиген, сыворотка крови, лаважная жидкость, контрольные карты Шухарта, оценка стабильности лабораторных исследований.

Keywords: mannan; anti-mannan antibodies, galactomannan; blood serum, lavage fluid, Shewhart control charts; evaluation of stability of laboratory studies.

Грибковые инфекции, основными возбудителями которых являются грибы рода *Candida* и рода *Aspergillus* [2, с. 3], относятся к категории тяжелых осложнений у больных гемобластомами, получающих программную полихимиотерапию. В связи с тем, что для инвазивных микозов характерно быстрое и агрессивное течение [3, с. 5] с высокой смертностью, успех их терапии во многом определяет ранняя верификация диагноза [5, с. 233; 10, с. 56-57; 11, с. 290-291].

Рекомендуемым Европейским респираторным обществом и Европейским обществом клинической микробиологии и инфекционных заболеваний серологическим методом диагностики инвазивных кандидоза и аспергиллеза является иммуноферментное выявление маннанового антигена грибов рода *Candida*, антител к нему и галактоманнанового антигена грибов рода *Aspergillus* [3, с. 13; 12, с. 245-246; 9, с. 53; 8, с. 434] с использованием диагностических наборов реагентов. Однако предлагаемая производителями тест-систем процедура верификации правильности результатов определения серологических маркеров ориентирована на выявление уже свершившихся отклонений и не позволяет управлять процессом лабораторного исследования. Следить за изменениями в работе аналитических систем и оперативно принимать меры для обеспечения надлежащего качества лабораторной диагностики дают возможность контрольные карты Шухарта [7; 4, с. 9-12].

Теория контрольных карт выделяет два вида variability или изменчивости. Первый вид вызван случайными (естественными, внутренними, неконтролируемыми) причинами, воздействие которых формирует присущую процессу прецизионность [4, с. 4]. Для количественной характеристики естественной изменчивости проводят аттестацию, верификацию или валидацию процедуры анализа. Если уровень variability приемлем, методика считается пригодной для целей исследования.

Допустимая естественная variability нарушается, если появляются систематические (неслучайные, неестественные, контролируемые) причины изменчивости, приводящие к нарушению стабильной работы аналитической системы и выходу лабораторного процесса из статистически управляемого состояния. Возникновение второго вида изменчивости может быть связано с браком исследуемого биоматериала, неисправностью работы оборудования, несоответствующей квалификацией персонала, нарушением или изменением условий проведения анализа. Систематическая составляющая variability может быть идентифицирована и устранена [4, с. 4].

Главным статистическим инструментом предупреждения неслучайных отклонений является контрольная карта – графический способ представления и сопоставления информации, основанной на анализе данных последовательных выборок, отражающих текущее состояние процесса, с границами, установленными на основе внутренней изменчивости [4, с. 4]. Использование контрольных карт позволяет осуществлять непрерывный мониторинг результатов анализа и вовремя обнаруживать критические отклонения от стабильного состояния, устранять неслучайные причины, предотвращать их накопление и влияние на качество лабораторного процесса [1, с. 244, 247].

Целью настоящей работы явилась оценка стабильности лабораторных исследований по выявлению маркеров инвазивных кандидоза и аспергиллеза у пациентов гематологической клиники с использованием контрольных карт.

Материалы и методы. Проведен анализ результатов определения маннанового антигена грибов рода *Candida* (133 постановки) и антител к нему

(60 постановок), галактоманнанового антигена грибов рода *Aspergillus* (72 постановки) за период с марта 2018 по март 2020 года. В качестве контрольных материалов для оценки стабильности лабораторных исследований использованы положительная сыворотка с известной концентрацией маннанового антигена, входящая в состав набора реагентов PLATELIA® Candida Ag Plus (BIO-RAD Laboratories Inc., США), калибратор R4b, содержащий 10 пг/мл антител к маннановому антигену, из набора реагентов PLATELIA® Candida Ab Plus (BIO-RAD Laboratories Inc., США), уровень среза R4 из набора реагентов PLATELIA® Aspergillus Ag Plus (BIO-RAD Laboratories Inc., США). Аналитическая система включала в себя: бокс биологической безопасности второго класса SC2 (Esco Micro Pte. Ltd., Сингапур), термостат твердотельный TDB-120 (Biosan, Латвия), микроцентрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия), промывочное устройство PW-40, инкубатор для микропланшетов IPS и фотометр iMarc с программным обеспечением Земфира 4.0 версия 1.4.8 (BIO-RAD Laboratories Inc., США). Исследования проводились двумя аналитиками.

Построение и интерпретацию контрольных карт осуществляли в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.05.2003 № 220 [10, 11 с. 9-12]. На X -карты наносили индивидуальные значения результатов испытаний, на R_m -карты – величины абсолютной разности результатов двух последовательных анализов. Положение центральной линии (CL) на X -карте и R_m -карте определялось по значениям среднеарифметического результатов 15 испытаний (\bar{X} и \bar{R}_m). Верхнюю и нижнюю контрольные границы (UCL и LCL) на X -карте определяли как $\bar{X} \pm 2,660 \cdot \bar{R}_m$, на R_m -карте – LCL принимали равной 0, UCL = $3,267 \cdot \bar{R}_m$. На X -карте, кроме верхней и нижней контрольных границ, откладывали 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием редактора Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc., США) и пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки нормальности

распределения признака применяли критерий Шапиро-Уилка. Проверку статистических гипотез осуществляли при уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. Система карт Шухарта опирается на следующее положение: если изменчивость процесса и среднее процесса остаются постоянными на своих уровнях, то наносимые на карту данные (X, R_m) изменяются случайным образом и редко выходят за контрольные границы. Так, при стабильной аналитической работе графическое изображение динамики показателей будет иметь вид колеблющихся около центральной линии точек, которые укладываются в интервал $\pm 2\sigma$. Выход результатов исследования за границы $\pm 3\sigma$ или формирование систематических трендов или структур указывают на потерю статистической управляемости процессом [1, с. 245], что требует проведения поиска возможных причин выявленных несоответствий и принятия мер для приведения лабораторного исследования в стабильное состояние.

Существует 8 основных критериев, указывающих на возникновение изменчивости процесса анализа исследования, а именно:

- критерий 1 – одна точка вне зоны $\pm 3\sigma$;
- критерий 2 – девять точек подряд в зоне $\pm 1\sigma$ или по одну сторону от центральной линии;
- критерий 3 – шесть возрастающих или убывающих точек подряд;
- критерий 4 – четырнадцать попеременно возрастающих и убывающих точек;
- критерий 5 – две из трех последовательных точек в зоне $\pm 3\sigma$ или вне ее;
- критерий 6 – четыре из пяти последовательных точек в зоне $\pm 2\sigma$ или вне ее;
- критерий 7 – пятнадцать последовательных точек в зоне $\pm 1\sigma$, выше и ниже центральной линии;
- критерий 8 – восемь последовательных точек по обеим сторонам центральной линии и ни одной в зоне $\pm 1\sigma$ [4, с. 39].

Перед построением контрольных карт результаты испытаний проверяли на соответствие закону нормального распределения. Рассчитанные значения p были выше принятого уровня значимости 0,05: $p = 0,17$ и $p = 0,24$ для результатов определения маннанового антигена и антител к нему; $p = 0,09$ для результатов выявления галактоманнанового антигена, что подтверждало нормальность распределения признаков в изучаемых группах и позволило перейти к построению контрольных карт (рисунки 1, 2, 3).

За исследуемый период значение концентрации маннанового антигена в образце R5, установленное производителем, менялось от 210 до 384 пг/мл в зависимости от серии набора реагентов. В связи с этим построение контрольных карт проводили по относительным значениям концентрации антигена в контрольном образце (%). Для этого рассчитывали отношение фактического содержания маннанового антигена к номинальному, указанному в паспорте к тест-системе. На рисунке 1 представлены X -карта и R_m -карта результатов лабораторных исследований по определению маннанового антигена грибов рода *Candida*.

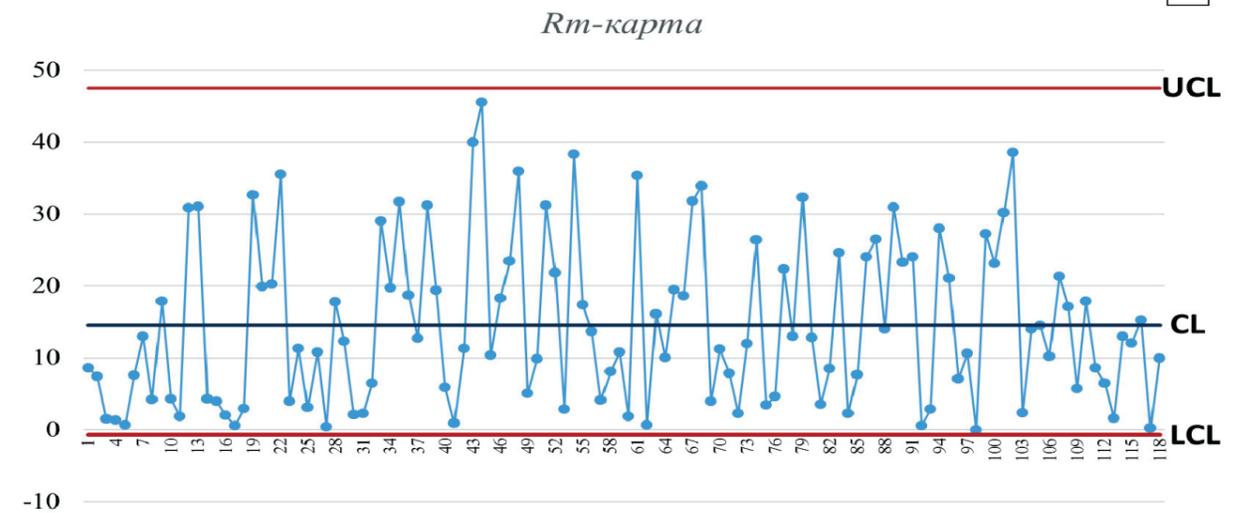
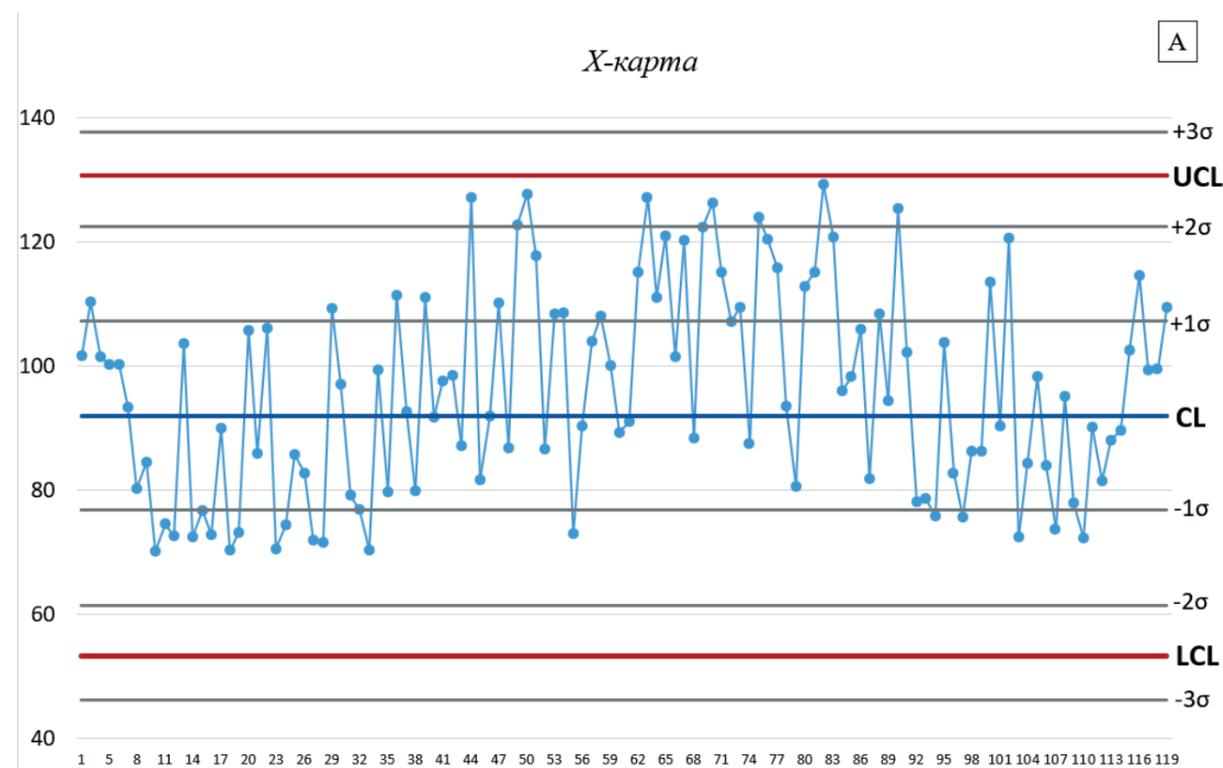


Рисунок 1. Контрольные карты, построенные по результатам определения маннанового антигена грибов рода *Candida*. Ось ординат на X -карте – значения содержания маннанового антигена, % (А), на R_m -карте – значения скользящих размахов содержания маннанового антигена, % (Б); ось абсцисс – порядковый номер исследования. UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы, CL – центральная линия, σ – стандартное отклонение

Среднее значение относительной концентрации маннанового антигена в контрольном образце R5, по данным установочной серии испытаний, составило 92 % и находилось внутри интервала допустимых отклонений показателя от 70 до 130 %, установленного производителем тест-системы. Данные выявления маннанового антигена на X -карте (рисунок 1А) находились внутри диапазона, определяемого верхней и нижней контрольными границами, и равномерно располагались относительно центральной линии CL (выше 46 %, ниже 54 %). Трендов, предупреждающих о возникновении систематических ошибок в методике испытаний, не выявлено. Незначительное количество результатов (6 % от общего числа определений) находилось в зоне $\pm 3\sigma$ за «пределами предупреждения» (испытания 44, 50, 65, 73, 84, 91), однако их расположение было не последовательным и не указывало на возможное появление случайных отклонений. На R_m -карте (рисунок 1Б) не выявлено значений скользящего размаха, выходящих за верхнюю контрольную границу, что свидетельствовало о том, что смена аналитиков не влияет на стабильность

лабораторных исследований. По результатам проведенного анализа \bar{X} -краты и R_m -карты сделан вывод о статистически контролируемом состоянии лабораторных исследований при определении маннанового антигена грибов рода *Candida* в образцах сыворотки крови пациентов.

Среднее значение содержания антител к маннановому антигену в калибраторе R4b, по данным установочных испытаний, составило 9,74 пг/мл и было близким к номинальному – 10 пг/мл. Верификацию результатов анализа проводили согласно инструкции по применению тест-системы. Так, рассчитанные значения отношений оптической плотности двух соседних точек калибровочной кривой находились внутри установленных диапазонов и свидетельствовали о правильности полученных результатов. Однако на \bar{X} -карте (рисунок 2 А) в интервале испытаний 1-9 выявлено отклонение лабораторного процесса, соответствующее критерию 2 (9 последовательных точек расположены по одну сторону от центральной линии). Выявленный систематический тренд колебания размаха предостерегал о выходе процесса из управляемого состояния.

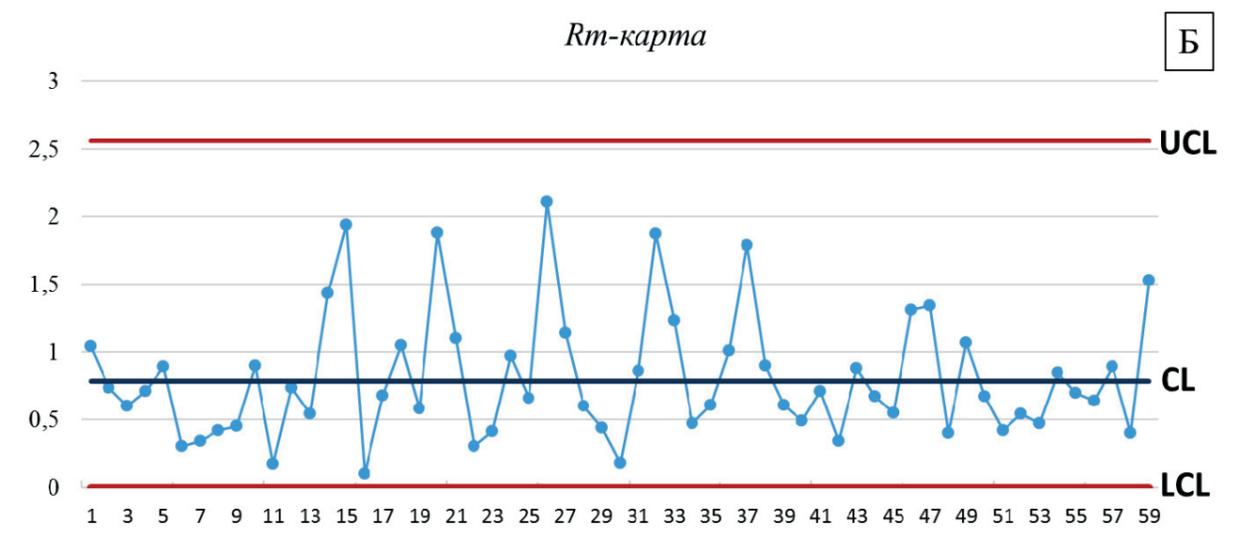
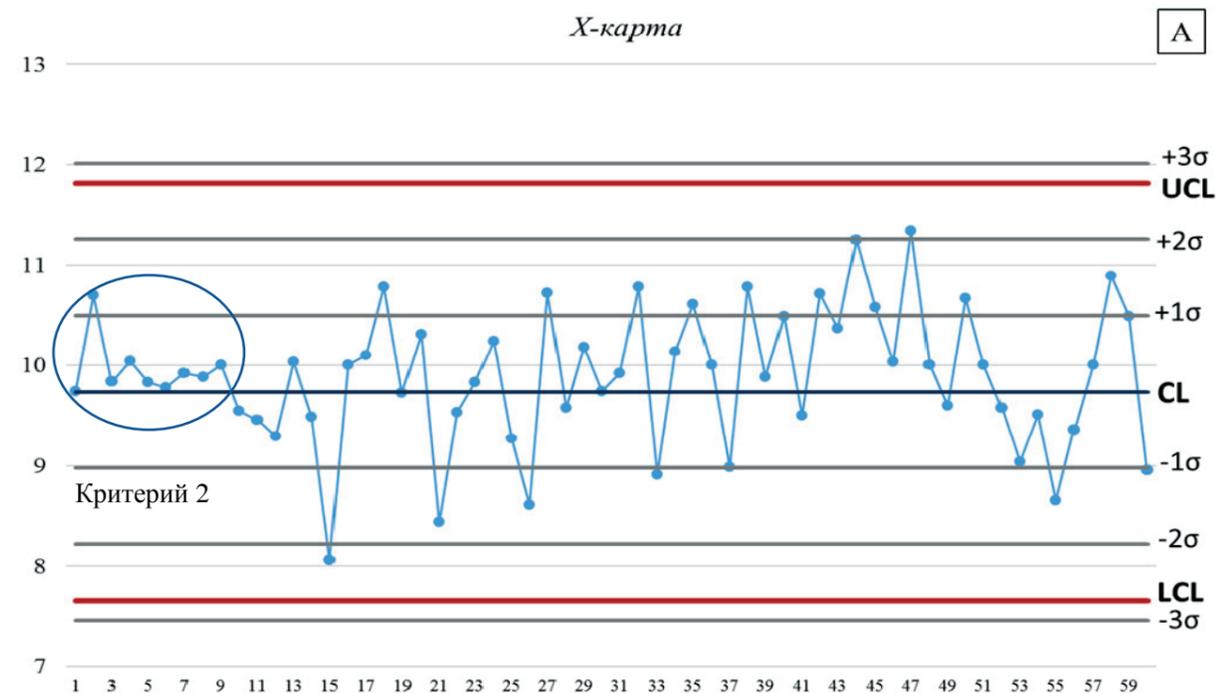


Рисунок 2. Контрольные карты, построенные по результатам определения антител к маннановому антигену грибов рода *Candida*. Ось ординат на \bar{X} -карте – значения содержания антител к маннановому антигену грибов рода *Candida*, пг/мл (А), на R_m -карте – значения скользящих размахов содержания антител к маннановому антигену грибов рода *Candida*, пг/мл (Б); ось абсцисс – порядковый номер исследования. UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы, CL – центральная линия, σ – стандартное отклонение

К возможной причине установленной тенденции завышения результата мы отнесли нестабильную работу промывающего устройства PW-40. После своевременно проведенного техобслуживания достигнута стабилизация лабораторного процесса.

На R_m -карте (рисунок 2Б) отклонений значений скользящих размахов содержания антител к маннановому антигену за пределы верхней контрольной границы, указывающих на влияние смены аналитика на качество исследования, нет, систематических структур не выявлено.

В результате исследований по выявлению галактоманнанового антигена грибов рода *Aspergillus* установлено, что среднее значение оптической плотности уровня среза составило 0,540 (CL) и находилось внутри допустимого интервала от 0,3 до 0,8. Согласно представленным на рисунке 3А данным, все значения, кроме одной точки (исследование 41), находились в интервале нижней и верхней контрольных границ. Выявленный случай еще нельзя было

отнести к критерию 1, так как значение находилось внутри зоны 3σ . Мы продолжили наблюдение: следующие две постановки анализа характеризовались значениями, очень близкими к среднему, дальнейшее распределение результатов также не выявило предупреждающих отклонений в процессе лабораторного исследования образцов сыворотки крови и лаважной жидкости на наличие галактоманнанового антигена.

Графические данные, представленные на R_m -карте (рисунок 3Б), также свидетельствовали о стабильности процесса лабораторных исследований.

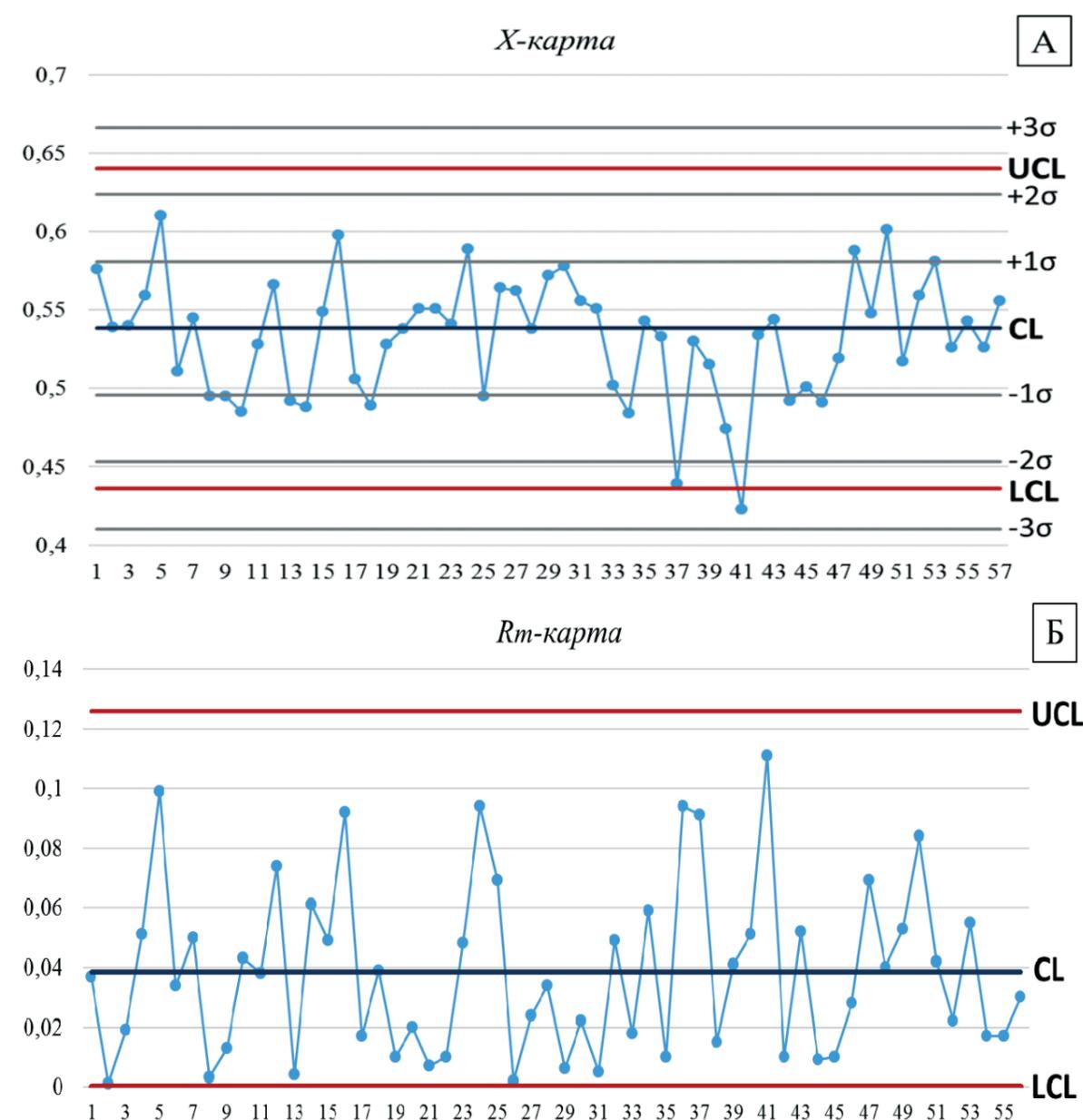


Рисунок 3. Контрольные карты, построенные по результатам определения галактоманнанового антигена в сыворотке и лаважной жидкости. Ось ординат на X-карте – значения содержания галактоманнанового антигена, ось абсцисс – порядковый номер исследования. Ось ординат на R_m -карте – значения размахов содержания галактоманнанового антигена, ось абсцисс – порядковый номер исследования. UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы, CL – центральная линия, σ – стандартное отклонение

Таким образом, в исследуемый период (март 2018 – март 2020 года) применение контрольных карт подтвердило стабильность лабораторных исследований по выявлению маркеров грибковых инфекций в образцах сыворотки крови и лаважной жидкости пациентов гематологической клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Непрерывный мониторинг результатов анализов позволил выявлять признаки отклонения лабораторного процесса от стабильного состояния и своевременно предпринимать меры по недопущению возникновения систематических (неслучайных) ошибок, влияющих на качество лабораторных исследований.

Список литературы

1. Алексеева И.А., Перелыгина О.В., Колышкина Е.Д. Оценка стабильности производства коклюшного компонента АКДС-вакцины по показателям иммуногенной активности и специфической безопасности с использованием карт Шухарта // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – No 4 (18). – С. 243-248.
2. Багирова Н.С. Роль грибковых инфекций в современной клинике // Злокачественные опухоли. – 2013. – No 2 (6). – С. 3–11.
3. Васильева Н.В., Клишко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. – 2010. – С. 5–18.

4. ГОСТ Р ИСО 7870-2 – 2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта (ISO 7870-2: 2013, IDT). – М.: Стандартиформ, 2016. – 46 с.
5. Клинико-иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у больных с лимфомой Ходжкина / О.В. Шадринова, Е.В. Фролова, Л.В. Филиппова [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2014. – No 2 (7). – С. 233–238.
6. Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / О.Г. Корнилова, Е.А. Хуснатдинова, Е.С. Коновалова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – No 2 (19). – С. 118–123.
7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26 мая 2003 г. N 220 об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» [Электронный ресурс]. – URL: <http://base.garant.ru/4179445/> (дата обращения 15.04.2020).
8. Combined detection of mannanaemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species / B. Sendid, J. L. Poirot, M. Tabouret [et al.] // Journal of medical microbiology. – 2002. – Vol. 51. – P. 433–442.
9. Lange on behalf of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management / D.W.

Denning, J. Cadranet, C. Beigelman-Aubry [et al.] // European Respiratory journal. – 2016. – No 47. – P. 45–68.

10. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I / B.P. Guery, M.C. Arendrup, G. Auzinger [et al.] // Epidemiology and diagnosis. Intensive Care. – 2009. – No 35. – P. 55–62.
11. Vardakas K.Z., Michalopoulos A., Kiriakidou K.G. Candidaemia: incidence, risk factors, characteristics and outcomes in immunocompetent critically ill patients // Clinical microbiology and infection. – 2009. – No 15. – P. 289–292.
12. Wheat J., Walsh T.J. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by galactomannan Antigenemia Detection using an enzyme immunoassay // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2008. – No 27. – P. 245–251.

УДК:616-006.411

Тематический рубрикатор: 76.03.33, 76.33.29

CD163 И CD68 ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ ПРИ НОДУЛЯРНОМ СКЛЕРОЗЕ КЛАССИЧЕСКОЙ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

Минаев Максим Сергеевич

младший научный сотрудник лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

minaev@niigpk.ru

Перфилова Елена Александровна

кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

perfilova@niigpk.ru

Дьяконов Дмитрий Андреевич

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

dyakonov@niigpk.ru

Креницына Екатерина Евгеньевна

кандидат медицинских наук, врач-гематолог научно-клинического отдела
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

krinitsyna@niigpk.ru

CD163 AND CD68 EXPRESSING CELLS IN NODULAR SCLEROSIS OF CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA

Maxim Minaev

junior Researcher, Laboratory of Pathomorphology The Federal State-Financed
Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Perfilova

candidate of Veterinary Sciences, Junior Researcher, Laboratory of
Pathomorphology The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research
Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological
Agence, Kirov

Dmitry Dyakonov

candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology The
Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology
and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Ekaterina Krinitsyna

candidate of Medical Sciences, hematologist of the scientific and clinical department
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence,
Kirov

АННОТАЦИЯ

Статья посвящена количественной и качественной оценке макрофагально-гистиоцитарных элементов при варианте нодулярного склероза классической лимфомы Ходжкина. Иммуногистохимическим исследованием 30 случаев с применением маркеров CD163 и CD68 установлено различие в расположении макрофагов в нодулях лимфоузлов. Определена зависимость экспрессии CD163 и течения заболевания. Полученные данные могут использоваться в качестве дополнительных морфологических критериев прогнозирования ответа на терапию первой линии.

ABSTRACT

The article is devoted to the quantitative and qualitative assessment of macrophage-histiocytic elements in nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma. An immunohistochemical study of 30 cases using CD163 and CD68 markers found a difference in the location of macrophages in the lymph nodes. Also, it is worth noting the dependence of the expression of CD163 from the disease course. The results of the research may be used as additional morphological criteria for predicting a response to first-line therapy.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина; маркеры; CD163; CD68.

Keywords: Hodgkin's lymphoma; markers; CD163; CD68.

Классическая лимфома Ходжкина (кЛХ) – моноклональная В-клеточная лимфоидная опухоль с выраженным реактивным полиморфноклеточным микроокружением. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, выделено четыре гистологических подтипа данного заболевания: богатый лимфоцитами (5-6% от всех случаев кЛХ), нодулярный

склероз (60-80%), смешанно-клеточный (15-30%) и лимфоидное истощение (менее 1%) [2, с.91]. Патологический процесс характеризуется относительно благоприятным прогнозом. Тем не менее примерно в 20% случаев отмечается отсутствие ответа на первичное лечение, что ведет к развитию рецидивов, даже несмотря на проведение высокодозной полихимиотерапии (ВДПХТ) и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

К наиболее часто встречающемуся варианту кЛХ относится нодулярный склероз, характеризующийся развитием в лимфатических узлах коллагеновых фиброзных тяжей, формирующих нодули, внутри которых локализуются крупные опухолевые элементы, развивающиеся из В-клеток герминативного центра фолликула: многодольчатые клетки Рид-Штернберга и одноядерные клетки Ходжкина. В значительном количестве в лимфоидной ткани представлен реактивный неоднородный фон опухолевого микроокружения: Т- и В-лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, плазмциты, а также макрофагально-гистиоцитарные элементы [1, с.11].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению вопроса взаимосвязи опухолевого субстрата с клетками микроокружения. Активно исследуются так называемые «тумор-ассоциированные» карициты, представленные преимущественно макрофагами и гистиоцитами. Известно, что они являются основными клетками врожденного иммунитета и регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с субстратом опухоли и с другими компонентами микроокружения, пролиферацию опухолевого субстрата и ангиогенез. Ряд авторов указывает на участие макрофагально-гистиоцитарных элементов в запуске и координации ранних этапов иммунного ответа на опухоль.

В последние годы активно накапливаются данные о роли CD163+ и CD68+ позитивных макрофагов при кЛХ в качестве предикторов течения заболевания. Известно, что маркер CD163 достаточно специфичен и проявляет экспрессию преимущественно в макрофагах и гистиоцитах. CD68, в свою очередь, используется в качестве идентификатора клеток моноцитарной/макрофагальной

линии, однако является относительно неспецифичным и также может экспрессировать на гранулоцитарных и дендритных клетках, фибробластах, клетках Купфера и остеокластах [4, с.5].

При изучении CD163-экспрессирующих клеток отмечено, что гиперэкспрессия антигена CD163 на «тумор-ассоциированных» клетках считается значимым прогностическим биомаркером течения нодулярного склероза кЛХ. Выявлено, что уровень экспрессии данного белка значительно коррелирует с рецидивом заболевания и общей выживаемостью пациентов [3, с.69]. В результате оценки профиля гена макрофагальных элементов установлено, что усиление экспрессии CD68 в гистологических препаратах связано со снижением беспрогрессивной выживаемости и повышением вероятности рецидива после ВДПХТ и трансплантации аутологичных стволовых клеток [5, с.299]. Однако результаты исследований отчасти противоречивы, преимущественно носят описательный характер и не нашли своего применения в повседневной практике [6, с.577; 5, с.300; 7, с.880].

Таким образом, актуальным и целесообразным остается изучение значения клеток опухолевого микроокружения при кЛХ. Дальнейшее исследование роли локализации CD163 и CD68 макрофагов на уровне гистоархитектоники расширит представление о взаимодействии «тумор-ассоциированных» клеток с опухолевым субстратом. Применение морфометрического подсчета относительного содержания карицитов с использованием современного программного обеспечения анализа изображений позволит более точно прогнозировать течение нодулярного склероза кЛХ в зависимости от уровня CD163- и CD68-экспрессирующих элементов.

Цель работы - определить прогностическое значение CD163- и CD68-экспрессирующих клеток при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина.

Материалы и методы. Для исследования отобраны архивные парафиновые блоки лимфатических узлов 30 пациентов с вариантом нодулярного склероза кЛХ. Все больные наблюдались в клинике ФГБУН

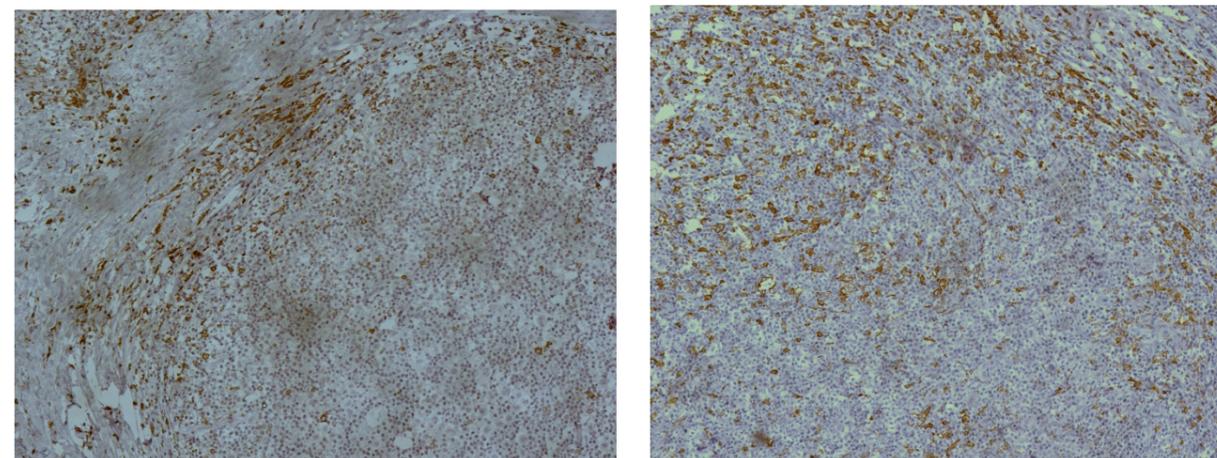
КНИИГиПК ФМБА России в период с 2011 по 2018 гг. Медиана возраста 35 лет (21-72 года). Обследуемые разделены на 2 группы: группу 1 (n = 19) составили пациенты, достигшие полной ремиссии при проведении стандартной полихимиотерапии 1 линии по схеме BEACOPP (условно благоприятное течение заболевания). Во 2 группу (n = 11) включены пациенты с рефрактерностью к химиотерапии или минимальным ответом на терапию первой и последующих линий, впоследствии получивших аутологичную или аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (условно неблагоприятное течение КЛХ).

Для идентификации и визуализации CD163- и CD68-позитивных клеток в исследуемом материале использован иммуногистохимический метод окрашивания. Иммунореактивность первичных моноклональных антител CD163 (клон MRQ-26, «Cell Marque», США) и CD68 (клон PG-M1, «Dako», Дания) выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой, входящей в набор реактивов EnVISION+ («Dako»). Постановка реакций осуществлялась по стандартной методике в соответствии с протоколом систем визуализаций «Dako». Патоморфологическую оценку и морфометрический подсчет относительного числа CD163- и CD68-экспрессирующих макрофагов выполнялась на световом микроскопе «Leica DM 1000» (Германия) со встроенной фото- и видеокамерой с помощью программного обеспечения анализа изображений ImageScore Color, версии M, с окулярами x10, при объективах x4, x10, x40, x100. Исследования для каждого образца проводилось в 10 полях зрения.

Для статистической обработки данных применяли программу STADIA. При сравнении количественных показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, коэффициент корреляции Спирмена (r_s). При оценке качественных признаков воспользовались методом χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. В случаях малого числа наблюдений анализ проводился с помощью точного двустороннего критерия Фишера (F). Результаты исследований представлены с указанием медианы, а также верхнего и нижнего квартилей для

каждой группы. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

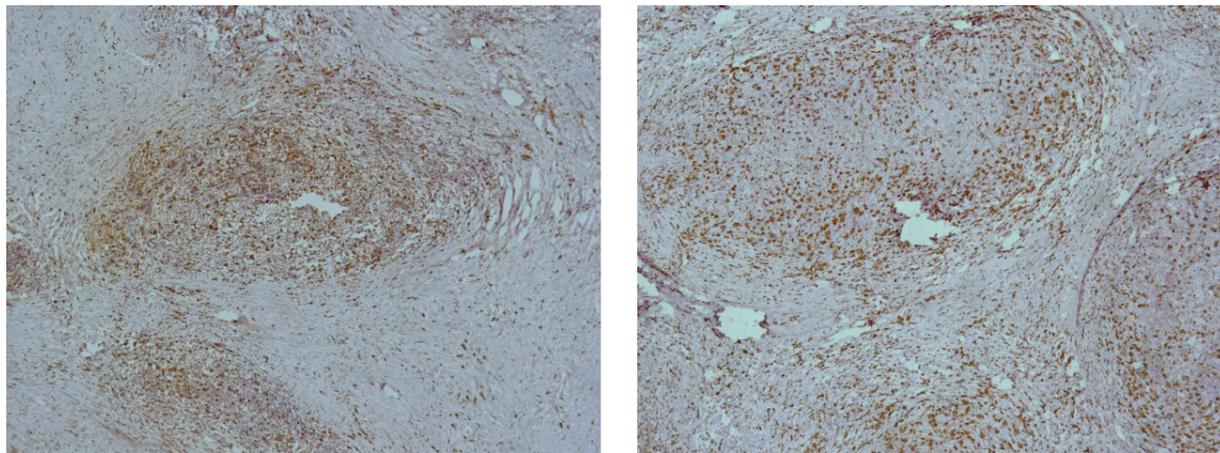
Результаты исследований. В результате изучения в гистологических срезах лимфатических узлов CD163-экспрессирующих макрофагов определены различия в характере расположения и относительном количестве клеток у пациентов обеих исследуемых групп. Так, у больных 1 группы макрофаги в препарате локализовались неравномерно по срезу, в виде небольших или умеренных очаговых скоплений, с эксцентричным распределением по отношению к лимфоидным нодулям. У обследуемых 2 группы CD163-позитивные элементы находились преимущественно на границе между фиброзными тяжами и нодулями (циркулярно по периферии нодуля), что напоминало своего рода «барьер», ограждающий опухолевый субстрат от условно здоровой ткани (рис. 1 и 2).



а

б

Рисунок 1. Расположение CD163 позитивных макрофагов в лимфатическом узле у пациентов 1 группы (а) и 2 группы (б), x 200



a

б

Рисунок 2. Расположение CD68 экспрессирующих элементов в лимфатическом узле у пациентов 1 группы (а) и 2 группы (б), x 200

При изучении гистологических стеклопрепаратов лимфатических узлов также определены различия в характере локализации и относительном количестве CD68-положительных клеток. У больных, достигших полной ремиссии при проведении стандартной полихимиотерапии, макрофаги располагались исключительно в центральных областях, сформированных фиброзных нодулей. Клетки локализовались в виде небольших умеренно плотных скоплений, а также распределялись дискретно. У пациентов 2 группы CD68-позитивные карициты в небольшом количестве располагались в центральной области нодуля и в значительно большем содержании находились в его периферической части, формируя своеобразный «барьер», что визуально сравнимо с таковым, при оценке CD163-экспрессирующих элементов.

В результате морфометрического подсчета доли «тумор-ассоциированных» клеток выявлены статистически значимые различия относительного количества CD163- и CD68 - экспрессирующих макрофагов в сравниваемых группах (схемы 1 и 2). У пациентов 1 группы медиана CD163+ клеток статистически значимо ниже по сравнению с больными, рефрактерными к проводимому лечению или имеющими минимальный ответ на химиотерапию первой и

последующих линий: 6,0% (5,2-7,4) против 17,5% (14,0-20,8) соответственно, $p = 0,001$. У пациентов, достигших полной ремиссии, медиана карицитов с экспрессией к CD68 значительно выше, чем во 2 группе: 11,0% (10,6-13,8) к 9,0% (8,0-10,0) соответственно, $p = 0,005$.

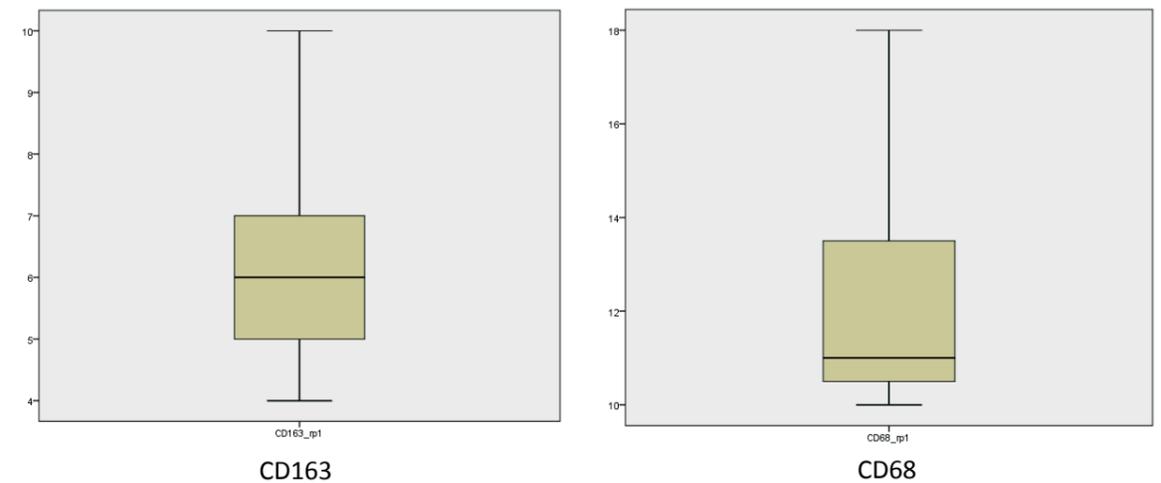


Схема 1. Относительное содержание CD163 и CD68 позитивных макрофагов в лимфоузлах у пациентов 1 группы

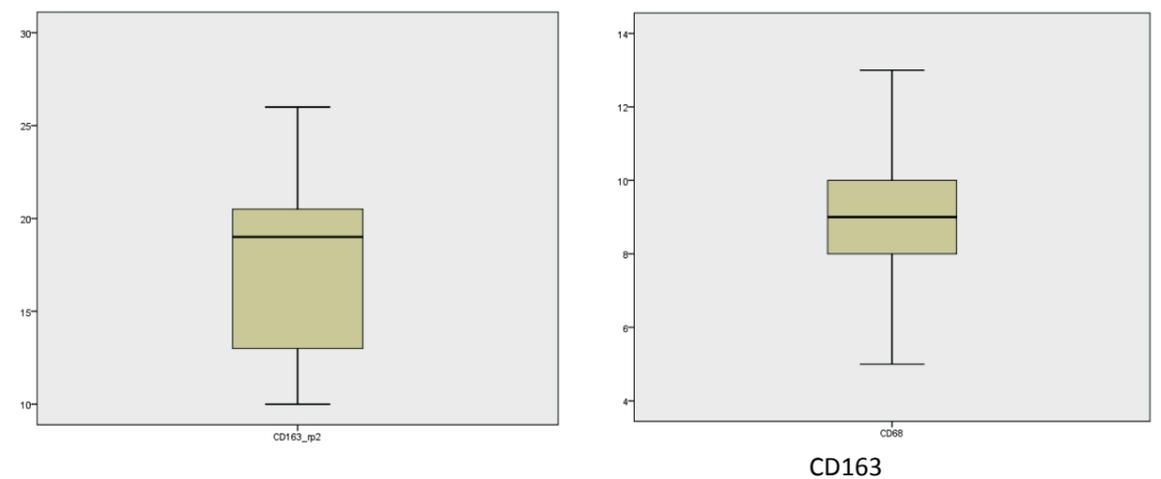


Схема 2. Относительное содержание CD163 и CD68 позитивных макрофагов в лимфоузлах у пациентов 2 группы

При статистической обработке данных была установлена зависимость уровня экспрессии CD163-позитивных клеток и течения заболевания. Так, низкая экспрессия CD163+ макрофагов отмечалась в группе с условно благоприятным течением болезни. Высокая экспрессия этого маркера отмечена в группе пациентов с рефрактерностью к химиотерапии или минимальным ответом на терапию первой и последующих линий (условно неблагоприятное течение кЛХ). Между сопоставляющимися признаками отмечалась относительно сильная корреляционная связь ($r_s=0,932$, при $p=0,001$). Пол и возраст больных не имели статистически значимой зависимости от уровня экспрессии CD163-позитивных клеток.

Обсуждение. «Тумор-ассоциированные» макрофаги, несомненно, играют важную роль в прогнозе течения кЛХ, о чем сообщают различные зарубежные авторы [4,5,6,7]. Несмотря на определенные противоречивые результаты, опухолевому микроокружению при данной патологии уделяется большое внимание в разных областях лабораторной диагностики. В нашем исследовании использовано иммуногистохимическое окрашивание маркеров макрофагов/моноцитов CD163 (клон MRQ-26) и CD68 (клон PG-M1) для сопоставления их относительного количества и морфологических характеристик в 30 случаях нодулярного склероза кЛХ.

Маркер CD68 представляет собой гликопротеин, используемый в качестве маркера моноцитов/макрофагов, но является относительно неспецифичным. Он также может окрашивать миелоидные клетки, дендритные элементы, фибробласты, клетки Лангерганса и другие. Моноклональное антитело CD163 является специфичным маркером для линии моноцитов/макрофагов и представляет более информативную иммуногистохимическую картину. Артефакты при окрашивании и своеобразные «пятна», которые неспецифически экспрессируют «фоновые клетки», в том числе элементы стромы, усложняют точность морфометрического анализа. Изменчивость окрашивания от одной области среза к другой усложняет подсчет. Оптимизация иммуногистохимических реакций позволит выделять отдельный клеточный

пул, представляющий интерес для морфометрии.

Поскольку наше исследование выполнено исключительно на срезах лимфоузлов больных нодулярным склерозом кЛХ, при которой области, богатые опухолевым субстратом, ограничены фиброзными тяжами, это упростило оценку иммуногистохимических маркеров, ограничивая градацию этими узлами. В результате морфометрического анализа выявлено, что относительное количество CD163+ экспрессирующих клеток у больных 1 группы статистически значимо меньше, чем у пациентов 2 группы. Напротив, доля CD68-позитивных элементов у обследуемых, достигших полной ремиссии, значительно выше, чем у больных, рефрактерных к проводимому лечению или имеющих минимальный ответ на химиотерапию первой и последующих линий. Из особенностей гистоархитектоники и иммунофенотипической картины рисунка лимфатических узлов, установлены особенности расположения CD163 и CD68 клеток в гистологических препаратах.

Локализация «тумор-ассоциированных» макрофагов проявлялась небольшими или умеренными очаговыми скоплениями с эксцентричным распределением кариоцитов по отношению к лимфоидным нодулям, либо локализованных преимущественно на границе между фиброзными тяжами и нодулями (циркулярно по периферии нодуля). Данная картина выглядела подобием «барьера», сформированного макрофагами, ограждающего опухолевый субстрат от условно здоровой ткани. При сравнении уровня экспрессии CD163 и течения заболевания определена относительно сильная связь ($r_s=0,932$, при $p=0,001$). Это может указывать на зависимость прогноза течения нодулярного склероза кЛХ от количества «тумор-ассоциированных» макрофагов. Принцип морфометрического анализа, использованного в работе, отличается от такового у исследователей из Южной Кореи и Саудовской Аравии [3, 5]. В то же время важность изучения количественного содержания ассоциированных с опухолью макрофагов показана в исследованиях, проведенных в Чехии и США. Следует отметить, что полученные иностранным авторами результаты имеют определенное сходство с нашими данными [4, 6].

Использование CD163 и CD68 иммуногистохимических маркеров «тumor-ассоциированных» макрофагов позволяет на этапе первичной диагностики ЛХ прогнозировать благоприятный и неблагоприятный варианты течения заболевания, что является предпосылкой для определения подхода к терапии на этапе инициального лечения.

Выводы. Установлено, что характер тканевого распределения, а также количественный подсчет субпопуляционного состава реактивного макрофагального микроокружения опухолевой ткани у больных нодулярным склерозом классической ЛХ могут использоваться в качестве дополнительных морфологических критериев прогнозирования ответа на терапию первой линии. При благоприятном прогнозе течения заболевания макрофаги в препарате локализовались неравномерно по срезу в виде небольших или умеренных очаговых скоплений с эксцентричным распределением клеток по отношению к лимфоидным нодулям. Для пациентов с рефрактерной формой кЛХ характерным оказалось расположение CD163-позитивных элементов преимущественно на границе между фиброзными тяжами и нодулями (циркулярно по периферии нодулей). Повышение относительного количества CD163 экспрессирующих кариоцитов и снижение доли CD68 макрофагов типично для больных с минимальным ответом на стандартную терапию 1 линии. Полученные данные могут быть использованы при стратификации пациентов с нодулярным склерозом кЛХ на группы риска и определении персонализированных подходов к лечению. Иммуногистохимическое определение CD163 и CD68 маркеров может использоваться в комплексной диагностике причин рефрактерности.

Список литературы

1. Поддубная И.В., Савченко В.Г. Лимфома Ходжкина. В кн.: Российские рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. М.: Буки Веди, 2018. - 356с.

2. Смирнов В.П., Романов В.С. Клинико-морфологические параллели при классической лимфоме Ходжкина// Медицинский альманах. - 2017. - Т.47, №2. С.91-95.

3. CD163 is a predictive biomarker for prognosis of classical Hodgkin's lymphoma in Saudi patients / Huda al Sayed Ahmed, Wasim Fawzi Raslan, Abdel Halim Salem Deifalla [et al.] // Molecular and Clinical Oncology. - 2019. - № 11. - P. 67-76.

4. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma / J. A. Harris, S. Jain, Q. Ren [et al.] // Diagnostic Pathology. - 2012. - №12. - P. 2-6.

5. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma / D.H. Yoon, Y.W. Koh, H.J. Kang [et al.] // Eur. J. Haematol. - 2012. - № 4.- P. 292 -305.

6. The lymphoma-associated macrophage to Hodgkin-Reed-Sternberg cell ratio is a poor prognostic factor in classic Hodgkin lymphoma / V. Procházka, T. Papajík, T. Dýsková [et al.] // Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. - 2019. - № 10. - P. 573-580.

7. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma / C. Steidl, T. Lee, P. Sohrab [et al.] // The New England journal of medicine. - 2010.- №10. - P. 875-885.

УДК: 616-006.446.8:616-006.446.2

Тематический рубрикатор: 76.29.33

ИНФЕКЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ЭТАПА ИНДУКЦИИ РЕМИССИИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Никитин Евгений Николаевич

*д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии с курсами эндокринологии и гематологии Ижевской государственной медицинской академии, г. Ижевск
nikitinen@list.ru*

Кузяев Михаил Валерьевич

заведующий отделением, врач – бактериолог высшей квалификационной категории БУЗ УР «Первая Республиканская клиническая больница МЗ УР», г. Ижевск

Грязева Елизавета Михайловна

студентка 5 курса лечебного факультета Ижевской государственной медицинской академии, г. Ижевск
liza.gryazeva.97@mail.ru

Ходырев Кирилл Леонидович

студент 5 курса лечебного факультета Ижевской государственной медицинской академии, г. Ижевск
hodyreff.kirill@yandex.ru

INFECTIOUS COMPLICATIONS OF THE REMISSION INDUCTION

STAGE IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

Yevgeny Nikitin

doctor of medical Sciences, Professor of the Department of faculty therapy with courses in endocrinology and Hematology of Izhevsk state medical Academy, Izhevsk

Mikhail Kuzyaev

head of the Department, doctor-bacteriologist of the highest qualification category of BUZ UR "First Republican clinical hospital of the Ministry of health of UR", Izhevsk

Elizaveta Gryazeva

5th year student of the medical faculty of Izhevsk state medical Academy, Izhevsk

Kirill Khodyrev

5th year student of the medical faculty of Izhevsk state medical Academy, Izhevsk

АННОТАЦИЯ

В статье рассмотрены инфекционные осложнения у пациентов, возникающие в период индукции ремиссии острых лейкозов, и проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов.

ABSTRACT

The article deals with infectious complications in patients that occur during the induction of remission of acute leukemia and problems of antibiotic resistance of microorganisms.

Ключевые слова: острый лейкоз; инфекционные осложнения; антибиотикорезистентность; β-лактамазы расширенного спектра.

Keywords: acute leukemia; infectious complications; antibiotic resistance; extended-spectrum β-lactamases.

В процессе лечения острых лейкозов у пациентов часто возникают иммунодефицитные состояния, чем объясняется большая частота инфекционных осложнений, нередко приводящих к летальным исходам. Частота инфекционных осложнений при цитостатической терапии гемобластозов составляет от 80% и более, причем их этиологическая структура постоянно претерпевает изменения в результате интенсификации методов цитостатического и антимикробного воздействия [1 – 3, 6].

Цель: оценить характер инфекционных осложнений периода цитостатической миелосупрессии на этапе индукции ремиссии у пациентов с острыми лейкозами.

Материал и методы. Проанализированы 53 клинических случая острых лейкозов у больных, пролеченных в гематологическом отделении БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» г. Ижевска. Большинство пациентов (48; 90,57%) страдали острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), в том числе – (24; 45,29%) острым промиелоцитарным (ОПЛ), остальные (5; 9,43%) - острым Т- и В- лимфобластным (Т-ОЛЛ, В-ОЛЛ). Среди них было 32 женщины и 19 мужчин в возрасте 19 – 71 (45,85±2,13) год. Диагностику и лечение пациентов с острыми лейкозами осуществляли согласно национальным клиническим рекомендациям [4, 5]. Схема 7+3 является стандартом индукционной химиотерапии (ХТ) для больных ОМЛ. Она включает в себя 7-дневное введение цитарабина в дозе 100-200 мг/м² либо 2

раза в сутки короткой инфузией, либо в виде непрерывной внутривенной инфузии в сочетании с 3-дневным введением антрациклинов (даунорубицина в дозе 60 мг/м², или идарубицина в дозе 12 мг/м², или митоксантрона 10 мг/м²). Индукционная ХТ ОПЛ базировалась на сочетанном применении полностью транс-ретиноевой кислоты (АТРА) в дозе 45 мг/м² и схемы 7+ 3 [5]. При острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) лечение проводили по протоколу ALL-2009 [4]. Полные ремиссии после 1 курса/фазы индукционной ХТ получены у 31 (58,49%) пациента, а после 2 – у 9 (16,98%). Летальных исходов всего было 13 (24,53%): у 12 больных ОМЛ и одного – с ОЛЛ. В период проведения 1 курса/фазы ХТ умерли 8 (15,09%) больных ОМЛ/ОЛЛ, а в период 2 курса\фазы – 5 (9,43%). В 9 случаях смерть пациентов была связана с тяжелыми инфекционными осложнениями (пневмонии, сепсис), в 4 – с геморрагическими (коагулопатии, ДВС синдром).

При выявлении очага инфекции или при температуре тела выше 38⁰С внутривенно назначались антибиотики первого этапа (цефоперазон/сульбактам). Модификация противомикробного лечения осуществлялась на основе микробиологических исследований, а при сохраняющейся лихорадке неясного генеза антибиотики первого этапа заменялись карбапенемами (имипенем/циластатин, меропенем) [4,5].

Для выявления возбудителей инфекций был проведен бактериологический анализ биологических проб крови, мочи, мазков из зева и глотки, мокроты, кала, в результате которого было получено 308 положительных проб. Кровь на гемокультуру при температуре 38⁰С и выше (повторно через 5-7 дней при сохранении температуры тела выше 38⁰С) забиралась из вены и из центрального венозного катетера в 2 флакона перед назначением антибиотиков. Гемокультуры исследовались в течение 5 суток на обогащенных средах, в частности BacT/AleRTFAPlus, предназначенных для инкубации в аппарате BacT/AleRT 3D. Посевы мокроты, мочи и отделяемого из ротоглотки были произведены на 5 % кровяной агар (КА), агар Эндо, агар Маккони, желточно-солевой агар (ЖСА), среду Сабуро. Результаты получали на КА, агарах

Маккони и Эндо в течение 1 дня; на ЖСА – в течение 2-х суток; на среде Сабуро – от 2 до 5 суток с ежедневным просмотром. Посевы кала производили на агаре Плоскирева, агаре Эндо, ЖСА с получением результатов в течение 1 суток. Идентификация и дифференциация полученных культур бактерий производилась ручным методом с помощью диагностических тест-систем «ДС-ДИФ-ЕНТЕРО» – для выявления энтерококков, «ДС-ДИФ-НЕФЕРМ» – грамтрицательных неферментирующих бактерий, «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» – микроорганизмов рода коринебактерий, в том числе контрольного штамма возбудителя дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), «Ауксолор» – клинически значимых грибов, «STREPTOtest 24» – микроорганизмов рода *Streptococcus*, *Enterococcus* и родственных им грамположительных каталазоотрицательных кокков, «NEISSERIAtest» – клинически значимых нейссерий, особенно *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* и *Moraxella catarrhalis*. Для определения типа возбудителя, обнаруженного в гемокультуре, использовался аппаратный метод с применением автоматического бактериологического анализатора MicroScanWalkAway 96. Чувствительность флоры к антибиотикам исследовалась диффузионно-дисковым методом. Статистическая обработка данных осуществлена по программе MSExcel 2010.

Результаты и их обсуждение. Для получения полной ремиссии 53 пациентам проведено 67 курсов/фаз индукционной ХТ (53 – 1 курс/фаза индукции и 14 – 2 курс/фаза индукции); все они сопровождались выраженной цитостатической гранулоцитопенией (нейтропенией менее 1,0x10⁹/л). Длительность миелотоксического агранулоцитоза составила 7– 27 (16,20±1,54) дней. После всех курсов проведенного цитостатического воздействия у каждого пациента (100%) выявлялось одно инфекционное осложнение или два одновременно возникших инфекций. В целом у 53 обследованных выявлено 87 инфекционных эпизодов, что составило 1,64 на одного больного. Частота и спектр инфекционных осложнений выглядели следующим образом: мукозит полости рта – 24 (27,58%) случая, пневмония – 16 (18,30%), септицемия – 15 (17,24%), лихорадка неясной этиологии – 12 (13,79%), инфекция

мочевыводящих путей – 7 (8,05%), поражение кишечника (мукозит, энтероколит) – 6 (6,90%), псевдомембранозный колит (токсины А и В *C.difficile*) – 2 (2,30%), инфекция кожи и мягких тканей (фурункул, парапроктит) – 2 (2,30%), гайморит - 2 (2,30%), острый ларингит – 1 (1,15%).

Пневмонии возникали в период глубокой цитостатической нейтропении ($0,20 - 1,0 \times 10^9$ /л) и во всех случаях начинались с повышения температуры тела до 38-40°C. Было характерным преобладание внелегочных проявлений пневмонии над легочными. В клинической картине у большинства больных (83,3%) присутствовали симптомы интоксикации (лихорадка, чувство жара, озноб, потливость, тахикардия, общая слабость, отсутствие аппетита), кашель сухой или реже с незначительным отделением мокроты, одышка. При объективном исследовании пневмонии отличались отсутствием четкой легочной симптоматики. Притупление перкуторного звука определялось лишь у четверти пациентов. Хрипы над зоной поражения удалось выслушать только у 41,7% больных, в остальных случаях аускультативная картина была представлена ослабленным дыханием. Диагностика пневмоний была затруднена. Обзорная рентгенография легких выявляла пневмонию лишь у 50% пациентов. Пневмонии обязательно верифицировались методом компьютерной томографии, когда в легких определялись односторонние или двусторонние локализованные и/или диффузные инфильтраты. Клинические и рентгенологические особенности пневмоний при агранулоцитозе объяснялись значительным снижением количества нейтрофилов в этот период, в результате чего в легких не формировался плотный воспалительный фокус, дающий четкую физическую и рентгенологическую картину [1, 3].

У пациентов с пневмонией преобладала бактериальная инфекция: основными возбудителями были *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps.aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) – по 3 (33,33%) случая для каждого вида микроба. В 4 (25,0%) случаях пневмоний наблюдалась смешанная флора в сочетании с септициемией, вызванной микроорганизмами *Escherichia coli* (*E. Coli*), *Staphylococcus lentus* (*St. lentus*), *Ps.aeruginosa*,

Acinetobacter baumannii (*Acinetobacter baum.*). Крайне тяжело протекающие пневмонии, осложненные сепсисом и инфекционно - токсическим шоком, с выраженной острой дыхательной недостаточностью, не чувствительные к комбинированной антибиотикотерапии и нуждавшиеся в ИВЛ, явились причиной смерти 9 пациентов в отделении реанимации, что согласовывалось с данными литературы [9,10]. По данным Wu C.L. et al. [10], наиболее частыми возбудителями пневмонии у пациентов, не ответивших на стартовую антибиотикотерапию и нуждающихся в ИВЛ, были *K. pneumoniae* и *Ps. aeruginosa*. Вторым по частоте возбудителем пневмонии среди пациентов отделения реанимации являлась *K. pneumoniae*, причем такая пневмония сопровождалась достоверно более высокой летальностью по сравнению с пневмококковой [9].

Частым инфекционным осложнением явился мукозит слизистой оболочки полости рта (24; 27,58%) и нижних отделов желудочно-кишечного тракта (8; 9,2%). Большинство случаев этих мукозитов (87,5%) соответствовало II-III степени тяжести, а 4 случая стоматита – IV степени тяжести по классификации ВОЗ. Чаще всего мукозиты развивались на 7–10 день от начала ХТ и продолжались на фоне нейтропении до 1,5 - 2 недель.

Инфекции, связанные с мукозитом, были часто обусловлены бактериальной флорой ротовой полости (*Str. viridans* – 45,83%, *St.aureus* - 8,33%, коагулазанегативным стафилококком - 12,5%, *E. faecium* – 4,17%, *K. pneumoniae* – 8,33%, *E.coli* – 8,33%, грибами рода *Candida* – 12,5%) и кишечника (стафилококки - 37,5%, *Clostridium difficile* – 25,0%, *K. pneumoniae* - 37,5%).

Наиболее часто симптомы орального мукозита проявлялись гиперемией, отеком, воспалением, эрозиванием и изъязвлением, что сопровождалось болью различной интенсивности, сухостью во рту, кровоточивостью, расстройствами вкуса и невозможностью адекватного приема пищи. Клинические признаки мукозита кишечника варьировали от умеренной диареи до симптомов тяжелого течения энтероколита с лихорадочным синдромом.

Наблюдались выраженная диарея с потерей жидкости и белка, боль в эпигастрии, околопупочной области и по фланкам живота, вздутие живота и отсутствие аппетита. Учащение акта дефекаций до 4-8 раз в сутки, изменение консистенции (жидкий, примесь слизи, крови) и увеличение объема кала, иногда появление тенезмов, болезненность при пальпации живота, что согласуется с данными литературы [2, 6].

Основной инфекцией мочевыводящих путей (ИМП) явился пиелонефрит, протекавший в 2 случаях в форме острого серозного воспаления, а в остальных 5 случаях - без яркой клинической картины, но с выраженными изменениями мочевого осадка. У больных с цитостатической нейтропенией ИМП в большинстве случаев вызывали *E.coli* (42,86%), *K. pneumoniae* (28,57%), реже – другие бактерии: *Enterococcus fecalis* (*E. fecalis*, 14,29%) и *Ps. aeruginosa* (14,29%), изолированно или в сочетании с кишечной палочкой. Колебания микробного числа в урокультурах исследуемых больных составляли от 10^5 до 10^7 КОЕ/мл. Острый пиелонефрит или обострение пиелонефрита сопровождалось лихорадкой до 39-40° С, ознобом, профузным потоотделением, болезненностью и защитным напряжением мышц спины и передней брюшной стенки, положительным симптомом Пастернацкого. В мочевом осадке выявлялась небольшая протеинурия, выраженная лейкоцитурия (до 10 в поле зрения и более), микрогематурия, кристаллурия (уратурия). Результаты наших исследований доказывают утверждение, что на фоне цитостатической иммуносупрессии условно патогенная флора становится возбудителем тяжелых инфекционных осложнений и поражение органов мочевого выделения протекает чаще бессимптомно [8].

Среди 308 биологических проб, давших положительные результаты, образцов с патогенными микроорганизмами было 96. Среди выявленных микроорганизмов 67,53% представляли грамположительные, а 24,35% – грамотрицательные палочки, грибы рода *Candida* составили 8,12% (табл.1).

Таблица 1.

Спектр микроорганизмов, выделенных из биологических проб у пациентов с острым лейкозом (n=308)

Микроорганизмы	Абс.	Отн.,%
Грамотрицательные бактерии	75	24,35
Семейство Enterobacteriaceae	57	18,51
В том числе:		
<i>Escherichia coli</i>	19	6,17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	9,74
<i>Klebsiella spp.</i>	7	2,27
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	1	0,33
Грамотрицательные неферментирующие бактерии	14	4,54
В том числе:		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	2,27
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	0,65
<i>Sternotrophomonas maltophilia</i>	5	1,62
Иные	4	1,30
Грамположительные бактерии	208	67,53
В том числе:		
Стафилококк коагулазанегативный	40	12,98
<i>Staphylococcus spp.</i>	20	6,50
<i>Enterococcus spp.</i>	14	4,54
<i>Streptococcus spp.</i>	11	3,57
Стрептококки группы Viridans	118	38,32
Иные	5	1,62
Грибы рода <i>Candida</i>	25	8,12

Септицемия выявлена в 15 случаях у 8 (15,09%) пациентов, из них в 12 (80,0%) случаях вызвана одним видом микроорганизмов и в 3 (20,0%) – сочетанием бактерий. Всего из гемокультур было выделено 15 микробов,

включая 8 (53,33%) грамотрицательных и 7 (46,67%) – грамположительных бактерий. Доля грамотрицательных бактерий по отдельным видам составила: *Acinetobacter baum.*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* – по 2 (13,33%) случая, *Sternotrophomonas maltophilia* и *Raoultella ornithinolytica* – по 1 (6,67%), а доля грамположительных – *St. epidermidis* – 2 (13,33%), *St. aureus*, *St. lentus*, *St. xylosus*, коагулазанегативный стафилококк и *St. lugdunensis* – по 1 (6,67%) наблюдению. В более чем половине (53,33%) случаев возбудителями сепсиса были *E.coli*, *Acinetobacter baum.*, *Ps.aeruginosa* и *St. epidermidis* с одинаковой частотой (13,33%) каждого вида микроба.

Посевы мокроты у 9 пациентов (16,98%) оказались в 18 случаях положительными на наличие микроорганизмов. Среди них чаще высевались *Ps.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *St. aureus*, *E. faecium*. У 20 (37,73%) пациентов при посеве мочи обнаружено 27 положительных проб, наиболее часто выявлялись *E.coli*, *K.pneumoniae* и *Enterococcus spp.* В 60 мазках из глотки у 28 (52,83%) человек преимущественно высевались *K. pneumoniae*, *Klebsiella mobies* (*K.mobies*), *E.coli* и *Candida albicans*. В 8 пробах кала у 5 (9,43%) пациентов выделялись стафилококки, *K.pneumoniae*, токсины А и В *Clostridium difficile*.

Представлялось существенно важным изучение параметров резистентности выделенных микроорганизмов к некоторым антибиотикам, стандартно используемым на практике (рис.1).

При анализе антибиотикорезистентности штаммов семейства энтеробактерий (*E.coli* и *Klebsiella spp.*) наиболее высокие показатели резистентности определялись к амоксиклаву (54,5% и 96,15%, соответственно). Умеренная и высокая устойчивость оказалась также к цефтриаксону и аминогликозидам – амикацину и гентамицину (резистентность 34,62 – 84,62%), еще и к ципрофлоксацину (27, 3% и 23,07%), соответственно, а у *Klebsiella spp.* - и к карбапенемам (50,0%). Высокую активность против этих бактерий сохранили цефоперазон/сульбактам, а против *E.coli* - также и карбапенемы (устойчивость 0%).

В группе грамотрицательных неферментирующих бактерий штаммы *Ps. aeruginosa* оказались высокорезистентными к многим антибиотикам с потенциальной антисинегной активностью (цефоперазон/сульбактам, аминогликозиды, ципрофлоксацин), однако остались чувствительными к карбапенемам.

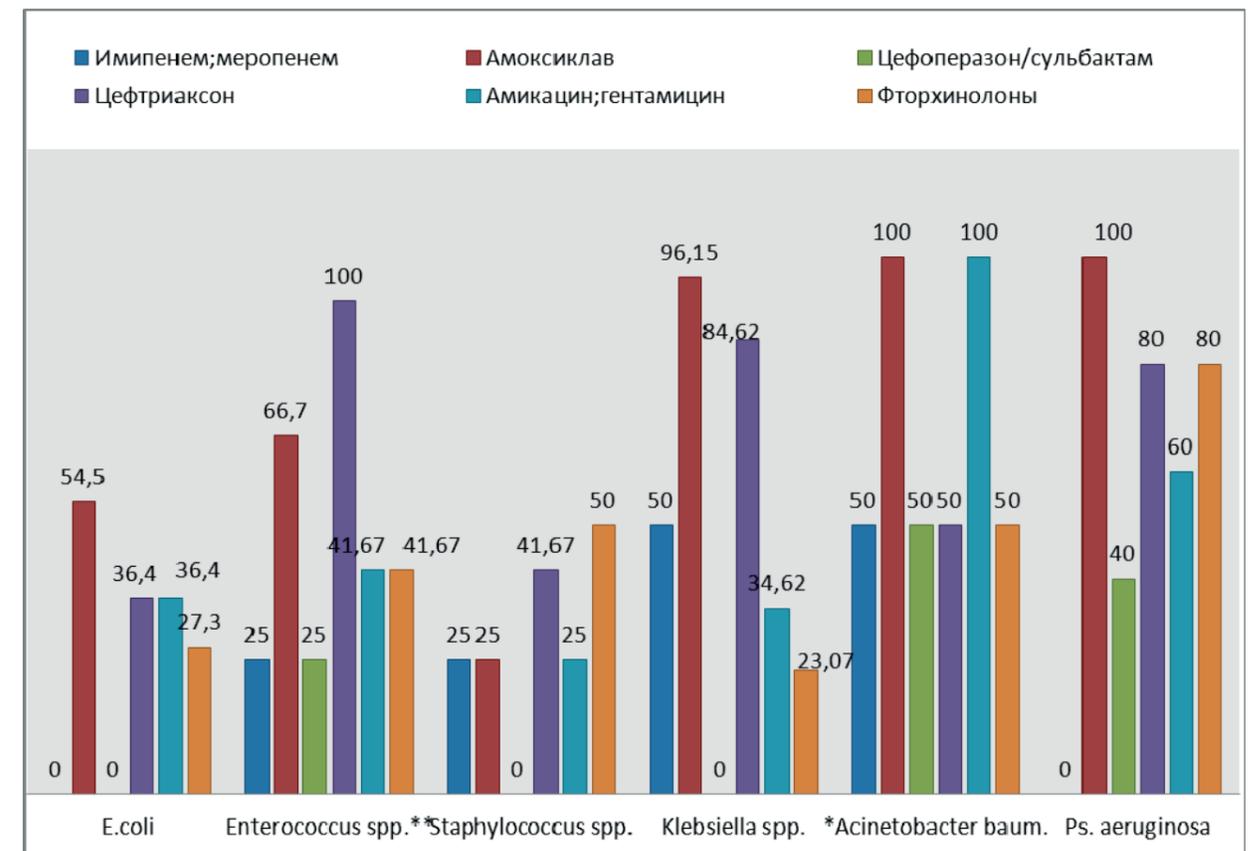


Рисунок 1. Доля резистентных штаммов исследуемых микроорганизмов к основным группам антибиотиков (%)

Примечание: * резистентность к тигециклину 0%; **резистентность к ванкомицину, линезолиду 0%

В то же время обращало на себя внимание, что *Acinetobacter baum.* демонстрирует высокие параметры резистентности (100-50%) ко всем исследуемым антимикробным препаратам. В случае развития инфекции препаратом выбора является антибиотик – тигециклин.

Среди грамположительных микробов из группы энтерококков и стафилококков нечувствительные штаммы в разной степени выявлялись к амоксиклаву (66,7-25%), цефтриаксону (100-41,67%), ципрофлоксацину (41,67-50%), аминогликозидам (41,67-25%), карбапенемам (25%), а у энтерококков – и к цефоперазон/сульбактаму (25%). Высокая чувствительность к стафилококкам сохранялась лишь у цефоперазон/сульбактама (устойчивость 0%). Препаратом выбора для лечения потенциальных инфекций, возбудителем которых оказались энтерококки, явились ванкомицин и линезолид (устойчивость 0%), что согласуется с данными литературы [7].

Среди большого круга проблем практической медицины наиболее значимой является полирезистентность грамотрицательных и грамположительных бактерий [6,7]. По нашим данным, 65,21% штаммов *K. pneumoniae*, 25,0% - *K. mobies* и 9,1 % - *E.coli* являлись продуцентами ферментов резистентности бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), высокую активность против которых сохранил цефоперазон/сульбактам.

Метициллин (оксациллин) устойчивыми штаммами оказались 42,86% изолятов *St.aureus* и 50% *St.epidermidis*, выделенных из разных биологических образцов, они также были чувствительны к действию цефоперазон/сульбактама.

Выводы: 1. Частота инфекционных осложнений у пациентов с острым лейкозом в периоде цитостатической миелосупрессии индукционного этапа лечения составляет 100%, а наиболее серьезными осложнениями являются пневмония и сепсис.

2. Среди возбудителей инфекционных осложнений по результатам микробиологического анализа различных биологических образцов доля грамположительных бактерий составила 67,53%, а грамотрицательных – 24,35%.

3. Доля резистентных грамположительных микробов (энтерококки, стафилококки) и грамотрицательных (энтеробактерии, синегнойная палочка,

ацинетобактер) составила 100-23,07% к амоксиклаву, цефтриаксону и аминогликозидам (амикацин, гентамицин).

4. В случае развития инфекций выраженная активность против грамположительных микробов (стафилококки, энтерококки) сохраняется, соответственно, у антибиотиков цефоперазон/сульбактама и ванкомицина, а против грамотрицательных (*Ps. aeruginosa*, *E. coli*) – у карбапенемов, против *K.pneumoniae* – у цефоперазон/сульбактама.

5. Грамотрицательные микроорганизмы *K. pneumoniae*, *E.coli* и *K. mobies*, являющиеся продуцентами БЛРС, а также грамположительные метициллин устойчивые штаммы *St.aureus* и *St.epidermidis* сохранили чувствительность к цефоперазон/сульбактаму.

Список литературы

1. Войцеховский В.В., Ландышев Ю.С., Григоренко А.А. [и др.]. Особенности диагностики и лечения пневмонии у больных множественной миеломой // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2013. – №50. – С. 23-28.
2. Диагностика и лечение гастроэнтерологических осложнений химиотерапии у онкогематологических больных в педиатрической практике/ Е.К.Донюш, О. А.Тиганова, М. Н. Абузин [и др.] // Лечащий врач. - 2017.- №1.- С.1-27.
3. Клинико-диагностические особенности пневмонии у гематологических больных/ Т.Н.Александрова, И.И.Мулина, В.Н. Ядрихинская [и др.] // Крымский терапевтический журнал. - 2019. - №3. – С. 41-45.
4. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых/ В.Г.Савченко, Е.Н.Паровичникова, Б.В. Афанасьев [и др.] // Национальное гематологическое общество, 2018. – 110 с.

5. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелобластных лейкозов взрослых/ В.Г.Савченко, Е.Н.Паровичникова, Б.В. Афанасьев [и др.] // Национальное гематологическое общество, 2018. – 70 с.

6. Клясова Г.А., Коробова А.Г. Энтеробактерии с продукцией β -лактамаз расширенного спектра: источники инфицирования и значение колонизации слизистой оболочки кишечника у больных гемобластозами// Гематология и трансфузиология. - 2018. – Т. 63, № 2. – С. 116 -123.

7. Палковский О. Л., Алексеева Л. А., Шиманов И. С. Проблемы терапии нозокомиальной энтерококковой инфекции // Проблемы здоровья и экологии, 2015. – Т.4, №46. – С. 4-8.

8. Скакова А. Б. Бактериологический фон мочи и патоморфологические изменения почек при острых лейкозах// Медицина и экология, 2009. – №3 – С. 74-77.

9. Paganin F., Lilienthal F., Bourdin A. Severe communityacquired pneumonia: assessment of microbial aetiologyas mortality factor // Eur. Respir. J., 2004. – №24.– С.779-785.

10. Wu C.L. Chan M.C., Chang G.C. Etiology and cytokine expression in patients requiring mechanical ventilation due to severe community_acquired pneumonia// Med. Assoc., 2006. –№105.– С. 49-55.

УДК: 616-002.2+616.-003.24[006.446]575+517

Тематический рубрикатор: 76.03.33; 76.03.39

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Новоселова Ирина Алексеевна

*лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
novoselova@niigpk.ru*

Овсепян Ваник Абрамович

*кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-клинического отдела гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
ovsepyan@niigpk.ru*

Сарпова Мария Вадимовна

*научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
sarpova@niigpk.ru*

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CYTOGENETIC ABERRATIONS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Irina Novoselova

laboratory technician of laboratory pathomorphology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Vanik Ovsepyan

candidate of biological science, senior researcher of scientific and clinical department of hematology, chemotherapy and bone marrow transplantation, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Maria Sarpova

researcher of laboratory pathomorphology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

АННОТАЦИЯ

Обследованы 170 пациентов в период постановки диагноза хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) методом FISH. Больные с изолированной делецией 13q14 разделены на 2 группы в зависимости от содержания клеток, имеющих данную aberrацию. Выявлено, что у пациентов с содержанием клеток с делецией 13q14 в не менее 75 % наблюдаются более высокие показатели сывороточной тимидинкиназы и β 2-микроглобулина, а также более короткая общая выживаемость. Таким образом, содержание клеток с изолированной делецией 13q14 может использоваться в качестве предиктора неблагоприятного прогноза.

ABSTRACT

170 patients were examined during the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) using the FISH method. Patients with an isolated 13q14 deletion were divided into 2 groups depending on the content of cells having this aberration. It was found that patients with a cell content with a 13q14 deletion of at least 75% have a higher level of serum thymidine kinase and β 2-microglobulin and have a shorter overall survival. Thus, the content of cells with an isolated 13q14 deletion can be used as a predictor of a poor prognosis.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; FISH; хромосомные aberrации; делеция 13q14; прогноз.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; FISH; chromosomal aberrations; 13q14 deletion; prognosis.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) характеризуется эпидемиологической и биологической гетерогенностью, вариабельностью форм клинического течения, прогноза и ответа на терапию [5, с. 186-194]. Онкогенные события, приводящие к возникновению и прогрессированию заболевания, остаются до конца нерасшифрованными [8, с. 1524-1526]. На сегодняшний день доказано, что хромосомные нарушения играют важную роль в развитии заболевания и являются значимыми независимыми предикторами беспрогрессивной и общей выживаемости больных [1, с. 80], [3, с. 684], [4, с. 293-294].

В 80 % случаев у пациентов с ХЛЛ встречаются соматические приобретенные хромосомные aberrации. Наиболее часто выявляются делеции длинного плеча в хромосомах 13, 11 и 6, короткого плеча в хромосоме 17 и трисомия хромосомы 12 [6, с. 1913].

Делеция 13q14 обнаруживается в более чем 50 % случаев у пациентов с ХЛЛ, не получавших ранее специфическую терапию. При этом данная aberrация появляется на ранних этапах заболевания, характеризуется различной величиной интерстициально делетированного фрагмента длинного плеча хромосомы 13 и примерно в 15-30 % случаев бывает гомозиготной [9, с. 1012], [15, с. 419].

По своей клинической значимости изолированная делеция 13q14 считается благоприятной при отсутствии других aberrаций. Вместе с тем, учитывая, что содержание любой хромосомной аномалии в биологическом материале является отражением объема опухолевой массы и селективных особенностей клона с конкретным генетическим нарушением, можно предположить, что высокое содержание генетической аномалии может ухудшить ее прогностическое значение. Данное предположение основывается на том, что для накопления значительной опухолевой массы с конкретной аномалией требуется большое количество клеточных делений, в процессе которых могут возникнуть новые изменения генома, в том числе криптические цитогенетические аномалии или точечные мутации. Последние могут привести

к появлению клона с селективным преимуществом в росте и, как следствие, более агрессивному характеру течения заболевания [7, с. 1267].

Цель настоящего исследования – определить прогностическое значение содержания клеток с изолированной делецией 13q14 в период постановки диагноза хронического лимфолейкоза.

Материалы и методы

В исследование включены 170 больных ХЛЛ, наблюдавшихся в период с 2005 по 2018 гг. в Кировском НИИ гематологии и переливания крови. Среди них – 101 мужчина (59 %) и 69 женщин (41 %). Медиана возраста – 64 года (от 33 до 82 лет). У 25 (15 %) пациентов установлена стадия А, у 145 (85 %) – стадии В и С по классификации Binet. Хромосомные aberrации в выделенных мононуклеарных клетках периферической крови и костного мозга определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) с использованием наборов коммерческих ДНК-зондов фирм «Kreatech» (Нидерланды) и «Cytocell» (Великобритания) к локусам MYB (6q23.3), ATM (11q22.3), GLI1 (12q13), RB1 (13q14.2), DLEU1 (13q14), D13S25 (13q14), TP53 (17p13) по протоколам фирм-производителей. Денатурацию и гибридизацию образцов проводили с помощью гибридизационной системы «ThermoBrite» («DAKO», США). Анализ препаратов осуществляли на флуоресцентном микроскопе Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия) с соответствующим набором светофильтров. В каждом случае было проанализировано не менее 200 интерфазных ядер с четкими сигналами. Результаты FISH-анализа описывали в соответствии с Международной системой цитогеномной номенклатуры (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature – ISCN 2016) [11, с. 106-118]. Пороговые значения исследований делеций в длинном плече хромосом 6, 11, 13 и трисомии хромосомы 12 составляли 10%. Для делеции в коротком плече хромосомы 17 пороговое значение составило 20%. Исследования проводили в период постановки диагноза до назначения специфической терапии. Ретроспективный анализ историй болезней пациентов осуществляли по данным электронных медицинских карт.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ MedCalc (версия 19.1) и Microsoft Office Excel 2010. Для определения порогового значения содержания клеток использовался ROC-анализ. Кривые общей выживаемости строились по методу Каплана-Майера (long-rank). Кривые выживаемости сравнивались по значению логрангового критерия [10, с. 458-459].

Для изучения достоверности различий качественных признаков в сравниваемых группах использовался критерий χ^2 с поправкой Йейтса, а также точный критерий Фишера. Для оценки межгрупповых различий значений количественных признаков применялся непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Сравнение стандартных отклонений выполнено с помощью F-теста. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$ для всех критериев.

Результаты и обсуждение

В результате исследований хромосомные aberrации выявлены у 75 % (128/170) пациентов. Частота встречаемости цитогенетических нарушений представлена на рисунке 1.

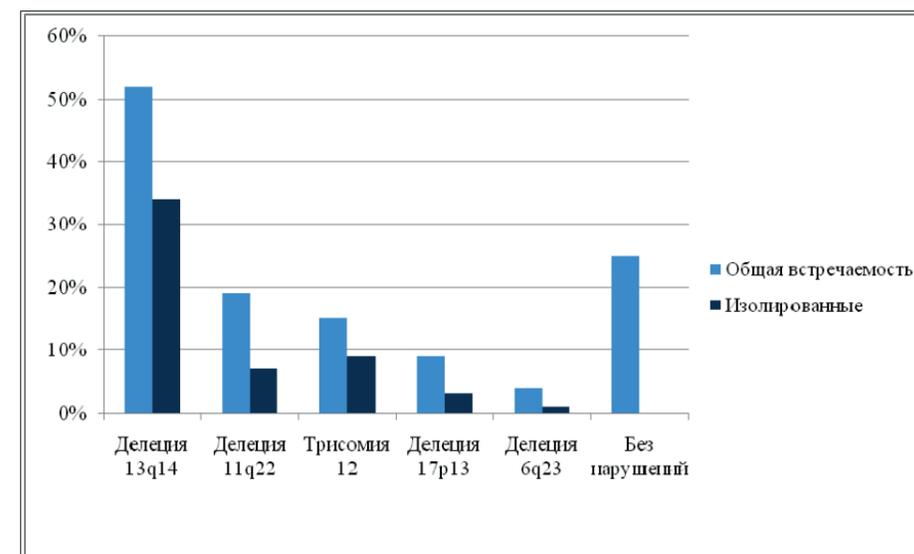


Рисунок 1. Распределение хромосомных aberrаций у пациентов с хроническим лимфолейкозом

Наиболее распространенным нарушением являлась делеция 13q14, она обнаружена у 52 % (88/170) пациентов, реже встречались делеция 11q22 и трисомия хромосомы 12 – у 19 % (33/170) и 15 % (25/170) больных соответственно. Делеции 17p13 и 6q23 выявлены соответственно у 9 % (15/170) и 4 % (6/170) пациентов. Цитогенетические аномалии отсутствовали у 25 % (42/170) больных.

Делеция 13q14 и трисомия хромосомы 12 чаще встречались как изолированные нарушения (65 % и 64 % случаев соответственно), в то время как делеции 11q22, 17p13 и 6q23 чаще выявлялись в сочетании с другими aberrациями (64, 77 и 77 % случаев соответственно). Последние 2 нарушения зарегистрированы исключительно на поздних стадиях заболевания. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Распределение хромосомных aberrаций у пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания

Цитогенетические aberrации	Стадия А (n = 25)	Стадии В и С (n = 145)	p
Изолированная делеция 13q14	9 (36 %)	48 (33 %)	0,957
Изолированная делеция 11q22	2 (8 %)	10 (7 %)	0,823
Изолированная трисомия 12	5 (20 %)	11 (8 %)	0,112
Изолированная делеция 17p13	0 (0 %)	5 (3 %)	0,763
Изолированная делеция 6q23	0 (0 %)	2 (1 %)	0,680
Более 1 генетической аномалии	0 (0 %)	33 (23 %)	0,018
Без нарушений	9 (32 %)	33 (23 %)	0,507

Сочетание 2 и более генетических аномалий выявлялось только на стадиях В и С (33 случая из 145) ($p = 0,018$). Изолированная интерстициальная делеция 13q14 обнаружена у 57 пациентов, среди них 65% (37/57) – мужчины и 35% (20/57) – женщины. Медиана возраста – 61 год (от 36 до 82 лет). У 16% (9/57)

делеция обнаружена на стадии А, у 84% (48/57) – на стадиях В и С. Медиана периода наблюдения за больными составила 75 мес.

Во всех случаях изолированная делеция 13q14 включала в себя локус D13S25, расположенный дистальнее от центromеры хромосомы 13, чем локусы DLEU1 и RB1 (рисунок 2).

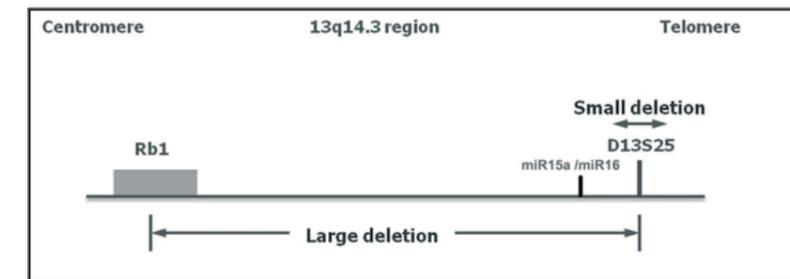


Рисунок 2. Схематическая структура региона 13q14 [15, с. 420]

Изолированная интерстициальная делеция локуса D13S25 обнаружена у 16 % (9/57) больных. У 84 % (48/57) пациентов делеция 13q14 включала в себя одновременно локусы D13S25 и DLEU1. Делеция локуса D13S25 встречалась в изолированном виде достоверно реже, чем в сочетании с локусом DLEU1 ($p < 0,01$), что, возможно, указывает на большую частоту одновременных нерепарируемых хромосомных разрывов в области проксимального и дистального от центromеры концов соответственно локусов DLEU1 и D13S25 и/или на селективное преимущество в росте у опухолевого клона, несущего сочетанную делецию.

У 44% (21/48) больных делеция 13q14 охватывала одновременно локусы D13S25, DLEU1, а также локус RB1, занимающий наиболее проксимальное к центромоме хромосомы 13 положение. Данный тип aberrации встречался достоверно чаще, чем изолированная делеция с участием локуса D13S25 ($p = 0,02$). Большую частоту имела и совместная делеция локусов D13S25 и DLEU1 по сравнению с 3-локусной делецией, включающей в себя наряду с утратой указанных локусов потерю локуса RB1 ($p < 0,001$).

Из полученных результатов следует, что изолированная делеция локуса D13S25 является более редким генетическим событием по сравнению с 2-локусной (D13S25+DLEU1) или 3-локусной (D13S25+DLEU1+RB1) делецией.

Несмотря на то, что механизм развития ХЛЛ, связанный с делецией 13q14, не до конца изучен, предполагается, что при данной перестройке утрата кластера *miR-15a/miR-16-1*, кодирующего микроРНК и локализованного между экзонами 1 и 2 внутри гена *DLEU1*, препятствует апоптозу. Последний в норме стимулируется этими микроРНК за счет подавления онкогенов *BCL2* и *MCL1* [12, с. 13944 –13947]. Показано, что непосредственной мишенью указанных микроРНК является также онкосупрессор *TP53*, который в норме активирует экспрессию других микроРНК – *miR-34b* и *miR-34c*, мишенью которых, в свою очередь, служит киназа *ZAP70* [2, с. 61], [16, с. 2-3]. Наблюдаемая при такой делеции потеря *miR-15a/miR-16-1* хотя и способствует развитию патологии за счет подавления *MCL1*, тем не менее не приводит к развитию агрессивной формы ХЛЛ, поскольку благодаря повышению уровня *TP53* происходит активация *miR-34b/miR-34c* и подавление экспрессии *ZAP70*. Патогенетическая роль опухоль-супрессорного гена *RBI*, кодирующего ядерный фосфопротеин, обусловлена участием данного белка в регуляции клеточного цикла и стабильности генома [15, с. 1019].

Статистически значимого различия по полу, возрасту, стадии заболевания, биохимическим показателям крови и общей выживаемости пациентов в исследуемой выборке с разными величинами делетируемого фрагмента локуса 13q14 не выявлено ($p > 0,05$).

Однако содержание опухолевых клеток с делецией 13q14 у больных значительно варьировалось, причем уровень клеток с абберацией не коррелировал с размером делетируемого фрагмента длинного плеча хромосомы 13 ($p > 0,05$). Пациенты были разделены на две группы в зависимости от количества клеток, имеющих изолированную интерстициальную делецию 13q14. В первую группу включены 33 больных (58 %), имеющих

изолированную делецию 13q14 в менее 75 % клеток, во вторую – 24 (42 %) - с содержанием делеции в не менее 75 % клеток. С помощью ROC-анализа определено пороговое значение, которое равнялось 75 % (чувствительность теста – 85 %, специфичность – 73 %). Характеристика больных ХЛЛ в зависимости от содержания клеток с делецией 13q14 представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Характеристика больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от содержания клеток с делецией 13q14

Показатели	Содержание клеток с del13q14		p
	< 75 % (n = 33)	≥ 75 % (n = 24)	
Медиана возраста (диапазон), лет	55 (36-82)	62 (50-77)	0,54
Пол: мужчины	22	15	0,97
женщины	11	9	
Стадия по Binet: А	7	2	0,34
В и С	26	22	0,075
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	351,2±23,37	408,6±35,41	
Тимидинкиназа, Ед/л	9,7±1,73	18,9±2,78	0,042
β2-микроглобулин, мг/л	2,9±0,96	5,2±2,25	0,021

Пациенты с изолированной делецией 13q14 не отличались друг от друга по возрасту, полу, стадии заболевания, а также содержанию лактатдегидрогеназы ($p > 0,05$). Вместе с тем у больных с делецией 13q14 в не менее 75 % клеток наблюдалась более высокая концентрация тимидинкиназы и β2-микроглобулина в сыворотке крови, чем у больных с меньшим содержанием клеток с указанной абберацией ($p = 0,042$ и $p = 0,021$ соответственно). По мнению С. Магнас и соавт. (2003), активность тимидинкиназы более 15,0 Ед/л при ХЛЛ является предиктором мутационного статуса *IgVH* гена и высокого риска прогрессирования болезни [13, с. 135]. Повышенный уровень β2-микроглобулина наблюдается у пациентов с большой опухолевой массой и

выраженной инфильтрацией лимфоцитами костного мозга [14, с. 21]. В свою очередь, высокая доля клона с делецией 13q14 среди опухолевых клеток указывает на селективное преимущество в росте данного клона и достаточно большое количество клеточных циклов, пройденных родоначальной лейкозной клеткой с указанной структурной аномалией.

При анализе общей выживаемости в исследуемых группах установлено, что у пациентов с делецией 13q14 в не менее 75 % клеток медиана выживаемости составила 63 мес., в то время как у больных с делецией 13q14 в менее 75 % клеток медиана выживаемости не достигнута за период наблюдения ($p = 0,001$). Результаты представлены на рисунке 2.

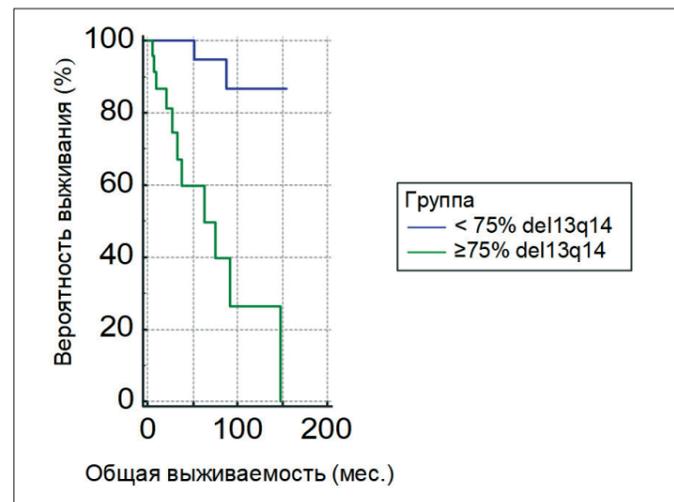


Рисунок 2. Общая выживаемость пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от содержания клеток с делецией 13q14

Выводы

1. Сочетание хромосомных аномалий при ХЛЛ чаще выявляется на стадиях В и С, чем на стадии А ($p = 0,018$).
2. Наиболее часто изолированная делеция 13q14 встречается в виде совместной утраты локусов D13S25 и DLEU1. Минимально делетируемый фрагмент состоит из локуса D13S25.
3. У больных, имеющих делецию 13q14 в не менее 75 % лейкозных клеток, наблюдается более высокий уровень сывороточной тимидинкиназы и

β 2-микроглобулина по сравнению с пациентами с делецией 13q14 в менее 75 % клеток.

4. Больные с изолированной делецией 13q14 в не менее 75 % клеток характеризуются более низкой общей выживаемостью по сравнению с пациентами с меньшим уровнем клеток с указанной аберрацией ($p = 0,0012$), что позволяет использовать содержание клеток с изолированной делецией 13q14 в качестве предиктора общей выживаемости пациентов с ХЛЛ.

Список литературы

1. Amaya-Chanaga C.I., Rassenti L.Z. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers // Best Practice & Research Clinical Haematology. – 2016. – Vol. 29, N 1. – P. 79-89.
2. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia / M. Fabbri, A. Bottoni, M. Shimizu [et al.] // JAMA. – 2011. – Vol. 305, N 1. – P. 59-67.
3. Bosch F., Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 16. – P. 684-701.
4. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia / G.W. Dewald, S.R. Brockman, S.F. Paternoster [et al.] // British journal of haematology. – 2003. – Vol. 121, N 2. – P. 287-295.
5. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 4.2020, NCCN Clinical practice guidelines in oncology / W.G. Wierda, J.C. Byrd, J.S. Abramson [et al.] // Journal of the National Comprehensive Cancer Network. – 2020. – Vol. 18, N 2. – P. 185-217.

6. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia / H. Dohner, S. Stilgenbauer, A. Benner [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol. 343, N 26. – P. 1910-1916.
7. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment // American journal of hematology. – 2019. – Vol. 94, N 11. – P. 1266-1287.
8. Hallek M., Shanafelt T.D., Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia // The Lancet. – 2018. – Vol. 391, N 10129. – P. 1524-1537.
9. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14 / P. Ouillette, H. Erba, L. Kujawski [et al.] // Cancer research. – 2008. – Vol. 68, N 4. – P. 1012-1021.
10. Kaplan, E.L., Meier P.J. Nonparametric estimation from incomplete observations // Journal of the American Statistical Association. – 1958. – Vol. 53, N 282. – P. 457-481.
11. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature including new sequence-based cytogenetic nomenclature developed in collaboration with the Human Genome Variation Society (HGVS) sequence variant description working group (Basel). – New York: Karger, 2016. – 140 p.
12. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 / A. Cimmino, G.A. Calin, M. Fabbri [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – Vol. 102, N 39. – P. 13944-13949.

13. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL / C. Magnac, R. Porcher, F. Davi [et al.] // Leukemia. – 2003. – Vol. 17. – P. 133-137.
14. Sagatys E.M., Zhang L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia // Cancer Control. – 2012. – Vol. 19, N 1. – P. 18-25.
15. The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study / S. Yi, H. Li, Z. Li [et al.] // International journal of hematology. – 2017. – Vol. 106, N 3. – P. 418-425.
16. Tumor Suppressors in Chronic Lymphocytic Leukemia: From Lost Partners to Active Targets / G. Andreani, G. Carra, M.F. Lingua [et al.] // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12, N 3. – P. 629.

УДК 616.419

Тематический рубрикатор: 76.29.33

**РОЛЬ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ПРЯМОГО АНТИГЛОБУЛИНОВОГО
ТЕСТА В ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ
ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Попонина Елена Александровна

*канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров
senkina.elena@rambler.ru*

Бутина Елена Владимировна

канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммуногематологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

butinalena@yandex.ru

Йовдий Анна Васильевна

канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

annaovdii@bk.ru

Зайцева Галина Алексеевна

док. мед. наук, профессор, руководитель научного направления ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

immunlab@yandex.ru

Максимов Олег Дмитриевич

канд. мед. наук, врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

oleg.maksimov.kirov@gmail.com

**ROLE OF POSITIVE DIRECT ANTIGLOBULIN TEST IN THE
DIAGNOSTICS OF HEMOLYTIC COMPLICATIONS OF
ONCOHEMATOLOGICAL DISORDERS**

Elena Poronina

MD, PhD, researcher of the laboratory of immunohematology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Elena Butina

MD, PhD, Head of the laboratory of immunohematology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Anna Yovdiy

MD, PhD, researcher of the laboratory of immunohematology, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Galina Zaitseva

MD, professor, Head of research direction, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

Oleg Maksimov

MD, PhD, hematologist, The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agence, Kirov

АННОТАЦИЯ

Прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) предназначен для выявления антител и компонентов комплемента, фиксированных на поверхности эритроцитов. Изучена частота положительного ПАГТ у онкогематологических больных, установлен класс и подкласс иммуноглобулинов с применением реактивов и оборудования производства Bio-Rad, США, исследована их роль в развитии гемолитических осложнений. Положительный результат ПАГТ следует интерпретировать с учетом лабораторных и клинических данных, дифференцированное исследование помогает прогнозировать возникновение гемолиза у пациента.

ABSTRACT

The direct antiglobulin test (DAT) detects antibodies and complement components fixed on the surface of red blood cells. The frequency of positive DAT in oncohematological patients was studied, the class and subclass of immunoglobulins

was established using reagents and equipment by Bio-Rad, USA, and their role in the formation of hemolytic complications was investigated. The positive result of DAT should be interpreted taking into account laboratory and clinical data, differentiated test helps to predict the development of hemolysis in the patient.

Ключевые слова: прямой антиглобулиновый тест, класс и подкласс иммуноглобулинов, иммунный гемолиз.

Keywords: direct antiglobulin test, class and subclass of immunoglobulins, immune hemolysis.

Прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) – это метод исследования, с помощью которого выявляют наличие антител или компонентов комплемента, связавшихся с мембраной эритроцитов *in vivo*. Современные модификации ПАГТ с использованием моноклональных реагентов позволяют определить класс антител, участвующих в патологическом процессе, что существенно расширяет диагностические возможности теста [1, с. 58; 2, с.60].

Аутоантитела к эритроцитам представлены иммуноглобулинами (Ig) классов G, A, M. От класса иммуноглобулинов зависит оптимальная температура их реагирования с антигенами, а также способность связывать комплемент и взаимодействовать с рецепторами макрофагов в селезенке и печени. Перечисленные свойства аутоантител коррелируют с тяжестью вызываемых ими гемолитических осложнений [8, с. 2024; 9, с. 708].

IgG наиболее активны при температуре 37°C, являясь причиной развития тепловой аутоиммунной гемолитической анемии. Среди антиэритроцитарных антител класса IgG наибольший риск развития гемолиза ассоциируется с подклассами 1 и 3, их также называют неполными тепловыми агглютинидами [6, с. 307]. Подкласс IgG2 малоактивен. IgG4 не вызывает гемолиз и не способен активировать комплемент. Разрушение эритроцитов происходит путём внутриклеточного гемолиза макрофагами преимущественно в селезенке. Сопутствующая активация компонентов комплемента, выступающих в качестве опсопинов, усиливает захват эритроцитов макрофагами. Один из лабораторных

признаков гемолиза — сфероцитоз — обусловлен незавершенным фагоцитозом, при котором захватывается часть мембраны эритроцитов, что приводит к изменению формы клеток [3, с. 305].

Роль иммуноглобулинов класса A (IgA) в развитии гемолиза недостаточно изучена. По литературным данным, они не вызывают разрушения эритроцитов. Тем не менее, описаны случаи тяжелой гемолитической анемии, ассоциирующейся с IgA. Высказано предположение, что IgA были случайной находкой, а гемолиз обусловлен IgM, которые не выявлены при исследовании из-за интенсивного лизиса связанных ими эритроцитов ещё до проведения пробы [5, с. 2972].

Антиэритроцитарные аутоантитела, представленные IgM, связываются с эритроцитами больного при температуре ниже 37°C (оптимум 4°C) и характерны для холодовой гемолитической анемии. Они склеивают эритроциты в агглютинаты с последующей фиксацией на них компонентов комплемента. Повышение температуры до 37°C приводит к отсоединению IgM, но компоненты комплемента C3b остаются на поверхности эритроцитов, выполняя роль опсопинов. Затем макрофаги, преимущественно в печени, захватывают опсонированные эритроциты с последующим внутриклеточным гемолизом.

Внутрисосудистый гемолиз подавляется регулирующими молекулами CD55, CD59 на мембране эритроцитов, препятствующими формированию мембраноатакующего комплекса в процессе активации комплемента. Недостаточность действия естественных регуляторных ингибиторов комплемента может быть обусловлена высокой концентрацией IgM антител. В этом случае каскад комплемента не останавливается на C3b, а активируется через C5b с присоединением C6, C7, C8 и C9, формируя мембраноатакующий комплекс, что ведёт к образованию перфораций в мембране эритроцитов и последующему их разрыву в сосудистом русле — внутрисосудистому гемолизу [3, с. 306].

Описан смешанный вариант гемолитической анемии, при котором в плазме пациента обнаруживаются аутоантитела как тепловые IgG, так и холодные IgM [8, с. 2024].

Таким образом, изучение класса и подкласса антител, компонентов комплемента помогает получить ценную информацию, позволяющую прогнозировать возникновение гемолиза и выбрать тактику лечения пациента [5, с. 2971].

Цель – определить частоту выявления положительного ПАГТ у онкогематологических больных, установить класс и подкласс иммуноглобулинов, участвующих в патологическом процессе, оценить их вклад в развитие гемолитических осложнений при онкогематологических заболеваниях.

Материалы и методы

Результаты ПАГТ проанализированы у 377 пациентов с онкогематологическими заболеваниями, впервые госпитализированных в клинику института с диагнозами: 114 – острый лейкоз (ОЛ), 95 – множественная миелома (ММ), 42 – лимфома Ходжкина (ЛХ), 10 – хронический миелолейкоз (ХМЛ), 26 – хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), 81 – неходжкинская лимфома (НХЛ), 9 – прочие онкогематологические заболевания. Возраст обследованных составил от 2 до 87 лет (медиана 53 года). В группу сравнения вошли 200 доноров компонентов крови.

ПАГТ выполняли в гелевом тесте с использованием реактивов и оборудования (автоматический иммуногематологический анализатор ИН-1000) производства фирмы Bio-Rad, США. Для выявления положительного ПАГТ использовали карты DiaMed-ID-LISS/Coombs Anti-IgG+C3d. При получении положительного результата скрининга проводили дифференцирование классов иммуноглобулинов и компонентов комплемента с помощью карт DC-Screening I, содержащих гель с моноспецифическими антителами к человеческим

иммуноглобулинам классов G, A, M, а также компонентам комплемента C3c и C3d. При выявлении IgG на поверхности эритроцитов определяли их подкласс (IgG1, IgG3 или IgG2,4), а также концентрацию 1:1 и 1:100 с применением карт DAT IgG1/IgG3.

Уровень гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, общего и непрямого билирубина исследовали согласно общепринятым методикам.

Результаты

При обследовании доноров компонентов крови получены отрицательные результаты ПАГТ. У онкогематологических больных положительный результат ПАГТ встречался в 15,5% случаев, частота варьировала в зависимости от диагноза (табл. 1).

Таблица 1.

Дифференцированный ПАГТ у онкогематологических пациентов

Диагноз	Частота положительного ПАГТ (%)	Выявляемый класс иммуноглобулинов, компоненты комплемента
Острый лейкоз	6,2	IgG2,4 – 100,0%
Хронический миелолейкоз	10,0	IgG2,4 – 100,0%
Лимфома Ходжкина	11,9	IgG2,4 – 100,0%
Хронический лимфолейкоз	15,4	IgG2,4 – 25,0% IgG1 – 50,0% C3d – 25,0%
Неходжкинские лимфомы	21,0	IgG2,4 – 64,7% IgM+C3d – 11,8% C3d/ C3c+C3d – 17,6% Панагглютинация – 5,9%
Множественная миелома	25,2	IgG2,4 – 100%

Дифференцированный ПАГТ показал, что при ОЛ, ХМЛ, ЛХ, ММ причиной положительного теста была сорбция IgG, подклассов 2,4, согласно литературным данным, ассоциирующаяся с низким риском гемолитических осложнений [3, с. 305]. Действительно, несмотря на то, что у многих пациентов

с положительным ПАГТ выявлена анемия, клинических и лабораторных признаков иммунного разрушения эритроцитов не зарегистрировано.

Положительная проба Кумбса обнаружена у 4 из 26 пациентов с ХЛЛ (15,4%). Установлено, что в 50,0% случаев положительный ПАГТ обусловлен IgG1, 25,0% - C3d, 25,0% - IgG2,4. Выявление C3d ассоциировалось с признаками гемолиза. Выявление IgG1 сопровождалось гемолитической анемией в половине случаев. Таким образом, аутоиммунная гемолитическая анемия наблюдалась у 7,7% больных ХЛЛ.

В группе больных НХЛ получен положительный результат ПАГТ в 21,0% случаев (17 человек из 81). У 29,4% пациентов с положительной пробой (5 случаев) на поверхности эритроцитов выявлены компоненты комплемента C3d и/или C3c. Причём у 3 из них выявлялись только компоненты комплемента C3c, C3d, у остальных 2 пациентов фиксация C3c, C3d сопровождалась сорбцией IgM на поверхности эритроцитов. Обнаружение компонентов комплемента ассоциировалось с клиническими и лабораторными признаками гемолиза. У 11 (64,7%) больных НХЛ положительный ПАГТ наблюдался за счёт IgG2,4 без гемолитических осложнений. У 1 пациента (5,9%) с НХЛ наблюдалась панагглютинация эритроцитов, положительный ПАГТ и лизис эритроцитов.

Заключение

ПАГТ обладает высокой диагностической ценностью при обследовании пациентов с подозрением на иммунный гемолиз. Его результаты должны интерпретироваться в контексте клинической ситуации. Современные возможности диагностики позволяют выявлять относительно небольшие количества иммуноглобулинов и комплемента, фиксировавшихся на эритроцитах, что не всегда ассоциируется с иммунным гемолизом. Согласно литературным данным, положительный ПАГТ может быть как признаком естественного старения и деградации эритроцитов, так и первым сигналом развивающихся аутоиммунных и опухолевых заболеваний [4, с. 840; 7, с. 441].

В нашем исследовании у больных с положительным результатом ПАГТ за счёт IgG2,4 отсутствовали клинико-лабораторные признаки гемолитической

анемии. IgG1, IgM и компоненты комплемента C3c, C3d сопровождалась проявлениями гемолиза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Источники финансирования: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00162А

Список литературы

1. Применение прямого антиглобулинового теста для выявления аутоантител при анемиях различного генеза / Н.В. Минеева, И.И. Кробинец, Н.Н. Бодрова [и др.] // Онкогематология. – 2017. – Т.12, №3. – С.57-62.
2. Тураев Р.Г., Бельская Е.Е. Проба Кумбса в лабораторной диагностике иммунопатологических состояний // Трансфузиология. – 2017. – Т. 18, №1. – С.59-64.
3. Berentsen S. Role of Complement in Autoimmune Hemolytic Anemia // Transfusion Medicine and Hemotherapy. – 2015. - № 42. – P.303-310.
4. Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer / Y. Rottenberg, V.Yahalom, E. Shinar [et. al.] // Transfusion. – 2009. - № 49(5). – P.838-842.
5. Go R., Winters J., Kay N. How I treat autoimmune hemolytic anemia // Blood. – 2017. – Vol.129, №22. – P.2971-2979.
6. Parker V., Tormey C. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls // Arch Pathol Lab Med. – 2017. – Vol.141. – P.305-310.

7. Should a Positive Direct Antiglobulin Test Be Considered a Prognostic Predictor in Chronic Lymphocytic Leukemia? / F.Ricci, A. Tedeschi, E. Vismara [et al.] // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. – 2013. - №13(4). – P.441-446.

8. Sokol R., Hewitt S., Stamps B. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. // *BMJ*. – 1981. – Vol. 282, № 6281. – P.2023-2027.

9. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis / N.Zantek, S.Koepsell, D.Tharp [et al.] // *Am J Hematol*. – 2012. - №87. – P.707-709.

УДК: 616.155.392.2-036.12

Тематический рубрикатор: 76.03.55

**ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ И ФАКТОРОВ
ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СКОРОСТИ
ПРОГРЕССИИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ**

Шардаков Виктор Иванович

профессор, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

vic-shardakov@mail.ru

Назарова Елена Львовна

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

nazarova.yelena@mail.ru

Йовдий Анна Васильевна

кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории иммуногематологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

Докшина Ирина Анатольевна

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-клинического отдела, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

**CHARACTERISTICS OF CYTOKINE LEVELS AND INNATE IMMUNE
FACTORS DEPENDING ON THE RATE OF PROGRESSION OF NON-
HODGKIN'S LIMPHOMAS**

Victor Shardakov

professor, doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of cellular and molecular immunology, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov.

Elena Nazarova

candidate of medical sciences, head of the laboratory of cellular and molecular immunology, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Anna Yovdy

candidate of medical sciences, research scientist of laboratory of immunohematology, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

Irina Dokshina

candidate of medical sciences, senior researcher of scientific and clinical department, the Federal State-Financed scientific institution «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency», Kirov

АННОТАЦИЯ

Представлены данные лабораторных исследований уровней цитокинов и функциональной активности нейтрофилов у 106 больных неходжкинскими лимфомами. Установлено, что концентрация цитокинов, фагоцитарная и микробицидная активность нейтрофилов, а также содержание в них α -дефензинов коррелируют с учетом скорости прогрессии заболевания.

ABSTRACT

Data from laboratory studies of cytokine levels and neutrophil function in 106 patients with non-Hodgkin's lymphomas are presented. It was found that the concentration of cytokines, phagocytic and microbicidal activity of neutrophils, as well as the content of α -defensins in them correlate with the rate of disease progression.

Ключевые слова: цитокины; фагоцитарная активность нейтрофилов; микробицидная функция клеток; α -дефенсины.

Keywords: cytokines; phagocytic activity of neutrophils; microbicidal function of cell; α -defensins.

Согласно современным представлениям, в основе лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) лежит нарушение взаимодействия опухолевых клеток и звеньев иммунной системы, при котором наблюдается дисбаланс продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками (ИКК). Это оказывает влияние на скорость течения неопластического процесса [1, с.203], поскольку общеизвестно, что многие цитокины обладают противоопухолевым эффектом. Так, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) оказывает избирательную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток за счет индукции

образования и освобождения свободных радикалов. Можно отметить, что хороший результат в лечении онкогематологических заболеваний достигнут при использовании интерферонов (IFN- α и IFN- β). Наряду с противоопухолевой активностью многие цитокины [2, с.25] участвуют в регуляции клеток врожденного иммунитета (в частности, нейтрофилов), поэтому актуальным является оценка регуляторного влияния цитокинов на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, реализующих противоинфекционную защиту врожденного иммунитета при ЛПЗ.

Изучение строения и функции нейтрофильных гранулоцитов при заболеваниях системы крови по-прежнему остается весьма перспективным направлением. Наличие у нейтрофилов растворимых, мембранно-ассоциированных и цитозольных рецепторов, объединенных под названием паттерн-распознающих рецепторов (ПРР), позволяет врожденной иммунной системе распознавать и элиминировать основные группы патогенов, в том числе и посредством фагоцитоза, включающего в себя кислородзависимый и кислороднезависимый киллинг микроорганизмов.

Цель работы. Оценить уровни цитокинов и функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от агрессивности течения неходжкинских лимфом (НХЛ).

Материал и методы исследований. Под нашим наблюдением находилось 106 больных НХЛ (мужчин – 64, женщин – 42), медиана возраста 58 лет. Пациенты в зависимости от скорости прогрессии заболевания были поделены на две группы: первую группу составили 85 человек с индолентными лимфомами (лимфома из малых лимфоцитов), во вторую включен 21 больной с агрессивными лимфомами (16 пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и 5 человек с лимфомой из клеток мантийной зоны). Группу сравнения составили 50 здоровых людей – доноров крови и её компонентов, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. У наблюдаемых лиц оценивали иммуноферментным методом концентрацию ряда

цитокинов (интерлейкины -1 β , -2, -4, -6, -8, -10; TNF- α , IFN- α , IFN- γ) с использованием реагентов ООО «Вектор-Бест» (г.Новосибирск).

Проведены исследования в латекс-тесте фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) и фагоцитарного индекса (ФИ). Оценивалась активность кислородзависимого киллинга в нейтрофильных гранулоцитах с использованием спонтанного и стимулированного НСТ- теста. Состояние кислороднезависимого механизма микробицидности определяли по содержанию в нейтрофилах α -дефензинов с помощью метода М.Г.Шубича с подсчетом процента позитивных клеток и определением среднего цитохимического показателя реакции (СЦПР) [3, с.105].

Результаты и их обсуждение

При анализе полученных данных, касающихся уровней цитокинов в обследуемых группах, обращал внимание дисбаланс их концентрации в зависимости от скорости прогрессии НХЛ (таблица 1).

Таблица 1.

Сравнительная характеристика концентрации цитокинов

Уровни цитокинов, пг/мл	Здоровые лица (n =50)	Больные индолентными лимфомами (n=85)	Больные агрессивными лимфомами (n = 21)
IL-1 β	602,3 (532,2; 614,7)	263,1 (101,1; 566,3) ^{1 **}	364,9 (185,1;469,1) ^{1***2*}
IL-2	6,8 (4,3; 10,3)	24,8 (12,7; 38,6) ^{1**}	13,3 (7,3; 27,2) ^{1*}
IL-4	14,6 (14,4; 15,8)	9,4 (4,5; 15,0) ^{1 **}	15,1 (9,1; 111,6) ^{2*}
IL-6	897,5 (874,2; 917,1)	767,3 (524,6; 1014,6)	795,6 (518,8;941,3)
IL-8	687,6 (671,9; 720,6)	508,7 (377,5; 760,6) ^{1**}	752,7 (523,1;807,2) ^{2*}
IL-10	558,2 (312,5; 1135,4)	68,4 (24,6; 194,3) ^{1***}	185,7 (45,5;321,9) ^{1**}
IFN- α	18,3 (18,0; 19,4)	16,6 (7,2; 18,6) ^{1**}	4,6 (2,6; 8,1) ^{1*}

IFN- γ	69,5 (48,3; 3511,1)	5,4 (0,5; 41,1) ^{1***}	11,0 (4,3; 42,3) ^{1**}
TNF- α	524,0 (509,4; 530,9)	239,7 (35,0; 502,6) ^{1**}	375,0 ^{2*} (162,2; 681,6)

*Примечание. Данные представлены в виде медиан и квартилей. Достоверность различий: *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001; 1- концентрация цитокинов у больных лимфомами при сопоставлении с показателями здоровых лиц; 2- концентрация цитокинов у больных с агрессивными лимфомами по сравнению с данными больных индолентными лимфомами.*

При анализе приведенных данных видно, что у больных индолентными лимфомами наблюдалось достоверное снижение секреции IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IFN- α , IFN- γ и TNF- α , но в то же время наблюдался рост концентрации IL-2. У пациентов с агрессивными формами лимфом выявлено снижение продукции IL-1 β , IL-10, IFN- α и IFN- γ наряду с повышением содержания IL-2.

Уровни провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β у пациентов с НХЛ оказались сниженными по сравнению с аналогичными показателями здоровых лиц. Необходимо отметить, что у больных с агрессивными лимфомами уровень данных цитокинов был выше, чем в группе пациентов с индолентными лимфомами.

Обращало внимание снижение продукции IFN- α и IFN- γ у всех обследованных лиц с НХЛ. В этой связи уместно заметить, что система интерферонов играет регулируемую роль в поддержании функционального состояния клеток врожденного иммунитета, в частности, нейтрофилов [4, с.135,], а также во многом определяет течение и исход у больных вирусных инфекций.

В обеих группах больных наблюдалось повышение уровня IL-2, причем более значимое – у пациентов с индолентными лимфомами. Известно, что данный цитокин запускает адаптивный иммунный ответ, а также активирует факторы, участвующие как в противоинфекционном, так и в противоопухолевом иммунитете. Можно предположить, что высокий уровень IL-2 является одним из факторов более благоприятного течения опухолевого процесса.

Низкое значение уровня IL-8 у больных с индолентными лимфомами по сравнению с данными второй группы и здоровыми лицами может быть

обусловлено значимо низкими концентрациями TNF- α и IL-1 β в первой группе пациентов. Известно, что эти цитокины являются наиболее сильными индукторами синтеза IL-8. Ранее нами были опубликованы данные о значении TNF- α в прогнозе агрессивных форм ЛПЗ [5, с.493], что нашло подтверждение в настоящей работе и при НХЛ.

Следовательно, у больных НХЛ наблюдается выраженная опухолевая прогрессия в лимфоидной ткани и сужение нормального лимфопоеза, дисбаланс уровней цитокинов и дисрегуляция функционального состояния ИКК. К этому присоединяется дефектность врожденного иммунитета, в частности, ослабление функции нейтрофилов.

Так, проведенные исследования показали, что при сохранности морфологической структуры нейтрофильных гранулоцитов, их функциональная активность оказалась сниженной (табл. 2).

Таблица 2.

Характеристика функциональной активности нейтрофилов у больных НХЛ

Исследуемые показатели	Здоровые лица (n = 50)	Больные индолентными лимфомами (n=85)	Больные агрессивными лимфомами (n = 21)
ФАН, %	74,5 \pm 2,10	67,3 \pm 2,41**	62,2 \pm 1,84* **
ФИ, ед.	12,2 \pm 0,70	11,3 \pm 1,24	10,5 \pm 1,62
НСТ-тест: -спонтанный, %	12,4 \pm 0,90	12,0 \pm 1,14	11,4 \pm 1,08
-стимулированный, %	27,8 \pm 2,41	20,0 \pm 2,25	16,0 \pm 1,45**
-индекс стимуляции	2,2 \pm 0,20	1,7 \pm 0,16	1,4 \pm 0,12* **
- α -дефенсины, %	100	92,6 \pm 2,38**	86,4 \pm 2,66**
- СЦПР, ед	2,12 \pm 0,02	1,98 \pm 0,03	1,76 \pm 0,04*

*Примечание. Достоверность различий: *p <0,05 при сопоставлении показателей между группами больных; ** p <0,05 при сопоставлении показателей с группой здоровых лиц.*

Из приведенных в таблице данных видно, что у больных наблюдалось ослабление фагоцитарной активности нейтрофилов, причем процент фагоцитирующих клеток оказался более низким при агрессивном течении заболевания. Кислородзависимый потенциал нейтрофилов обследованных больных в НСТ-тесте имел слабый ответ на стимуляцию в обеих группах больных НХЛ. Так, если в спонтанной пробе процент формазанпозитивных клеток у пациентов был сопоставим с данными группы сравнения, то при стимуляции нейтрофилов их ответ колебался в зависимости от агрессивности течения НХЛ.

Оценка содержания в нейтрофильных гранулоцитах α -дефенсинов, входящих в состав азурофильных гранул, выявила снижение их количества у пациентов, причем более низкие показатели наблюдались у больных с агрессивным течением заболевания.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование вторичной иммунной недостаточности, приводящее к ослаблению противомикробной резистентности у больных НХЛ, имеет несколько составляющих: дисбаланс уровней цитокинов, а также функциональная неполноценность нейтрофилов. Изменения затрагивают как сам процесс фагоцитоза, так и микробицидную функцию клеток из-за нарушений в НАДФН-оксидазной системе (показатели НСТ-теста). Происходит также ослабление лизиса в нейтрофилах поглощенных микробов, который в большей степени обеспечивается α -дефенсинами. Наши исследования выявили более выраженное ослабление функции нейтрофилов при агрессивных формах НХЛ.

Список литературы

1. Жевак Т.Н. Закономерности изменений цитокинового статуса при хроническом лимфолейкозе и их роль в патогенезе прогрессирующих форм заболевания /Т.Н.Жевак, Н.П.Чеснокова, Т.В.Шелехова //Саратовский научно-медицинский журнал. - 2012.- Т.8, №2.- С.203-209.

2. Мартынов А.И. Врожденный иммунитет как система защиты от воздействия на организм человека антропогенных факторов / А.И.Мартынов, Б.В.Пинегин, М.В.Пащенко // М.: ООО «Митель Пресс». – 2014. – 272 с.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В.Меньшиков // М.: «Медицина». – 1987. – 215 с.
4. Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Краткое издание / Р.М.Хаитов, Н.И.Ильина // М.: «ГЭОТАР-Медия». – 2013. – 640 с.
5. Зотина Е.Н. Прогностическое значение фактора некроза опухоли –альфа у больных хроническим лимфолейкозом /Е.Н.Зотина, Т.П.Загоскина, В.И.Шардаков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2016. – Т.18, №5. – С.489 – 494.

ВОПРОСЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

Тематический рубрикатор: 76.29.33 - Гематология и трансфузиология

**ОПЫТ ГАПЛОИДЕНТИЧНОЙ РОДСТВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КИРОВСКОМ НИИ
ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ**

Зорина Наталья Александровна

кандидат медицинских наук, заведующий отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

zorina@niigpk.ru

Минаева Наталья Викторовна

кандидат медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

minaeva@niigpk.ru

Фокина Елена Сергеевна

кандидат медицинских наук, врач-гематолог взрослого отделения химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

fokina@niigpk.ru

Хоробрых Марина Николаевна

врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

khmn-nii@mail.ru

Шерстнев Филипп Сергеевич

кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

sherstnev@niigpk.ru

Исаева Наталья Васильевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

isaeva@niigpk.ru

Безрукова Людмила Афанасьевна

врач-трансфузиолог отделения трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

bezrukova@niigpk.ru

Бутина Елена Владимировна

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

butina@niigpk.ru

Ветошкин Константин Александрович

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

vetoshkin@niigpk.ru

Логинова Мария Александровна

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

loginova@niigpk.ru

Парамонов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

paramonov@niigpk.ru

**THE EXPERIENCE OF A HAPLOIDENTICAL RELATED
HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN KIROV
RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND BLOOD
TRANSFUSION**

Natalia Zorina

the candidate of medical sciences, the head of the department of chemotherapy and bone marrow transplantation, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Natalia Minaeva

the candidate of medical Sciences, Deputy Director on medical work of Federal state budget institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Elena Fokina

the candidate of medical Sciences, hematologist of adult Department of hematology and chemotherapy, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Marina Khorobrykh

hematologist of Department of chemotherapy and bone marrow transplantation, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Philip Sherstnev

the candidate of medical Sciences, the head of Department of transfusion and processing of hematopoietic stem cells, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Natalia Isaeva

the candidate of biological Sciences, senior researcher of laboratory of cellular and molecular immunology, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Lyudmila Bezrukova

transfusiologist, department of transfusion and processing of hematopoietic stem cells, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Elena Butina

the candidate of medical Sciences, the head of immunohematology laboratory, Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov

Konstantin Vetoshkin

*the candidate of medical Sciences, the head of the laboratory of cell technologies
Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute of
Hematology and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov*

Maria Loginova

*candidate of biological Sciences, the head of the laboratory of immunogenetics,
Federal state budgetary institution of science «Kirov research Institute Hematology
and blood transfusion of the Federal biomedical Agency», Kirov*

Igor Paramonov

*doctor of medical Sciences, Director of Federal State Budgetary Institution of
Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the
Federal Medical and Biological Agency», Kirov*

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (гапло-ТГСК) у 18 больных, из них 12 - с посттрансплантационным циклофосфаном (ПТЦф), 6 - с TCR α/β и CD19+ деплецией. Общая выживаемость (ОВ) среди всех пациентов в течение 2 лет составила 36%. ОВ в группе с ПТЦф в течение 12 мес.- 55%, в группе с TCR α/β и CD19+ деплецией в течение 6 мес. - 50%. Трансплантационная летальность - 33,3%. Наши результаты свидетельствуют, что гапло-ТГСК является вариантом терапии ряда онкогематологических заболеваний в отсутствии полностью совместимого донора.

ABSTRACT

This work presents the results of a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT) in 18 patients, 12 of them were with post-transplantation cyclophosphamide (PTCY), 6 patients with TCR α/β , CD19+ depletion. The 2 year overall survival (OS) among all patients was 36%. 12 months OS in group with PCY - 55%, 6 months OS in group with TCR α/β , CD19+ depletion - 50%. The transplant related mortality was 33,3%. Our results suggest that

haplo-HSCT is an acceptable treatment option for a some of hematologic diseases in the absence of a fully compatible donor.

Ключевые слова: гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; общая выживаемость; рецидив после трансплантации; реакция «трансплантат против хозяина»; неприживание трансплантата; посттрансплантационный циклофосфамид; TCR α/β и CD19+ деплеция.

Keywords: haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; overall survival; post-transplant relapse; graft -versus-host disease; graft failure; post-transplant cyclophosphamide; TCR α/β , CD19+ depletion.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является потенциальной возможностью излечения злокачественных и некоторых незлокачественных заболеваний системы крови [14, с. 1002; 8, с.527]. Только для 50-70% пациентов возможно найти полностью совместимого родственного или неродственного донора, что может быть препятствием к своевременному проведению алло-ТГСК, поэтому чрезвычайно актуален поиск альтернативных источников гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), к которым относятся пуповинная кровь, частично совместимый, в том числе гаплоидентичный родственный донор [14, с. 1008; 1, с. 1249]. Однако высокая частота развития осложнений, связанных с несовместимостью по генам HLA-системы, таких, как тяжелая острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), неприживание трансплантата, ограничивала широкое внедрение гаплоидентичной ТГСК (гапло-ТГСК) в клиническую практику и послужила поводом для усовершенствования данной технологии [6, с. 842; 16, с. 342]. Проведенные многочисленные исследования, указывающие на потенциальную роль популяции Т-лимфоцитов, несущих гамма/дельта Т-клеточный рецептор, в противоопухолевом иммунитете, результаты клинического применения CD3/CD19-деплеции позволили R. Handgretinger et al. разработать новую методику обработки трансплантата – TCR α/β и CD19-деплецию, что увеличило эффективность «очистки» до показателя $> 4,5 \log$, сопоставимого с

аналогичным параметром CD34+-селекции, в то время как показатель сохранности CD34+ в трансплантате повысился до > 90 % [11, с. 664; 12, с. 34]. В результате формируется трансплантат с высоким содержанием стволовых клеток, коммитированных миелоидных предшественников, NK-клеток и гамма/дельта Т-лимфоцитов, что позволяет избежать такие осложнения гаплогенной алло-ТГСК, наблюдаемые в ранние годы, как первичная недостаточность трансплантата, увеличение риска рецидива гемобластоза и оппортунистических инфекций [7, с. 29; 12, с. 35]. Другой вариант гаплогенной алло-ТГСК с Т-клеточной деплецией *in vivo* связан с внедрением метода посттрансплантационного циклофосфана в дни +3, +4 в дозе 50 мг/кг веса реципиента и имеет ряд преимуществ, таких, как простота выполнения, отсутствие необходимости в манипулировании с трансплантатом *ex vivo*, что значительно уменьшает вероятность потерь CD34+-клеток [10, с. 643; 5, с. 1040]. Усовершенствование технологии гаплогенной алло-ТГСК в последние годы приблизило ее результаты в ряде центров к эффективности неродственной совместимой алло-ТГСК при острых лейкозах и лимфоме Ходжкина [3, с. 1282; 2, с. 3583; 13, с. 3428; 17, с. 846]. Несмотря на имеющиеся данные, опыт применения гаплогенной алло-ТГСК с TCR α/β и CD19-деплецией у взрослых в нашей стране не велик, так же, как и использование циклофосфана в ранний посттрансплантационный период с целью индукции толерантности медикаментозным способом, особенно у пациентов, имеющих «продвинутые» стадии заболевания [15, с. 25].

Цель исследования - оценить результаты гаплогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Материалы и методы

В исследование включены 18 пациентов с онкогематологическими заболеваниями в возрасте от 13 до 48 лет (медиана 22,5 года), которым была выполнена аллогенная гаплогенная алло-ТГСК в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2015 по май 2020 гг. (таблица 1). Медиана наблюдения

составила 140 дней (от 20 до 1215). Распределение по полу: 12 мужчин и 6 женщин.

Таблица 1.

Характеристика пациентов

Параметр	Значение
Пол, мужчин/женщин	12/6
Возраст, лет, медиана	22,5 (13-48)
Диагноз:	
Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ)	8 (44,44%)
Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)	8 (44,44%)
Лимфома Ходжкина (ЛХ)	2 (11,12%)
Статус основного заболевания на момент трансплантации:	
Полная ремиссия (ПР)	11 (61,12%)
Вне ПР	7 (38,88%)
Источник ГСК:	
ГСК периферической крови	13 (72,22%)
ГСК костный мозг	5 (27,78%)
Количество CD 34+, $\times 10^6$ /кг массы реципиента:	
ГСК периферической крови	6,32 (2,6-8,7)
ГСК костный мозг	3,06 (1,92-4)
Режим кондиционирования:	
Миелоаблативный	2 (11,11%)
Кондиционирование со сниженной интенсивностью	16 (88,89%)
Профилактика РТПХ:	
Посттрансплантационный циклофосфан (ПТЦф)	12 (66,67%)
TCR α/β , CD19+ деплеция	6 (33,33%)

Примечание: ГСК - гемопоэтические стволовые клетки, РТПХ - реакция трансплантат против хозяина

Диагноз острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) установлен у 8, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) - у 8, лимфома Ходжкина (ЛХ) - у 2 больных. Всего 8 пациентов с острым лейкозом (44,44%) находились в полной ремиссии: первая полная ремиссия – 4 (22,20%); вторая или последующая ремиссия - 4 (22,20%). Семь пациентов (38,88%), находившихся на момент трансплантации вне ремиссии острого лейкоза, получали гапло-ТГСК как «терапию спасения». Одному больному по причине неприживления трансплантата после HLA-совместимой (10/10) неродственной трансплантации гапло-ТГСК проведена в качестве повторной. В качестве доноров выступили: брат в 5 (27,77%) случаях, сестра - 4 (22,22%), отец - 4 (22,22%), мать - 2 (11,11%), сын - 2 (11,11%) и дочь – 1 (5,55%). В 4 (22,22%) случаях донором была женщина для реципиента мужчины.

Немиелоаблативное кондиционирование или кондиционирование со сниженной интенсивностью (РИК) использовалось у 16 (88,89%), миелоаблативное кондиционирование (МАК) - у 2 (11,11). Бусульфан (в суммарной дозе от 6,4 до 14 мг/кг) получали 14 пациентов (77,76%), по 2 пациентов (11,12%) - бендамустин (в сумарной дозе 390 мг/м²) и мелфалан (100 мг/м² и 180 мг/м²) и 1 пациент (5,55%) – треосульфан (42 г/м²). У пациентов, находившихся вне ремиссии, для редукции опухолевой массы был применен двухфазный режим кондиционирования, включающий в себя тиотепу или высокодозный цитарабин в сумарной дозе соответственно 100 мг/м² и 8г/м². Для иммуноабляции использовали флюдарабин в суммарной дозе 150-180 мг/м² у 17 пациентов (94,44%).

Для профилактики РТПХ основным препаратом являлся посттрансплантационный циклофосфан (ПТЦф) в дозе 50 мг/кг в дни +3 и +4 у 12 (66,67%) пациентов и у 6 (33,33%) больных была выполнена TCRα/β и CD19+ деплеция. Кроме того, вторым компонентом в схеме профилактики РТПХ 13 (72,2%) и 4 (22%) пациента, соответственно, получали такролимус в дозе 0,03 мг/кг/сут или циклоспорин А в дозе 3 мг/кг/сут с +5 дня. Третьим препаратом применяли микофенолат мофетил в дозе 30-45 мг/кг/сут у - 16

(88,89%) и АТГАМ 40 мг/кг/сут у - 1 (5,55%). Пяти больным, получившим манипулированные ГСК ПК при трансплантации, на -1 сут. был добавлен ритуксимаб. Таким образом, 3–компонентная схема применена у 17 (94,44%) больных, 1 пациент получал только ПТЦф.

Костный мозг был источником гемопоэтических стволовых клеток для 5 (27,78%) пациентов, мобилизованные колониестимулирующим фактором гемопоэтические стволовые клетки периферической крови (ПК) - для 13 (72,22%).

Трансплантат подвергался процедуре процессинга с удалением Т-лимфоцитов (TCRα/β+) и В-лимфоцитов (CD19+) с помощью аппарата CliniMACS Plus (Miltenyi Biotec, Германия).

Для характеристики пациентов использовались описательные параметры: медиана, средняя, минимальное и максимальное значения. Для оценки общей и безрецидивной выживаемости (соответственно ОВ и БРВ) использовался метод Каплан-Мейера. Различия считались статистически достоверными при уровне $p < 0,05$. Статистический анализ выполнялся с использованием программ Excel 10.0, Microsoft Office 16; Statistica 23.

Результаты

Восстановление гемопоэза зафиксировано у 13 пациентов (72,22%). Медиана времени восстановления гранулоцитов (более $0,5 \times 10^9$ /л в течение 3 последовательных дней) составила 19 (11-41) дней, медиана восстановления тромбоцитов (более 20×10^9 /л без потребности в гемотрансфузиях в течение 7 последовательных дней) - 19,9 (12-44) дня. У 10 (76,9%) пациентов в ранний или поздний посттрансплантационный период персистировала гипофункция трансплантата, из них у 4 (40%) по двум и более росткам кроветворения. Первичное неприживление зафиксировано у 3 (16,66) пациентов, отторжение трансплантата - у 2 (10,12%). Медиана CD34+ клеток $\times 10^6$ на кг массы реципиента составила 3,06 (1,92-4,00) и 6,32 (2,60-8,70), соответственно, в костном мозге и ПК ($p < 0,05$). Медиана эффективности деплеции для Т-и В-лимфоцитов составляла 3,6 (от 3,1 до 4,4) log и 3,4 (от 3,0

до 3,6) log соответственно; медиана дозы α/β -Т-лимфоцитов в трансплантате – 23×10^3 /кг (от 8 до 150); В-клеток – 74×10^3 /кг (от 3 до 540), медиана CD34+ клеток $\times 10^6$ на кг массы реципиента - 5,4 (2,60-6,90).

Общая выживаемость (ОВ) среди всех больных составила: 1-летняя - 53%, 2-летняя – 36% (рис. 1).

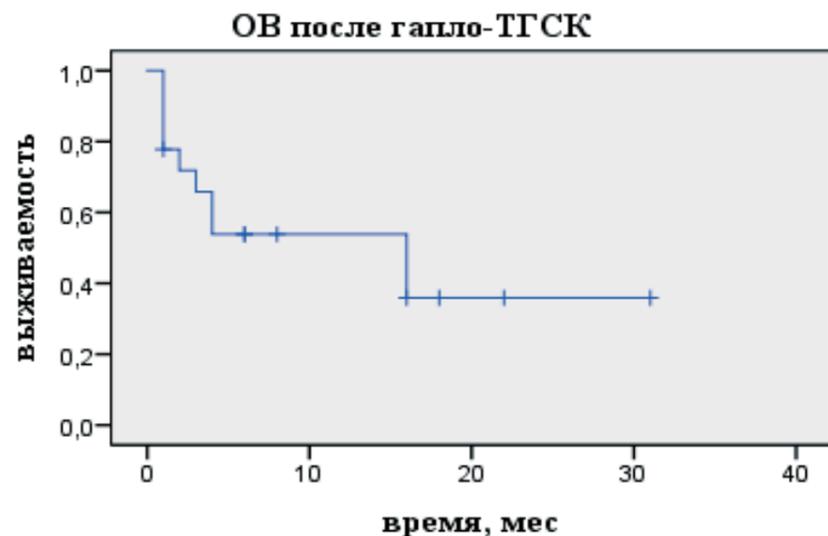


Рисунок 1. Общая выживаемость среди всех пациентов после гапло-ТГСК

Однолетняя ОВ у пациентов с ПТЦф - 55%. У пациентов с TCR α/β , CD19+ деплецией по причине короткого периода наблюдения (менее 1 года) ОВ определена за 6 мес. – 50% (рис. 2).

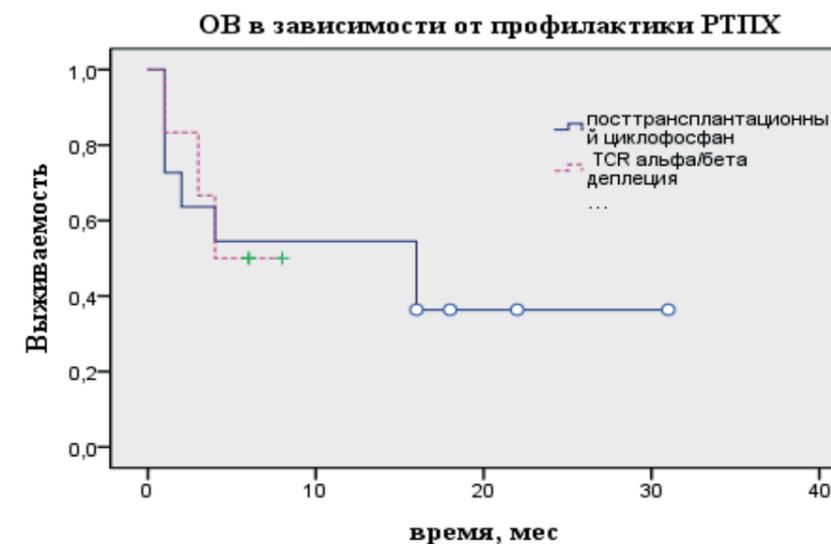


Рисунок 2. Общая выживаемость пациентов после гапло-ТГСК с ПТЦф и TCR (альфа/бета) деплецией

Однолетняя ОВ среди пациентов в полной и вне полной ремиссии заболевания на момент проведения ТГСК составила 42% и 72% соответственно (рис. 3, 4). Такой нехарактерный результат может быть объяснен более частой гибелью пациентов от инфекционно-токсических осложнений в группе с полными ремиссиями и небольшим количеством наблюдений.



Рисунок 3. Общая выживаемость после гапло-ТГСК среди пациентов вне полной ремиссии на момент проведения ТГСК

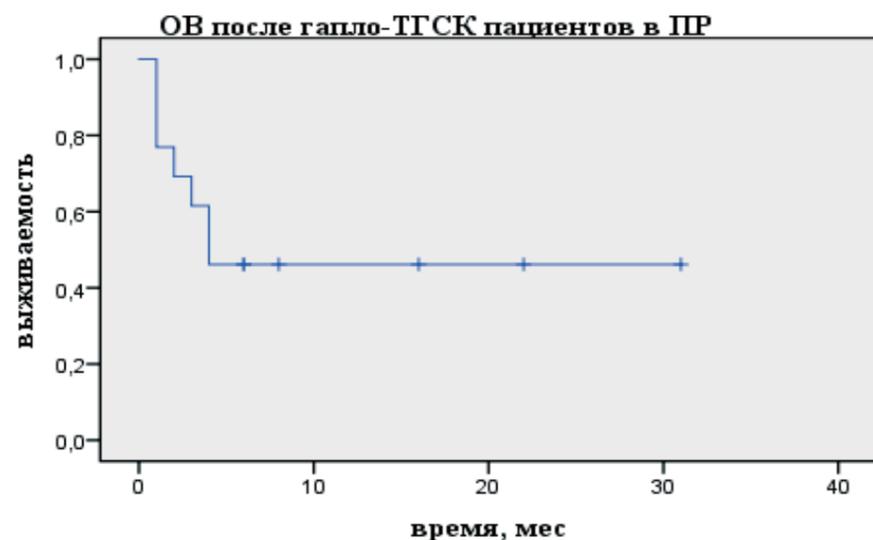


Рисунок 4. Общая выживаемость после гапло-ТГСК среди пациентов в полной ремиссии (ПР) на момент проведения ТГСК

Двухлетняя безрецидивная выживаемость (БРВ) для всех больных составила 62% (рис.5).

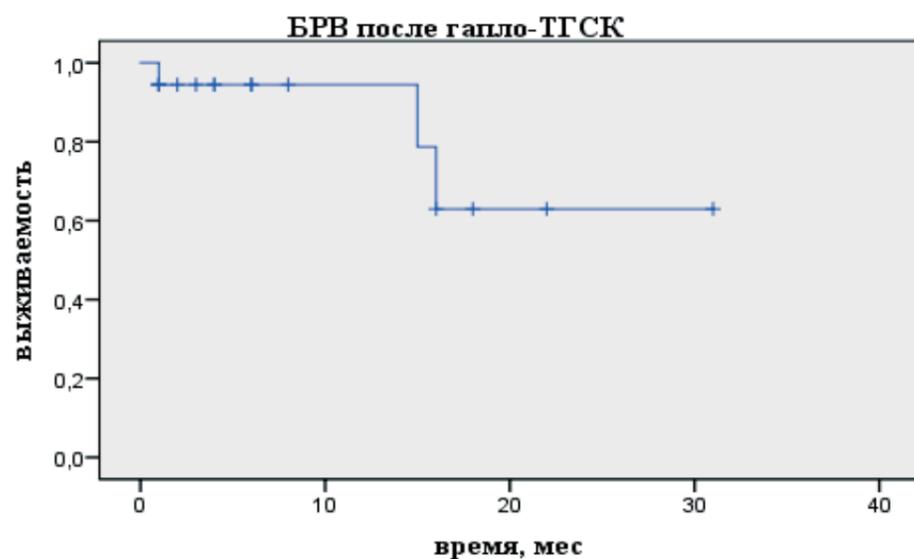


Рисунок 5. Безрецидивная выживаемость всех пациентов после гапло-ТГСК

Однолетняя БРВ в полной и вне полной ремиссии заболевания на момент проведения ТГСК составила 100% и 52%, соответственно (рис. 6).

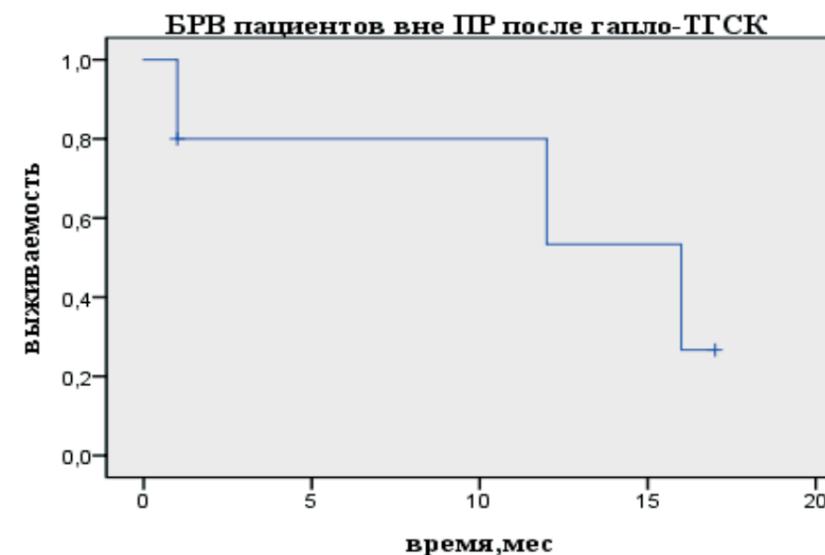


Рисунок 6. Безрецидивная выживаемость после гапло-ТГСК среди пациентов вне полной ремиссии на момент проведения ТГСК

Стодневная трансплантационная летальность составила 33,33%, сроки смерти 9-85 дней (медиана 43) после ТГСК. Основными причинами явились септические осложнения у 3 (50,00%) больных, тяжелая веноокклюзионная болезнь печени у 1 (16,67%), кровоизлияние в головной мозг на фоне раннего рецидива острого лейкоза у 1 (16,67%), развитие острой сердечно-сосудистой недостаточности (кардиогенного шока) после ПТЦф у 1 (16,67%) (таблица 2).

Таблица 2.

Причины смерти пациентов в первые 100 дней после гапло-ТГСК

Причина смерти	Количество пациентов, %
Сепсис	3 (50,00%)
Кардиогенный шок	1 (16,67%)
Кровоизлияние в головной мозг	1 (16,67%)
Веноокклюзионная болезнь печени 4 ст	1 (16,67%)

Клинически значимые посттрансплантационные осложнения в раннем посттрансплантационном периоде отмечены у 16 (88,88%) пациентов:

геморрагический цистит - у 4 (22,22%), у 3 из них - ВК-вирусной этиологии, тяжелый сепсис или септический шок – у 4 (22,22%), инвазивный микоз – у 3 (16,67%), реактивация цитомегаловирусной инфекции – 3 (16,67%), веноокклюзионная болезнь – 2 (11,11%), тромботическая микроангиопатия – 3 (16,67%).

Частота возникновения острой РТПХ II-IV степени, тяжелой РТПХ III-IV степени и хронической РТПХ составили 33%, 16,67% и 16,67% соответственно. Рецидивы среди восстановившихся кроветворение возникли у 3 из 13 (частота 23,08%) в сроки 1, 12 и 16 мес, эти пациенты на момент гапло-ТГСК находились вне ремиссии острого лейкоза.

Под наблюдением остаются 8 больных, из них у 7 отмечается полный донорский химеризм, у 1 - появились признаки начинающегося отторжения трансплантата после неоднократной реактивации цитомегаловирусной инфекции. Признаки минимальной остаточной болезни не определяются ни у одного из пациентов.

Заключение

Наши результаты сопоставимы с результатами других трансплантационных центров и свидетельствуют, что гапло-ТГСК является эффективным методом лечения для ряда пациентов с онкогематологическими заболеваниями [7, с. 30]. Одним из преимуществ этого метода является возможность проведения трансплантации в кратчайшие сроки. Однако общими нерешенными проблемами остаются высокая летальность, часто возникающая недостаточность трансплантата и тяжелые осложнения посттрансплантационного периода, что требует совершенствования данной технологии.

Список литературы:

1. Alternative donor transplantation for acute myeloid leukemia. / Bejanyan N., Haddad H., Brunstein C. //J Clin Med 2015;4(6):1240-1268.

2. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. / Ciceri F., Labopin M., Aversa F. [et al.] //Blood 2008;112:3574-3581.

3. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. / Burroughs L.M., O'Donnell P.V., Sandmaier B.M. [et al.] Biol Blood Marrow Transplant 2008;14(11):1279-1287.

4. Demonstration of clonable alloreactive host T cells in a primate model for bone marrow transplantation. / Reisner Y., Ben-Bassat I., Douer D. [et al.] //Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:4012-4015.

5. Graft -versus-host disease prophylaxis in unrelated peripheral blood stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide, tacrolimus and mycophenolate mofetil. / Moiseev I.S., Pirogova O.V., Alyanski A.L. [et al.] //Biol Blood Marrow Transplant 2016; 22(6):1037-1042.

6. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor allocytotoxic T lymphocytes. / Kernan N.A., Flomenberg N., Dupont B. [et al.] //Transplantation 1987;43(6):842-7.

7. Haploidentical stem cell transplantation in adults for the treatment of hematologic diseases: results of a single center (CIC725). / Beynarovich A.V., Babenko E., Moiseev I.S. [et al.] //Cellular Therapy and Transplantation (CTT). Vol. 8, No. 1, 2019 doi: 10.18620/ctt-1866-8836-2019-8-1-26-35

8. Haploidentical versus unrelated allogeneic stem cell transplantation for relapsed/refractory acute myeloid leukemia: a report on 1578 patients from the Acute

Leukemia Working Party of the EBMT. / Brissot E., Labopin M., Ehninger G. [et al.] //Haematologica 2019;104(3):524-532.

9. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. / Gragert L., Eapen M., Williams E. [et al.] //N Engl J Med 2014; 371(4):339- 348

10. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, post transplantation cyclophosphamide. / Luznik L., O'Donnell P.V., Symons H.J. [et al.] //Biol Blood Marrow Transplant 2008;14(6):641-650.

11. New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. / Handgretinger R. //Semin Oncol 2012;39(6):664–73.

12. Maschan M.A. Alpha/beta- T lymphocyte depletion: a reliable platform for development of hematopoietic stem cell transplants from haploidentical donors// Russian J Pediatric Hematol Oncol. 2015; 2(3): 34-38 (In Russian).

13. Post-transplantation cyclophosphamide-based haploidentical transplantation as alternative to matched sibling or unrelated donor transplantation for Hodgkin lymphoma: A registry study of the Lymphoma Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. / Martinez C., Gayoso J., Channels C. [et al.] J Clin Oncol 2017;35(30):3425-3432.

14. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: an emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. / Bashey A., Solomon S.R. //Bone Marrow Transplant. 2014; 49(8): 999-1008.

15. Ten-year experience of allogeneic haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with non-manipulated grafts in children and adolescents with high-

risk acute leukemia. / Paina O.V., Kozhokar P.V., Borovkova A.S. [et al.] //Cell Ther Transplant 2018;7(2): 20-27.

16. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. / Reisner Y., Kapoor N., Kirkpatrick D. [et al.] //Blood 1983;61(2):341-348.

17. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? / Y.Wang, Y.-J.Chang, L.-P. Xu [et al.] //Blood 2014;124:843–50.

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

Тематический рубрикатор: 76.29.33

**HLA-АЛЛЕЛИ И ГАПЛОТИПЫ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПРОЖИВАЮЩИХ НА
ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА**

Логинова Мария Александровна

кандидат биологических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

loginova@niigpk.ru, mlogin2010@gmail.com

Смирнова Дарья Николаевна

младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

cards1993@mail.ru

Кутявина Светлана Сергеевна

младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kss1993@bk.ru

Махова Ольга Александровна

лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

makhova.olg@yandex.ru

Обухов Иван Павлович

лаборант научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

van-obukhov@yandex.ru

Кашин Константин Павлович

кандидат медицинских наук, заместитель заведующего отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kashin@niigpk.ru

Парамонов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский

институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

paramonov@niigpk.ru

HLA ALLELES AND HAPLOTYPES OF BONE MARROW DONORS

RECRUITED IN THE NORTH CAUCASUS

Maria Loginova

PhD, Head of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Daria Smirnova

junior Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Svetlana Kutyavina

junior Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Olga Makhova

laboratory Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Ivan Obukhov

laboratory Technician of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Konstantin Kashin

PhD, Deputy Head of the Department of Transfusiology and Processing of Hematopoietic Stem Cells, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Igor Paramonov

Grand PhD in Medical science, Director of the Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

Цель – изучение частот встречаемости HLA-аллелей и пятилокусных гаплотипов у потенциальных доноров ГСК – жителей Северного Кавказа.

В ходе исследования выявлено 47 аллелей по локусу HLA-A, 77 – по локусу HLA-B, 39 – по локусу HLA-C, 54 – по локусу HLA-DRB1, 22 – по локусу HLA-DQB1. Наибольшей частотой встречаемости характеризуется гаплотип – HLA-A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02 (4,5%).

Идентифицировано 13 впервые выявленных HLA-аллелей.

Анализ пятилокусных гаплотипов показал низкую частоту встречаемости наиболее распространенных в изучаемой популяции доноров гаплотипов среди мировых популяций.

ABSTRACT

The goal is to study the HLA allele and haplotype frequencies among potential HSC donors recruited in the North Caucasus. The study identified 47 alleles for locus HLA-A, 77 – for locus HLA-B, 39 – for locus HLA-C, 54 – for locus HLA-DRB1, 22 – for locus HLA-DQB1. The highest haplotype frequency is characterized HLA-A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02 (4,5%). 13 novel HLA alleles were identified. Analysis of five-loci haplotypes showed that the most common haplotypes in the studied population is characterized by low frequency in world populations.

Ключевые слова: HLA-типирование; NGS; частота встречаемости аллелей; гаплотипы; Северный Кавказ.

Keywords: HLA-typing; NGS; allele frequency; haplotypes; North Caucasus.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) – один из наиболее эффективных методов лечения многих

онкогематологических и наследственных заболеваний у детей и взрослых. К основным показаниям к алло-ТГСК относятся: острые лейкозы, миелопролиферативные заболевания, лимфомы, апластические анемии, гемоглобинопатии, врожденные иммунодефицитные состояния и др. [3, с.83-85]. Ограничением применения алло-ТГСК является отсутствие у пациента HLA-совместимого донора, поскольку вероятность совпадения HLA-генотипов сиблингов (родных братьев или сестер) с реципиентом не превышает 25 % [11, с.782-787]. Решением данной проблемы является поиск неродственного донора в международных и национальных регистрах потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

По состоянию на апрель 2020 года в Международном регистре доноров костного мозга зарегистрировано более 37 миллионов потенциальных доноров ГСК [12]. Однако для российского пациента поиск донора в международном регистре осложняется не только стоимостью процедуры поиска и заготовки клеточного материала, но и зачастую отсутствием совместимого неродственного донора. Это объясняется большим разнообразием национальностей и этнических групп, проживающих в России, что сопровождается формированием специфического аллельного полиморфизма HLA-генов [1, с. 68-74].

Анализ распространенности HLA-гаплотипов в различных популяциях широко применяется для решения ряда актуальных задач практической медицины, к числу которых относится прогнозирование вероятности успешного поиска HLA-совместимых неродственных доноров для пациентов, нуждающихся в проведении аллогенной ТГСК [2, с. 27-38].

В связи с этим, изучение иммуногенетических особенностей потенциальных доноров ГСК, проживающих в различных регионах России, является актуальным направлением исследования.

Цель работы – изучение частот встречаемости HLA-аллелей и пятилокусных гаплотипов у потенциальных доноров ГСК – жителей Северного Кавказа.

Материалы и методы

В исследование включено 2663 образца цельной крови, полученных от потенциальных доноров ГСК, проживающих на территории Чеченской Республики, Ставропольского края и Республики Дагестан. Препараты ДНК выделены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – K₃EDTA в концентрации 2 мг/мл) методом колоночной фильтрации с применением наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit («QIAGEN GmbH», Германия). Концентрацию препаратов ДНК измеряли на амплификаторе нуклеиновых кислот QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур), затем образцы нормализовали деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 проводили в разрешении 2-fields по технологии NGS с использованием тест-системы VariFind™ HLA Solution IL-v2 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия), массовое параллельное секвенирование проводили на приборе MiSeq™ System («Illumina Inc.», США). Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения VariFind™ HLA Software (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия) в автоматическом режиме.

Частоты встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов рассчитывали методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма для полилокусных данных с применением программного обеспечения Arlequin v.3.5.2.2. Стандартные отклонения определяли при начальном значении итераций равном 100 [6, с. 47-50].

Результаты

В результате исследования выявлено: 47 аллелей по локусу HLA-A, 77 – по локусу HLA-B, 39 – по локусу HLA-C, 20 – по локусу DQB1, 54 – по локусу HLA-DRB1. Частотой встречаемости более 10% среди аллелей локусов I класса характеризуются HLA-A*02:01 (33,0%), HLA-A*01:01 (12,1%), HLA-A*24:02 (10,0%), HLA-B*13:02 (12,1%), HLA-B*51:01 (11,6%), HLA-C*06:02 (20,9%), HLA-C*04:01 (15,1%), HLA-C*07:02 (10,5%). Наиболее редкими аллелями среди локусов I класса оказались: HLA-A*01:03, HLA-A*01:217, HLA-A*02:10,

HLA-A*02:658, HLA-A*03:07, HLA-A*11:72, HLA-A*32:121, HLA-A*36:04, HLA-A*74:03; HLA-B*67:01, HLA-B*73:01, HLA-B*81:02, HLA-B*51:28, HLA-B*51:08; HLA-C*03:49, HLA-C*05:145, HLA-C*06:104, HLA-C*07:499, HLA-C*08:22, HLA-C*12:234, каждый из которых выявлен по одному разу.

Среди аллелей локусов HLA-DRB1 и HLA-DQB1 наибольшей частотой характеризуются аллели HLA-DRB1*07:01 (17,4%), HLA-DRB1*13:01 (9,9%), HLA-DQB1*03:01 (19,2%), HLA-DQB1*02:02 (15,6%), HLA-DQB1*06:03 (10,7%), DQB1*03:02 (10,2%). Наименьшей частотой встречаемости среди аллелей локусов II класса характеризуются аллели DRB1*03:05, DRB1*07:112, DRB1*11:15, DRB1*15:122, DQB1*02:108, DQB1*03:12, каждый из которых был выявлен по одному разу.

Диаграммы, отображающие частоты встречаемости распространения аллелей по каждому из пяти изученных локусов, полученные с помощью сервиса hla-net.eu [8], представлены на рисунках 1-5.

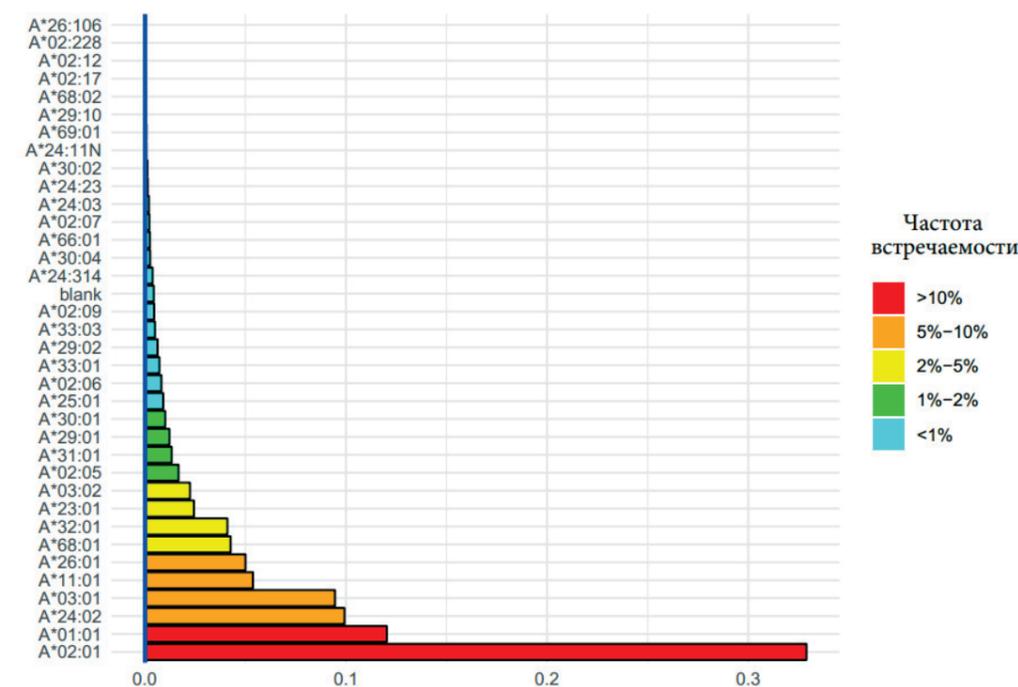


Рисунок 1. Частоты встречаемости аллелей локуса HLA-A

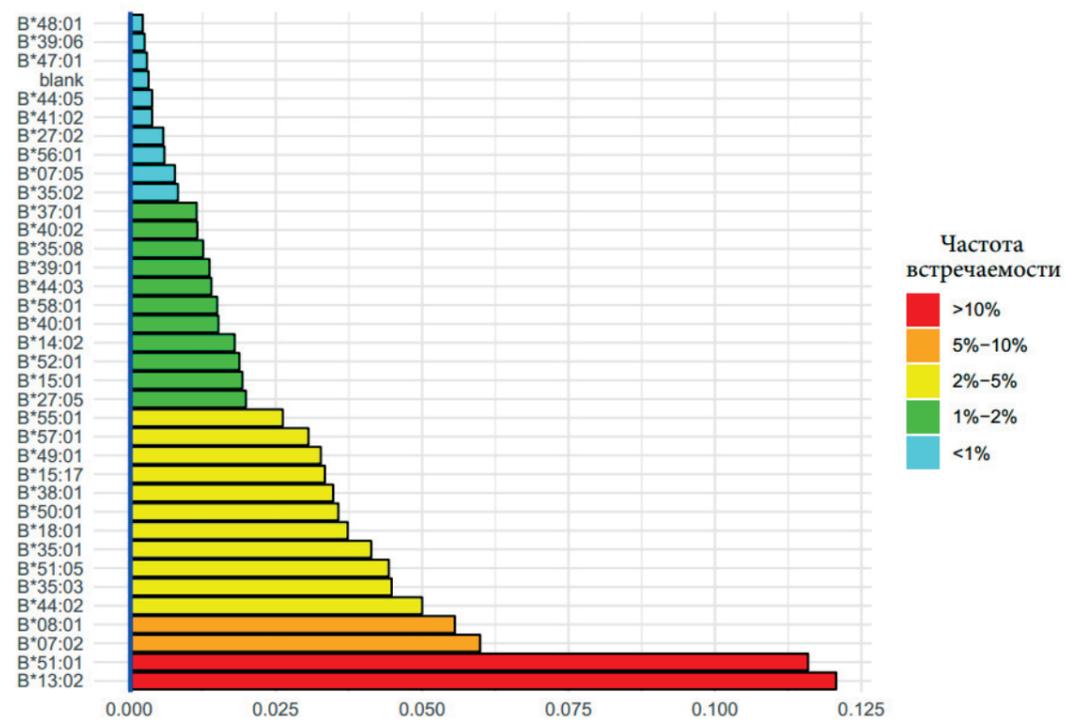


Рисунок 2. Частоты встречаемости аллелей локуса HLA-B

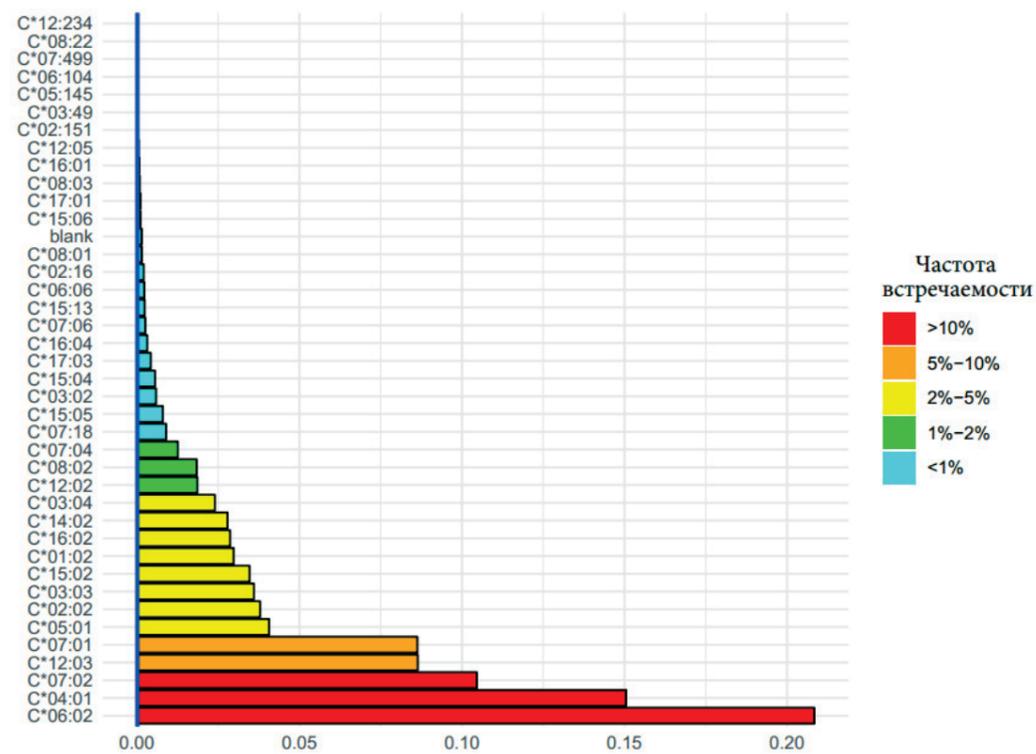


Рисунок 3. Частоты встречаемости аллелей локуса HLA-C

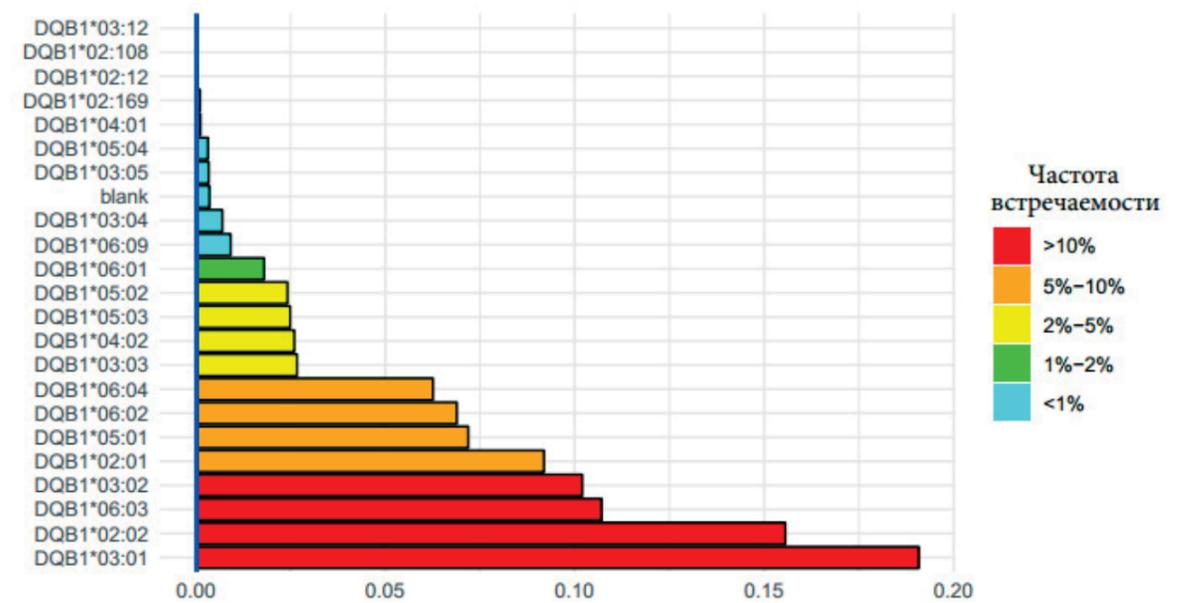


Рисунок 4. Частоты встречаемости аллелей локуса HLA-DQB1

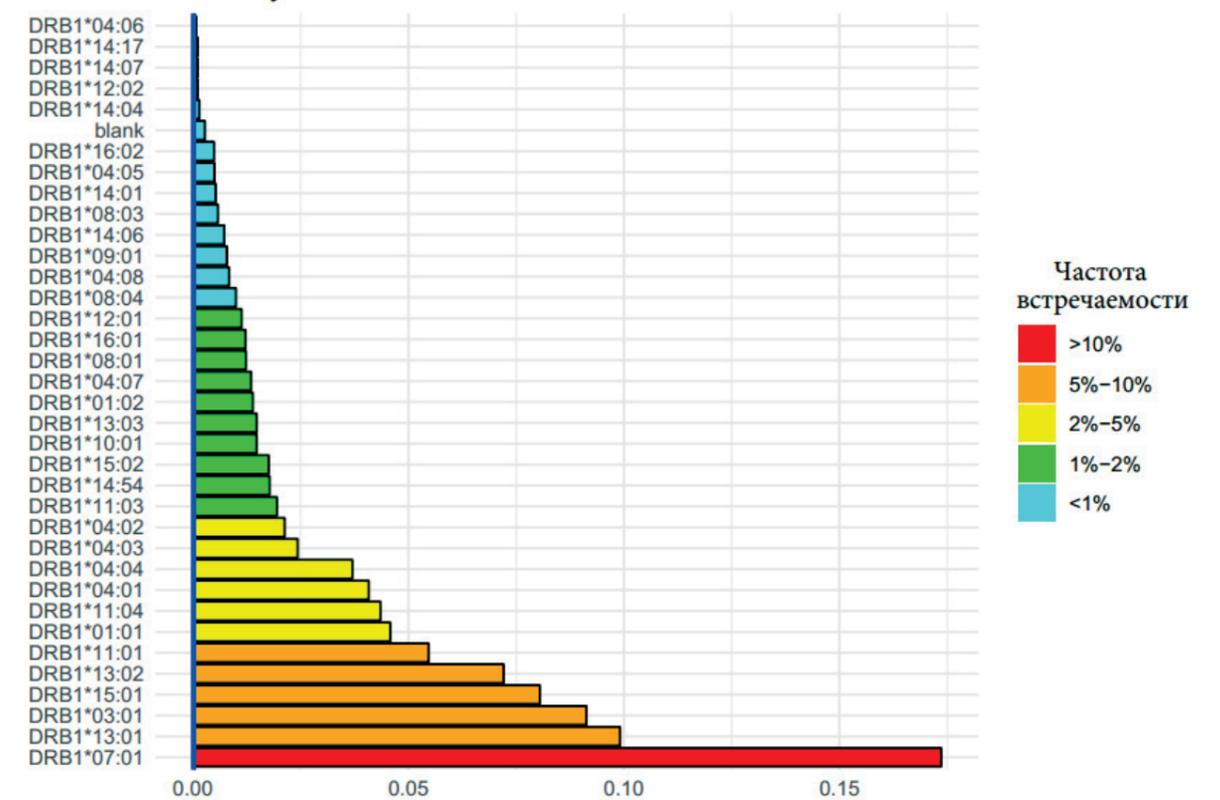


Рисунок 5. Частоты встречаемости аллелей локуса HLA-DRB1

Гаплотипы потенциальных доноров ГСК, проживающих на территории Северного Кавказа, с частотой встречаемости более 1%, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Гаплотипы HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 в порядке уменьшения частоты встречаемости

Гаплотип HLA-A-B-C-DRB1-DQB1	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,045334	0,003133
A*02:01-B*51:05-C*04:01-DRB1*13:01-DQB1*06:03	0,035447	0,002706
A*01:01-B*15:17-C*07:01-DRB1*13:02-DQB1*06:04	0,020205	0,001662
A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0,016742	0,001608
A*02:05-B*50:01-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,011214	0,001393
A*01:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,010430	0,001749
A*01:01-B*57:01-C*06:02-DRB1*04:04-DQB1*03:02	0,010313	0,001408
A*26:01-B*08:01-C*07:02-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,010107	0,001320
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:03-DQB1*03:01	0,009752	0,001408

Примечание - в общей сложности было определено 1688 из 42435 потенциально возможных гаплотипов HLA-A-B-C-DRB1-DQB1.

На первом месте по частоте встречаемости расположен гаплотип HLA-A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02 (4,5%). Данный гаплотип встречается у доноров ГСК Польши (1,8%), Канарских островов (0,47%), США (Сан-Диего) (0,78%), Италии (0,59%) [4]. На втором месте с частотой встречаемости 3,5% находится гаплотип HLA-A*02:01-B*51:05-C*04:01-DRB1*13:01-DQB1*06:03, который, согласно данным сайта Allele frequencies.net, выявлен только среди доноров Германии, относящихся к турецкому меньшинству, с частотой 0,093% [12, с.330-340]. Третье место по распространенности в исследуемой популяции доноров занимает гаплотип HLA-A*01:01-B*15:17-C*07:01-DRB1*13:02-DQB1*06:04 (2,0%), встречающийся среди доноров ГСК Карелии (0,11%), Италии (0,74%) [4] и некоторых других мировых популяций [4].

В ходе исследования выявлено 13 новых аллелей, их перечень и характеристика представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Характеристика новых аллелей, выявленных в популяции Северного Кавказа

№ п/п	Аллель	Описание замены [5]	Количество человек, у которых выявлен данный аллель	Дата регистрации [5]
1	A*01:217	кодирующая, 4 экзон	1	2016-09-30
2	A*02:658 [8, с.235-236]	кодирующая, 2 экзон	1	2016-10-31
3	A*24:314	кодирующая, 3 экзон	21	2015-06-20
4	A*26:106	кодирующая, 2 экзон	2	2014-10-31
5	A*32:121 [9, с.220-221]	кодирующая, 4 экзон	1	2018-11-30
6	B*57:78	кодирующая, 2 экзон	11	2015-04-30
7	C*05:145	кодирующая, 5 экзон	1	2016-10-31
8	C*02:151 [10, с.124-125]	кодирующая, 1 экзон	2	2018-09-28
9	DQB1*03:01:26	синонимичная, 3 экзон	1	2014-11-30
10	DQB1*02:169	кодирующая, 3 экзон	6	2019-12-31
11	DRB1*07:112	кодирующая, 2 экзон	1	2019-12-31
12	DRB1*13:202	кодирующая, 2 экзон	1	2015-04-30
13	DRB1*15:122	кодирующая, 2 экзон	1	2015-04-30

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что из тринадцати аллелей, впервые выявленных в популяции потенциальных доноров Северного Кавказа, двенадцать характеризуются заменой, приводящей к изменению структуры белка. Более того, у семи аллелей замена произошла в ключевых экзонах (2, 3 – для локусов I класса, 2 – для локусов II класса), что привело к изменению аминокислотной последовательности в пептидсвязывающем сайте.

Заключение

Таким образом, получены данные об иммуногенетических особенностях потенциальных доноров ГСК, проживающих на территориях Чеченской Республики, Республики Дагестан и Ставропольского края. Определены частоты встречаемости локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 и пятилокусных гаплотипов, выявлены часто встречающиеся и редкие аллели. Исследование показало, что наиболее распространенные в изученной популяции доноров пятилокусные гаплотипы с низкой частотой встречаются среди проанализированных мировых популяций. Идентификация 13 новых аллелей свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения генетических особенностей доноров из Северного Кавказа.

Список литературы

1. Алянский А.Л., Макаренко О.А., Иванова Н.Е. и соавт. Развитие регистра неродственных доноров костного мозга в Российской Федерации: опыт НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2016. – Т.3, №2. – С. 68-74.
2. Иоффе Ю.Г., Шмидт А.Х., Заутер Ю. и соавт. HLA-генотипы Карельского регистра неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток: относительные распространенности групп аллелей и гаплотипов // Трансфузиология. – 2018. – Т.19, №1. – С. 27-38.
3. Старцева А.Ю., Янушевская Е.А., Усс А.Л., Кривенко С.И. Практические аспекты подбора донора для неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – С. 83-85.
4. Allele Frequency Net Database [Electronical resource]. Available at: <http://www.allelefrequencies.net> (data of the application 20.04.2020).

5. European Bioinformatic Institute [Electronical resource]. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/imgt/hla/allele.cgi> (data of the application 30.04.2020).
6. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. – 2007. – 23(1). – P. 47-50. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/> (accessed 06 Apr 2017).
7. HLA-net is an European network of the HLA diversity for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics [Electronical resource]. Available at: <https://hla-net.eu/> (data of the application 10.04.2020).
8. Loginova M., Jankevich T., Goltsov A., Altukhova O., Trofimov D. Description of a new HLA-A*02 allele, A*02:658, in a Russian individual // *HLA*. 2017. – 89(4). – P. 235-236.
9. Loginova M., Pavlov A., Zaytseva M., Simakova T., Paramonov I. Description of four new HLA alleles: HLA-A*01:288, -A*02:06:23, -A*32:121 and -DRB1*07:100 // *HLA*. – 2019. – 93(4). – P. 220-221.
10. Loginova M., Zakharova V., Pavlov A., Simakova T., Paramonov I. Identification of the novel HLA-C*02:151 allele in Russian bone marrow donors // *HLA*. – 2019. – 93(4). – P.124-125.
11. Mackay I., Rosen F.S. The HLA system // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – 343(11) – P. 782-787.
12. Pingel J., Solloch U.V., Hofmann J.A., Lange V., Ehninger G., Schmidt A.H. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? // *Human Immunology*. – 2013. – 74(3). – P. 330-340.

13. World Marrow Donor Association [Electronical resource]. Available at: <https://wmda.info/> (data of the application 30.04.2019).

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

Тематический рубрикатор: 76.29.33

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ В ПОПУЛЯЦИИ РУССКИХ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

Логинава Мария Александровна

кандидат биологических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

loginova@niigpk.ru, mlogin2010@gmail.com

Махова Ольга Александровна

лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

makhova.olg@yandex.ru

Кутявина Светлана Сергеевна

младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

kss1993@bk.ru

Смирнова Дарья Николаевна

младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

cards1993@mail.ru

Обухов Иван Павлович

лаборант научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

vap-obukhov@yandex.ru

Парамонов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

paramonov@niigpk.ru

CHARACTERISTICS OF HLA ALLELES AND HAPLOTYPES OF RUSSIANS LIVING IN THE IRKUTSK REGION

Maria Loginova

PhD, Head of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Olga Makhova

laboratory Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Svetlana Kut'yavina

junior Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Daria Smirnova

junior Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Ivan Obukhov

laboratory Technician of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics, Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Igor Paramonov

Grand PhD in Medical science, Director of the Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

АННОТАЦИЯ

Проведено HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 1237 потенциальных доноров ГСК, проживающих на территории Иркутской области. В ходе исследования выявлен 41 аллель по локусу HLA-A, 71 – по локусу HLA-B, 38 – по локусу HLA-C, 46 – по локусу HLA-DRB1, 19 – по локусу HLA-DQB1. Наиболее распространенный гаплотип – HLA - A*01:01–B*08:01–C*07:01–DRB1*03:01–DQB1*02:01 (3,3%).

ABSTRACT

HLA-typing was performed for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 loci in 1237 potential HSC donors living in the Irkutsk region. The study identified 41 alleles at the HLA-A locus, 71 at the HLA-B locus, 38 at the HLA-C locus, 46 at the HLA-DRB1 locus, and 19 at the HLA-DQB1 locus. The most

common haplotype is HLA - A*01: 01–B*08:01–C*07:01–DRB1*03:01–DQB1*02:01 (3,3%).

Ключевые слова: HLA-типирование; NGS; аллели; гаплотип; частота встречаемости; Иркутская область.

Keywords: HLA-typing; NGS; alleles; haplotype; frequency; Irkutsk region.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является одним из эффективных методов терапии многих злокачественных, гематологических и наследственных заболеваний у детей и взрослых [1, с.6]. Согласно данным European Society for Blood and Marrow Transplantation, в 2018 году выполнено 19630 аллогенных трансплантаций ГСК в странах Европы, в том числе в России [4].

Предпочтительный донор аллогенных ГСК – HLA идентичный сиблинг, который наследует не только одинаковые с пациентом HLA-гены, но и одни и те же HLA-гаплотипы [8, с. 29].

Вероятность нахождения совместимого сиблинга для российского пациента варьируется в пределах 10 - 30% и будет увеличиваться в семьях с количеством детей больше двух [7, с. 45; 6, с.65; 8, с.29]. При отсутствии HLA-идентичного родственного донора ГСК необходим поиск совместимого неродственного донора.

Расширение пула HLA-типированных доноров - представителей разных регионов страны будет увеличивать шансы на успешный поиск неродственных доноров ГСК для российских пациентов, нуждающихся в проведении аллогенной ТГСК, для которых отсутствует идентичный сиблинг [8, с. 29].

Учитывая многонациональность России, изучение популяционных особенностей потенциальных доноров ГСК из различных регионов страны является актуальным направлением исследования.

Материалы и методы

В исследование включено 1237 образцов цельной крови, полученных от потенциальных доноров ГСК, идентифицирующих себя как русские,

подписавших информированное добровольное согласие на вступление в регистр ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, проживающих на территории Иркутской области. Препараты геномной ДНК для проведения HLA-типирования получены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – КЗ EDTA в концентрации 2 мг/мл) методом колоночной фильтрации с применением наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit («QIAGEN GmbH», Германия). Концентрацию препаратов ДНК измеряли на амплификаторе нуклеиновых кислот QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур), затем образцы нормализовали деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в высоком разрешении проводили с использованием тест-системы VariFind™ HLA Solution IL-v2 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия), массовое параллельное секвенирование осуществляли на приборе MiSeq™ System («Illumina Inc.», США). Полученные данные анализировали с помощью программы VariFind™ HLA Software (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия) в автоматическом режиме.

Для определения частот встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма для полилокусных данных использовали программное обеспечение Arlequin v.3.5.2.2. Стандартные отклонения рассчитывали при начальном значении итераций равном 100 [10, с. 47-50].

Распределение генов по закону Харди – Вайнберга с количеством шагов в цепи Маркова, равным 100 000, рассчитывали с помощью программы Arlequin v.3.5.2.2. [10, с. 47-50].

Результаты

Частоты встречаемости аллелей HLA-A, HLA-B, HLA-C HLA-DRB1, HLA-DQB1 с соответствующими стандартными отклонениями представлены в таблицах 1 и 2.

В ходе исследования выявлен 41 аллель по локусу HLA-A, 71 – по локусу HLA-B, 38 – по локусу HLA-C, 46 – по локусу HLA-DRB1, 19 – по локусу HLA-DQB1.

Наибольшей частотой встречаемости в локусе HLA-A обладают аллели: HLA-A*02:01 (27,2%), HLA-A*03:01 (14,4%), HLA-A*24:02 (11,2%). Среди аллелей локуса HLA-B наиболее часто встречаются HLA-B*07:02 (12,1%), HLA-B*08:01 (6,6%), HLA-B*18:01 (6,6%). В локусе HLA-C наибольшей частотой встречаемости обладают аллели HLA-C*07:02 (14,1%), HLA-C*04:01 (12,4%), HLA-C*06:02 (11,2%). Минимальной частотой встречаемости среди аллелей локусов I класса характеризуются A*02:20, A*02:35, A*02:704, A*03:123, A*11:83, A*25:11, A*68:35, B*07:10, B*13:125, B*14:01, B*15:10, B*15:11, B*15:24, B*15:73, B*18:18, B*35:42, B*40:32, B*42:02, B*44:06, B*51:04, B*51:08, B*55:02, B*57:03, B*73:01, C*02:149, C*03:357, C*07:250, C*07:57, C*07:617, C*14:03, C*15:06, C*15:11, C*17:38, выявленные по одному разу.

С частотой встречаемости более 10% у локусов II класса выявлены аллели HLA-DRB1*07:01 (14,3%), HLA-DRB1*15:01 (12,7%), HLA-DRB1*01:01 (10,1%), HLA-DQB1: HLA-DQB1*03:01 (20,4%), HLA-DQB1*05:01 (12,8%), HLA-DQB1*06:02 (12,2%) HLA-DQB1*02:02 (10,5%). Наиболее редкими аллелями локусов II класса являются HLA-DRB1*04:06, DRB1*07:34, DRB1*11:15, DRB1*11:37, DRB1*12:01/12:10, DRB1*14:02, DRB1*14:06, DRB1*14:27, DQB1*02:17.

Гаплотипы, частота встречаемости которых составляет более 1%, представлены в таблице 3. По результатам анализа максимальную частоту встречаемости в исследованной популяции имеют гаплотипы: HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (3,3%), HLA-A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (2,7%), HLA-A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (2,1%).

Частоты встречаемости HLA-аллелей локусов I класса

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение	аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение	аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение
A*02:01	0,272029	0,009841	B*07:02	0,121665	0,006027	C*07:02	0,141876	0,007374
A*03:01	0,143897	0,006941	B*08:01	0,066694	0,005338	C*04:01	0,124899	0,007032
A*24:02	0,111964	0,006784	B*18:01	0,066289	0,004802	C*07:01	0,112773	0,006728
A*01:01	0,111560	0,006066	B*35:01	0,061035	0,005214	C*06:02	0,107518	0,006247
A*11:01	0,056589	0,005088	B*51:01	0,051334	0,003916	C*12:03	0,097817	0,005674
A*26:01	0,044058	0,004320	B*13:02	0,050930	0,003994	C*03:04	0,067906	0,005292
A*25:01	0,043250	0,003748	B*15:01	0,050930	0,004756	C*02:02	0,056589	0,005414
A*68:01	0,029911	0,003571	B*44:02	0,042846	0,004103	C*01:02	0,040420	0,004040
A*32:01	0,028294	0,003288	B*40:01	0,040420	0,003861	C*03:03	0,036378	0,003815
A*31:01	0,026677	0,002782	B*44:03	0,035974	0,004113	C*05:01	0,035974	0,004083
A*23:01	0,024656	0,003118	B*38:01	0,034762	0,003627	C*08:02	0,026677	0,003448
A*30:01	0,016977	0,002569	B*27:05	0,034357	0,003812	C*07:04	0,025061	0,003380
A*33:01	0,015360	0,002412	B*57:01	0,030719	0,003124	C*12:02	0,018593	0,002693
A*33:03	0,011722	0,002210	B*14:02	0,027890	0,003286	C*15:02	0,017785	0,002811
A*29:02	0,009297	0,002074	B*40:02	0,023848	0,003744	C*17:03	0,017381	0,002366
A*02:06	0,007276	0,001623	B*35:03	0,023040	0,002716	C*14:02	0,011722	0,002107
A*66:01	0,006871	0,001751	B*39:01	0,022231	0,002981	C*03:02	0,011318	0,001907
A*02:05	0,005659	0,001396	B*49:01	0,018593	0,002539	C*16:01	0,009701	0,002145
A*29:01	0,005255	0,001504	B*52:01	0,017785	0,002780	C*08:03	0,006063	0,001450
A*68:02	0,005255	0,001527	B*41:02	0,016977	0,002237	C*16:02	0,005659	0,001483
A*03:02	0,003638	0,001400	B*56:01	0,013339	0,002366	C*08:01	0,005255	0,001533
A*30:02	0,002829	0,000978	B*58:01	0,012935	0,002172	C*15:05	0,004446	0,001456
A*30:04	0,0	0,001024	B*35:02	0,012530	0,002450	C*17:01	0,004446	0,001271
A*02:07	02829	0,001070	B*37:01	0,011318	0,002196	C*15:04	0,002425	0,000857

A*68:24	0,002425	0,000723	B*44:27	0,011318	0,002244	C*07:18	0,002021	0,000901
A*69:01	0,001213	0,000710	B*48:01	0,009701	0,001873	C*16:04	0,002021	0,000900
A*01:02	0,001213	0,000536	B*50:01	0,009297	0,002065	C*07:06	0,001213	0,000697
A*02:02	0,000808	0,000545	B*41:01	0,008488	0,001913	C*08:22	0,001213	0,000619
A*02:11	0,000808	0,000540	B*44:05	0,008488	0,001802	C*15:13	0,001213	0,000708
A*02:17	0,000808	0,000501	B*55:01	0,008488	0,001933	C*02:149	0,000404	0,000461
A*24:03	0,000808	0,000567	B*27:02	0,006871	0,001801	C*03:357	0,000404	0,000408
A*26:08	0,000808	0,000597	B*35:08	0,005659	0,001548	C*07:250	0,000404	0,000369
A*31:08	0,000808	0,000551	B*39:06	0,003638	0,001113	C*07:57	0,000404	0,000429
A*33:05	0,000808	0,000568	B*40:06	0,003638	0,001219	C*07:617	0,000404	0,000376
A*02:20	0,000808	0,000433	B*07:05	0,003234	0,001143	C*14:03	0,000404	0,000391
A*02:35	0,000404	0,000422	B*15:17	0,002425	0,000944	C*15:06	0,000404	0,000361
A*02:70	0,000404	0,000381	B*18:03	0,002425	0,001007	C*15:11	0,000404	0,000385
4	0,000404	0,000401	B*47:01	0,002425	0,000950	C*17:38	0,000404	0,000353
A*03:12	0,000404	0,000363	B*54:01	0,002021	0,000897			
3	0,000404	0,000406	B*15:18	0,001617	0,000726			
A*11:83	0,000404	0,000412	B*27:14	0,001617	0,000860			
A*25:11	0,000404		B*53:01	0,001617	0,000739			
A*68:35			B*07:04	0,001213	0,000746			
			B*13:01	0,001213	0,000666			
			B*15:16	0,001213	0,000692			
			B*15:22	0,001213	0,000624			
			0	0,001213	0,000722			
			B*46:01	0,000808	0,000563			
			B*07:06	0,000808	0,000604			
			B*08:25	0,000808	0,000522			
			3	0,000808	0,000557			
			B*39:24	0,000808	0,000618			
			B*45:01	0,000808	0,000599			
			B*51:02	0,000808	0,000534			
			B*51:05	0,000404	0,000432			
			B*67:01	0,000404	0,000398			

DRB1*04:07 DRB1*04:05 DRB1*15:02* DRB1*13:05 DRB1*16:02 DRB1*14:01 DRB1*01:03 DRB1*03:01 DRB1*08:02 DRB1*14:04 DRB1*14:05 DRB1*08:04 DRB1*12:02 DRB1*14:03 DRB1*14:12 DRB1*04:06 DRB1*07:34 DRB1*11:15 DRB1*11:37 DRB1*14:02 DRB1*14:06 DRB1*14:27	0,004850 0,004042 0,004042 0,003638 0,003638 0,002021 0,001617 0,001617 0,001213 0,001213 0,001213 0,000808 0,000808 0,000808 0,000404 0,000404 0,000404 0,000404 0,000404 0,000404 0,000404	0,001516 0,001211 0,001154 0,001143 0,001164 0,000889 0,000890 0,000685 0,000697 0,000852 0,000747 0,000557 0,000677 0,000565 0,000541 0,000433 0,000422 0,000416 0,000431 0,000395 0,000414 0,000410
---	--	--

Примечание: * в связи с неполным покрытием локуса HLA-DRB1 аллели HLA-DRB1*03:01/03:147, HLA-DRB1*12:01/12:10, HLA-DRB1*09:01/09:31, HLA-DRB1*15:02/15:140/15:149 определены неоднозначно.

Таблица 3.

Гаплотипы HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 в порядке уменьшения частоты встречаемости

Гаплотип HLA-A-B-C-DRB1-DQB1	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,033973	0,003611
A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0,027400	0,003501
A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01	0,020949	0,003419
A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0,018969	0,002884
A*02:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0,016757	0,003182
A*25:01-B*18:01-C*12:03-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0,013953	0,002344
A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01	0,010914	0,002029

Примечание: в общей сложности было определено 1143 из 24035 потенциально возможных гаплотипов HLA-A-B-C-DRB1-DQB1

Гаплотип HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (3,3%) – первый по частоте встречаемости, также выявлен в некоторых европейских популяциях, а именно: среди жителей Ирландии (11,5%), среди жителей Великобритании (9,5%), среди жителей США (6,5%) и среди жителей Польши (5,8%) [9]. Второй по частоте встречаемости гаплотип HLA-A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (2,7%) также встречается среди жителей Польши, но в два раза реже – 1,2% [9]. Третий по распространенности гаплотип HLA-A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (2,1%) выявлен среди доноров Республики Карелия (4,2%), среди жителей Республики Коста-Рика (1,6%), среди индейцев Америки (9,8%), в Германии среди итальянской

диаспоры (9,6%), среди жителей Италии (8,8%), среди алеутов полуострова Аляска (6,9%), среди жителей Польши (6,7%), среди жителей Республики Колумбия (6,1%), среди жителей Испании (5,1%), среди жителей Англии (5,0%) [9].

Результаты анализа каждого локуса на соответствие равновесному распределению Харди – Вайнберга представлены в таблице 4. Для всех изученных локусов значение $p > 0,05$, что свидетельствует о соответствии распределения генотипов закону Харди – Вайнберга.

Таблица 4.

Уровни соответствия закону Харди – Вайнберга и ожидаемая гетерозиготность изученных локусов

Локус	Количество образцов	Гетерозиготность		Достижимый уровень значимости (P-value)
		обнаруженная экспериментально	ожидаемая	
HLA-A	1237	0,86500	0,86966	0,83395
HLA-B	1237	0,95150	0,95246	0,56690
HLA-C	1237	0,91350	0,91591	0,29508
HLA-DQB1	1237	0,91916	0,92704	0,73882
HLA-DRB1	1237	0,87389	0,89101	0,20594

Таким образом, изучены генетические особенности потенциальных доноров ГСК, идентифицирующих себя как русские, проживающих на территории Иркутской области. Определены частоты встречаемости локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 и пятилокусных гаплотипов. Пятилокусные гаплотипы, выявленные в исследованной популяции доноров, встречаются в некоторых европейских популяциях, а также среди жителей Центральной и Северной Америки.

Список литературы

1. Афанасьев Б.В. Выбор альтернативных доноров при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Вестник гематологии. – 2016. Т.12, – № 2. – С. 6.
2. Вероятность нахождения HLA-идентичного родственного донора для больных с заболеваниями системы крови из семей с разным числом детей/ Е.Г.Хамаганова, Е.П.Кузьминова, Е.Н.Паровичникова [и др.] // Гематология и трансфузиология. - 2017.- 62(1):29-32.
3. Выбор донора при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток/ Б.В.Афанасьев, Л.С.Зубаровская, А.Л.Алянский [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2016.- Т.3, №3 – С. 30-36.
4. Европейское общество трансплантации крови и костного мозга. Ежегодный отчет. 2019. [электронный ресурс] – режим доступа. – URL: <https://www.ebmt.org/sites/default/files/2020-04/EBMT-Annual-Report-2019.pdf> (дата обращения 06.05.2020).
5. Иммунологическая характеристика потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Иркутской области/ С.С.Кутявина, М.А.Логинова, Д.Н.Смирнова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2017.- Т.62, №3. – С.147-152.
6. Нахождение донора стволовых клеток в зависимости от распределения параметров антигенов системы HLA в популяции больных/ Н.Ф.Миланович, В.И.Левин, Г.В.Семенов, А.Л.Усс // Актуальные вопросы гематологии. – 2011.- С. 64-66.

7. Ретроспективный анализ результатов поиска совместимых доноров ГСК для пациентов клиники КНИИГИПК / М.А.Логинова, С.С.Кутявина, Д.Н.Смирнова, В.В. Черанев // Трансфузиология. – 2018 (3) – С.39-45.
8. Формирование уральского регионального регистра гемопоэтических стволовых клеток/ В.Л.Рыбкина, Т.В.Азизова, Г.В.Адамова [и др.] // Вестник гематологии. – 2015. - Том XII, № 2. – С.29.
9. Электронная база частоты встречаемости аллелей. Allele Frequency Net Database [Электронный ресурс]. URL: <http://www.allelefrequencies.net> (дата обращения: 12.05.2020).
10. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. – 2007. – 23(1). – P. 47-50. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/> (accessed 06 Apr 2017).